



UNIVERSITE PARIS XII-VAL DE MARNE

THESE

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Paris XII
Discipline : sciences et techniques de l'environnement

Présentée par :

Danièle Clavel - Barthôme

Amélioration variétale de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) pour
l'adaptation à la sécheresse. Proposition d'une approche intégrée
pour la sélection

Soutenue le 13 décembre 2004

Directrice de thèse : **Mme Y. Zuily-Fodil**, Professeur, Université Paris XII

Jury

M. Alain Coudret, Professeur, Université d'Avignon
M. Ahmad Sarrafi, Professeur, ENSA Toulouse
M. Jean Luc Khalfaoui, Directeur du CIRAD-CA, Montpellier
M. Harold Roy Macauley, Expert CORAF, Sénégal
Mme Dominique This, Maître de conférence, ENSA Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice



UNIVERSITE PARIS XII-VAL DE MARNE

THESE

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Paris XII
Discipline : sciences et techniques de l'environnement

Présentée par :

Danièle Clavel - Barthôme

Amélioration variétale de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) pour
l'adaptation à la sécheresse. Proposition d'une approche intégrée
pour la sélection

Soutenue le 13 décembre 2004

Directrice de thèse : **Mme Y. Zuily-Fodil**, Professeur, Université Paris XII

Jury

M. Alain Coudret, Professeur, Université d'Avignon
M. Ahmad Sarrafi, Professeur, ENSA Toulouse
M. Jean Luc Khalfaoui, Directeur du CIRAD-CA, Montpellier
M. Harold Roy Macauley, Expert CORAF, Sénégal
Mme Dominique This, Maître de conférence, ENSA Montpellier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à une collaboration ancienne entre le CIRAD et l'ISRA au Sénégal sur l'arachide. Des chercheurs agronomes sélectionneurs et physiologistes et des techniciens sénégalais et français ont travaillé à créer le matériel végétal utilisé et amélioré dans ce travail. Je remercie donc tout particulièrement ces institutions, notamment Daniel Annerose et Jean Luc Khalfaoui, ainsi que les techniciens et les paysans sénégalais sans qui cette thèse n'aurait pas été possible.

Je remercie ma Directrice de Thèse, Mme Yasmine Zuily, qui a accompagné l'aventure du CERAAS depuis l'origine en formant plusieurs de ces chercheurs, notamment ses deux Directeurs, et en y transférant les nouvelles technologies. Je remercie spécialement Ndèye Ndack Diop du CERAAS et Nani Khady Drame du LEPM qui, aux côtés de Mme Zuily, ont accepté d'être mes tutrices en biologie moléculaire au cours de cette thèse.

Je suis spécialement reconnaissante à l'équipe du CERAAS en particulier à son ancien Directeur, Harold Roy Macauley, qui a tout mis en oeuvre pour que ces études soient réalisées dans les meilleures conditions dans un environnement parfois difficile.

Je tiens à remercier Philippe Baradat et Michael Dingkuhn, mes collègues au CIRAD, pour leur assistance et leurs conseils éclairés.

Que l'équipe des techniciens de l'arachide CERAAS-ISRA au Sénégal, Mor Fall, Mayali Fall et Ibra Hanne, soit particulièrement remerciée pour son dévouement et sa grande contribution à ce travail depuis son début.

Mes sincères remerciements vont également aux membres du Jury qui ont accepté de donner de leur temps et de leur savoir pour évaluer et améliorer ce travail.

Enfin, je ne saurais trop remercier, ma famille, Philippe et Marie, et mes proches pour leur soutien de tous les instants.

Je dédie ce travail à Mayali Fall, grand expert en hybridations manuelles sur l'arachide, qui a été emporté loin des siens à la fleur de l'âge.

“Drought tolerance is a nebulous term that becomes more nebulous the more closely we look at it, much as a newspaper photograph does when viewed through a magnifying glass.”
Passioura , 1996

“Drought is a multidimensional stress. [] With the insufficient information on the subject, the creation of an integrated thesis may therefore be sometimes overly simplistic and other time speculative. Still, we have to strive at integration if practical application of this knowledge is sought.”
Blum, 1996

Abréviations et sigles

Termes scientifiques

ABA : acide abscissique
 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
 AGC : aptitude générale à la combinaison
 ASC : aptitude spécifique à la combinaison
 BC : back cross (rétrocroisement)
 C : taux de croissance journalier
 Ca²⁺ : calcium²⁺
 CPG : coefficient de prédiction génétique
 CRE : contenu relatif en eau
 cv : cultivar
Fv/Fm : fluorescence variable/fluorescence maximale
 Gène GUS : gène β-Glucuronidase
 HI : "harvest index"
 JAS : jours après semis
 LAI : "leaf area index" (indice foliaire)
 LEA : "late embryogenesis protein"
 LOX : lipoxygénase
 ORF : "open-reading-frame", phase ouverte de lecture
p : coefficient de partition (entre matière sèche reproductive et végétative)
 PEG : polyéthylène glycol
 PLC : phospholipase C
 PLD : phospholipase D
 PSII : photosystème II
 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA)
 RT-PCR : "reverse transcriptase polymerase chain reaction"
 SAM : sélection assistée par marqueurs
 SFI : "structure fonction index"
 SSI : stress susceptibility index
 SSR : "single sequences repeats"
 STI : "stress tolerance index"
 TDM : "total dry matter"
 TE : "transpiration efficiency"
 TSWV : "tomato spotted wilt virus"
 WUE : "water use efficiency" (efficience de l'utilisation de l'eau)
 φfol : potentiel hydrique foliaire

Institutions

AUF : Agence Universitaire de la Francophonie
 CERAAS : Centre d'Etudes Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse
 CGIAR : Consultative Group on International Agricultural Research
 CIRAD : Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement
 CORAF : Conseil Ouest et Centre africain pour la Recherche et le Développement
 DG 12 : Direction Générale 12 (UE)
 FAO : Food and Agricultural Organisation
 ICRISAT : International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (CGIAR)
 INCO : International Cooperation
 ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agricole
 JIRCAS : Japan Research Centre for Agricultural Science
 LEPM : Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire
 STD : Science, Technologie et Développement
 UE : Union Européenne
 UMR : Unité Mixte de Recherche

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	4
CHAPITRE 1. ETAT DES CONNAISSANCES	9
1.1. Présentation de l'espèce	10
1.1.1. Rôle économique dans le Monde et en Afrique	10
1.1.2. Utilisations alimentaires	11
1.1.3. Origine	12
1.1.4. Classification botanique	12
1.1.5. Mode de reproduction de l'espèce cultivée	13
1.1.6. Stades de développement	13
1.1.6.1. Germination–début floraison	14
1.1.6.2. Floraison–fructification	14
1.1.6.3. Fructification–Maturation	14
1.1.7. Diversité génétique de l'arachide	15
1.2. Adaptation des légumineuses au déficit hydrique	16
1.2.1. Mécanismes de résistance et critères de sélection	18
1.2.1.1. L'esquive	18
1.2.1.2. L'évitement	19
La capacité d'extraction de l'eau par le système racinaire	20
La régulation stomatique	21
L'ajustement osmotique	22
1.2.1.3. La tolérance	22
Stabilité des membranaires cellulaires	22
Potentiel hydrique létal	24
1.2.2. Amélioration du rendement en condition de sécheresse	25
1.2.2.1. Associations négatives entre les composantes physiologiques	25
1.2.2.2. Utilisation de mesures de substitution	26
1.3. Les mécanismes moléculaires de la réponse à la contrainte hydrique	27
1.3.1. Variété des fonctions des gènes induits par le stress osmotique	27
1.3.2. Activation transcriptionnelle des gènes	28
1.3.3. Lipides membranaires et contrainte hydrique	29
1.3.4. Endoprotéases et contrainte hydrique	30
1.4. Les biotechnologies sur l'arachide	31
1.4.1. Marquage du génome et cartes génétiques	32
1.4.2. Génomique fonctionnelle et génie génétique	33
1.4.2.1. Les méthodes de transformation	34
1.4.2.2. Les principales applications du génie génétique sur l'arachide	35
La résistance à des facteurs biotiques	35
Augmentation de la qualité de l'huile	35
La résistance à l'aflatoxine en pré-récolte	36
La tolérance à la sécheresse	38
CHAPITRE 2. VARIABILITÉ ET CONTRÔLE GENETIQUES DES CARACTÈRES AGRONOMIQUES EN CONDITIONS DE SECHERESSE	39
2.1. Introduction	40
2.2. Synthèse des résultats	65

2.2.1. Contrôle génétique des caractères	65
2.2.2. Prédiction génétique d'un caractère par un autre	66
2.2.3. Index de sélection	66
2.3. Conclusion	67
CHAPITRE 3 CARACTÈRES ASSOCIÉS À LA PRODUCTION EN CONDITIONS DE DEFICIT HYDRIQUE DE FIN DE CYCLE	68
3.1. Introduction	69
3.2. Synthèse des résultats	71
3.2.1. Rendements et traits reliés au rendement	71
3.2.2. Précocité	71
3.2.3. Variabilité des mesures physiologiques	71
3.2.4. Corrélations entre les traits mesurés et les rendements	72
3.3. Conclusion	72
CHAPITRE 4 VARIABILITÉ GENETIQUE DES CARACTÈRES D'ADAPTATION CHEZ DES LIGNÉES APPARENTÉES	74
4.1. Introduction	75
4.2. Synthèse des résultats	111
4.2.1. Amélioration des caractères agronomiques	111
4.2.2. Indices de réponse au stress	111
4.2.3. Variabilité des caractères physiologiques	112
4.3. Conclusion	112
CHAPITRE 5. SÉLECTION PRÉCOCE EN CONDITIONS CONTRÔLÉES	114
5.1. Introduction	115
5.2. Synthèse des résultats	117
5.2.1. Productivité au champ	117
5.2.2. Paramètres de croissance	117
5.2.3. Statut hydrique et relations avec la production de biomasse	117
5.2.4. Régulation stomatique et résistance protoplasmique	118
5.3. Conclusion	118
CHAPITRE 6. EXPRESSION DES GÈNES (TRANSCRITS) EN RÉPONSE À LA CONTRAINTE HYDRIQUE	120
6.1. Introduction	121
6.2. Matériel et méthode	122
6.2.1. Système expérimental	123
6.2.2. Extraction et purification des ARN	124
6.2.3. Amplification de l'ADN par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)	124
6.2.4. Semi-quantification des fragments d'ADN.	124
6.2.5. Clonage des produits de PCR	125
6.3. Résultats	125

6.3.1. Caractéristiques agronomiques et physiologiques des cultivars	125
6.3.2. Séquences partielles des gènes étudiés	126
6.3.3. Cinétiques des transcrits	127
6.4. Discussion	131
6.5. Conclusion	133
CHAPITRE 7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES : VERS UNE STRATÉGIE INTÉGRÉE DE SÉLECTION	134
7.1. Bilan des résultats obtenus sur l'arachide	135
7.2. Modèle général : les principes d'une approche intégrée	136
7.2.1. Génotypes de référence	137
7.2.2. Variabilité génétique et critères de sélection	138
7.2.3. Liaisons entre caractères physiologiques et rendement	139
7.2.4. Dispositifs en milieu contrôlé	140
7.2.5. Marqueurs moléculaires	141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142

INTRODUCTION GENERALE

La sécheresse est largement reconnue comme le premier facteur limitant la production agricole mondiale (Turner, 1986a, Daie, 1988, Passioura, 1996). Globalement 35 % de la superficie cultivable peut être classée comme aride ou sub-aride et sur ce qui reste, 25% des superficies au moins sont régulièrement soumises à des périodes de sécheresse (Ruivenkamp et Richard, 1994). De plus, les zones touchées sont en progression car l'un des dangers majeurs et avéré de «l'effet de serre» est l'élévation des températures qui accroît les risques de sécheresse. La bonne gestion de la ressource en eau est donc une nécessité économique et écologique (Boyer, 1996). En Afrique, où la culture pluviale est très largement majoritaire, la sécheresse est une contrainte permanente de la production agricole (Ceccarelli et Grando, 1996). Depuis les changements climatiques intervenus au début des années soixante-dix, le problème se pose de manière particulièrement aiguë en termes d'alimentation voire de survie des populations rurales des régions sub-sahariennes. L'activité décrite dans cette thèse concerne la sélection de l'arachide pour l'amélioration de son adaptation à la sécheresse. Au Sénégal, cette espèce constitue la principale source de revenus agricoles et concourt largement à l'alimentation humaine et animale. Elle est cultivée sur près d'un million d'ha. Dans ce pays, la culture de l'arachide est établie depuis un siècle dans les zones les plus sèches (zones sahélienne et soudano-sahélienne) qui sont aussi les plus touchées par les changements climatiques récents qui ont abouti à une spectaculaire « avancée du désert ». Au niveau de ces aires de culture aucune autre espèce agricole, pas même le mil ni, *a fortiori*, le sorgho, n'est en mesure de générer une quantité de matière sèche à l'hectare aussi importante. La parfaite adéquation de la plante aux sols très sableux de cette région, l'intégration naturelle de cette légumineuse dans une alimentation basée sur les céréales, de même que dans la rotation culturale et ses utilisations très variées sont les atouts majeurs de cette culture dans les pays sahéliens.

L'approche scientifique la mieux à même d'accroître l'adaptation des plantes à la sécheresse n'est pas clairement définie au niveau de la recherche agronomique. Les choix méthodologiques des chercheurs dépendent beaucoup du contexte socio-culturel dans lequel ils évoluent (Ruivenkamp et Richard, 1994). On peut, par exemple, se situer au niveau de l'amélioration d'un système de culture ou bien au niveau de la transformation moléculaire de la plante, deux options très différentes du point de vue des contextes agricoles et technologiques nécessaires à la réalisation des objectifs. Cependant, si la demande sociale est forte, comme en Afrique ou en Australie, on choisit le plus souvent d'améliorer une espèce particulière car le transfert de la technologie – la semence améliorée d'une espèce connue et déjà utilisée – sera rapide et efficace. Un certain nombre de points font néanmoins l'objet d'un consensus scientifique. Le raccourcissement des cycles de culture pour les adapter à la longueur de la saison des pluies, méthode classique très utilisée par les sélectionneurs est, aujourd'hui encore, probablement la méthode la plus efficace pour améliorer les rendements (Blum, 1996; Fukai *et al.*, 1999 ; Turner *et al.*, 2001). Par ailleurs, les sélections pour le seul rendement (ou ses composantes) en conditions de déficit hydrique sont toujours largement pratiquées mais ont montré leurs limites (Turner *et al.*, 2001). Cependant le rendement et ses composantes sont fortement influencés par les facteurs environnementaux (Williams, 1992 ; Blum, 1988). En outre, plus les facteurs d'alimentation hydrique et de fertilité des sols sont limitants plus la variabilité spatiale et interannuelle des réponses variétales est forte car, dans ces conditions, la variance génétique et l'héritabilité des caractères liés au rendement sont encore plus faibles que dans un environnement favorable (Monneveux, 1995). Cette forte variabilité des réponses entraîne des interactions génotype x environnement très importantes en milieu sec (Fukai, 1995) qui grèvent les résultats de sélection.

En ce qui concerne les approches basées sur la physiologie, d'autres limitations sont constatées. Les caractères physiologiques sont rarement étudiés sur le plan de leur signification fonctionnelle dans l'élaboration du rendement (Passioura, 1982). On a observé par ailleurs, que les traits qui contrôlent le développement de la plante et de la culture, essentiels pour assurer un bon rendement sous contrainte hydrique, sont rarement liés au statut hydrique des plantes (Passioura, 1996). Les études purement physiologiques qui ne mettent en oeuvre qu'un ou deux génotypes sont bien souvent impuissantes à aider le sélectionneur car elles ignorent la variabilité génétique du caractère étudié. Les études

conduites au champ dans un environnement mal contrôlé distinguent rarement les caractères intrinsèques (constitutifs) des caractères adaptatifs (induits par le stress) mais celles qui sont conduites en laboratoire ignorent la plasticité des réponses phénotypes qui est essentielle dans l'adaptation. Si une gamme de variétés est étudiée, les informations utilisables en sélection seront plus nombreuses mais bien souvent les méthodologies de criblage seront complexes et donc difficiles à utiliser sur un grand nombre de géotypes (Richards, 1996 ; Turner *et al.*, 2001). Dans le cas où la physiologie se pratique au niveau moléculaire, on cherche en général à identifier un gène dont le rôle serait essentiel dans la "résistance" à la sécheresse. Si, contrairement au principe émis par Passioura (1982), on établit que la présence de ce caractère moléculaire (enzyme-clé) est lié à un bon rendement en conditions sèches alors l'apport pour la sélection sera fondamental. Malheureusement aucune application concrète en agriculture n'étaye cette hypothèse. En effet, de la même manière qu'il n'existe pas un gène unique responsable du rendement, il est probable qu'il n'y ait pas de contrôle génétique simple de ce même rendement en conditions de déficit hydrique (Blum, 1996). Depuis une décennie environ, l'intégration pluridisciplinaire est régulièrement prônée mais reste difficile à réaliser car les ressources humaines et techniques à réunir sont multiples. Par conséquent, la sélection pour l'adaptation à la sécheresse reste donc un défi pour le sélectionneur (Turner *et al.*, 2001 ; Ceccarelli et Grando, 1996 ; Richards, 1996), car il lui faut généralement choisir parmi un grand nombre de caractères et de méthodes de mesure souvent lourdes ou inopérantes si on les considère individuellement.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse visent l'amélioration du rendement des variétés d'arachide en zone aride. La thèse présente les résultats saillants des recherches réalisées à l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherche Agricole) au CERAAS (Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse) et au laboratoire d'écophysiologie moléculaire de l'université Paris 12 (UMR 137 BIOSOL). Les travaux sont soutenus par l'UE (Union Européenne) et ont été réalisés dans le cadre du quatrième et du cinquième Programme Cadre de Recherche et Développement de la DG12.

Au Sénégal, la sélection de l'arachide pour les régions situées en zone sahélienne est basée depuis plusieurs années sur une démarche pluridisciplinaire intégrant l'agro-météorologie et la physiologie. Les travaux réalisés pour l'amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse ont abouti à la création de lignées et de populations adaptées à cet écosystème.

L'approche développée dans ce travail est dite heuristique c'est à dire fondée sur l'enrichissement progressif d'un modèle à partir de résultats expérimentaux nouveaux dans un processus ouvert et continu. La complexité des mécanismes en jeu dans l'adaptation à la sécheresse et les progrès constants dans les disciplines sollicitées par la thématique de la sécheresse justifie cette approche. Les travaux décrits correspondent par conséquent, à une approche transversale de la sélection variétale. Le concept testé est qu'une intégration des connaissances conduite sur la base de programmes d'amélioration variétale, permettra à la fois d'améliorer les méthodes de sélection et de créer des génotypes répondant à une demande de développement. Ainsi, la forte demande sociale en variétés d'arachide améliorées dans les pays du Sahel a orienté la recherche agronomique vers l'obtention de nouveaux cultivars. Des génotypes adaptés à l'environnement ciblé ont été créés. A travers une description précise sur les plans génétique, agronomique et physiologique et, dans une certaine mesure, moléculaire, ces matériels génétiques ont été mis à profit dans ce travail pour réaliser une analyse méthodologique fondée sur des questions de sélection.

Le mémoire de thèse sera présenté sous forme de 5 articles publiés ou originaux. Un bilan des connaissances précèdera l'exposé des articles et le travail sera conclu par la proposition d'un modèle méthodologique. Le premier chapitre synthétise les connaissances sur cette légumineuse tropicale très originale, l'adaptation des légumineuses au déficit hydrique, les mécanismes moléculaires de la réponse au stress et les biotechnologies disponibles sur cette espèce. Cet exposé préliminaire vise présenter et à analyser la problématique de sélection pour l'adaptation agronomique à la sécheresse. La partie expérimentale est structurée en 5 chapitres :

- une étude génétique des caractères agronomiques conduite dans le cadre d'un programme de sélection récurrente (chapitre 2),
- l'identification de traits associés à la variation de production au champ en conditions de déficit hydrique de fin de cycle (chapitre 3),
- l'analyse agronomique et physiologique de la variabilité génétique dans deux séries de lignées précoces génétiquement proches (chapitre 4),
- la recherche de caractères physiologiques pertinents pour la sélection en conditions de stress précoce en serre (chapitre 5),

- l'analyse moléculaire de transcrits impliqués dans la tolérance membranaire à la dessiccation (chapitre 6).

Le dernier chapitre de la thèse (chapitre 7) est consacré à un bilan des résultats obtenus et aux perspectives de ce travail. Le but est de proposer une stratégie de sélection à travers l'évaluation de l'efficacité de critères à différents niveaux d'intégration (agronomique, physiologiques et moléculaire) pour l'assistance à la sélection.

CHAPITRE 1

ETAT DES CONNAISSANCES

Planche I. 1) Désherbage mécanique d'un champ paysan, 2) Essai d'arachide en milieu paysan, 3) Effet de la sécheresse sur une arachide âgée de 40 jours (Photos Clavel)

1)



2)



3)



Dans la première partie de ce chapitre, l'espèce sera décrite dans ses particularités botaniques, économiques et alimentaires notamment en Afrique. La description des facteurs d'adaptation des légumineuses à la sécheresse sera présentée dans la 2^e partie. Ils seront analysés en fonction de leur utilisation potentielle comme critères de sélection pour améliorer le rendement en condition de sécheresse. Bien que ce chapitre mette l'accent sur les éléments concernant l'arachide et les légumineuses, le bilan des connaissances proposé ne se bornera pas à ces seules catégories botaniques notamment dans le cas des résultats récemment obtenus sur les mécanismes moléculaires supposés plus généraux (3^e partie). La 4^e partie de ce premier chapitre fournira une synthèse assez complète des recherches récentes ou actuelles en biotechnologies sur l'arachide.

1.1. Présentation de l'espèce

1.1.1. Rôle économique dans le Monde et en Afrique

L'arachide est cultivée sur près de 25 millions d'hectares, dans l'ensemble de la zone tropicale mais aussi en zone tempérée, jusqu'à 40° de latitude nord, aux Etats-Unis et en Chine. Sa remarquable plasticité face aux températures et aux besoins en eau explique l'extension de sa culture dans ces zones marginales, où les étés chauds lui permettent d'achever son cycle (Schilling, 1996).

La production mondiale d'arachides en coques est estimée à 34 millions de tonnes en 2002 (FAO, 2002). L'Asie fournit à elle seule plus de 70 % de cette production, avec une forte concentration en Chine (15 millions de tonnes) et en Inde (5 millions de tonnes) où la culture est en forte progression. L'Amérique du Nord fournit 5 % de la production mondiale et l'Amérique du Sud, 3 %. Le Sénégal avec une production pouvant atteindre de 1 million de tonnes, est le deuxième producteur africain derrière le Nigéria premier producteur africain (FAO, 2003).

Le rendement en gousses à l'hectare est très variable selon les conditions de culture. Il peut atteindre 5 tonnes sous irrigation, mais dépasse rarement 1 tonne en culture pluviale dans les pays soudano-sahéliens du fait de la sécheresse et des faibles conditions d'intensification des cultures (Planche I).

Le commerce international des produits arachidiers porte principalement sur les arachides de confiserie et de bouche (graines triées, salées, grillées) : 1,1 million de tonnes de graines décortiquées sont exportées, contre 268 000 tonnes pour l'huile (FAO, 2002). Le commerce du tourteau d'arachide utilisé en alimentation animale concerne un volume de 319 000 tonnes dont plus de 40% exporté par le Sénégal en 2001 (FAO, 2002). Dans le secteur de l'exportation de l'huile et du tourteau, le Sénégal, malgré un net recul ces dernières années dû à des fluctuations très importantes dans la production, joue encore un rôle de premier ordre avec des niveaux d'exportation souvent supérieurs à 1/3 du marché mondial (43 % en 2001 selon la FAO). Cependant depuis le début des années 90, ce marché subit la concurrence des huiles de tournesol et de soja. Dans les pays producteurs à fort pouvoir d'achat, notamment aux Etats-Unis, l'huile est, en revanche, considérée comme une denrée secondaire par rapport aux multiples produits élaborés à forte valeur ajoutée obtenus par le traitement industriel de la graine : beurre, pâte, confiseries et enrobés divers.

1.1.2. Utilisations alimentaires

L'arachide est un oléoprotéagineux se prêtant à de nombreuses utilisations alimentaires. Sa graine, à la fois riche en huile (50%) et en protéines (25%), fait l'objet d'emplois très diversifiés notamment en Afrique. Les populations de la zone soudano-sahélienne la consomment sous forme de légume, de sauce ou d'huile artisanale. L'huile d'arachide fait également l'objet d'une extraction industrielle (par solvant) ou artisanale (par pression) pour la consommation locale ou l'exportation. Elle est appréciée pour ses qualités nutritionnelles, sa stabilité et son bon comportement à la chaleur. Le tourteau, sous-produit de l'extraction de l'huile, est un aliment du bétail à haute valeur nutritionnelle (50% de protéines). Les fanes d'arachide constitue un fourrage riche en matière azotée digestible et de bonne valeur alimentaire (0,47 unité fourragère, en moyenne). Elles sont utilisées pour l'alimentation du bétail dans les régions tropicales et subtropicales, où leur valeur marchande peut avoisiner celle de l'arachide en coque à certaines périodes de l'année. La coque vide, résultant du traitement des gousses, est un sous-produit non négligeable. Elle sert de combustible dans les chaudières qui alimentent de nombreuses huileries. A côté d'applications chimiques (furfural) et physiques (panneaux de particules), elle a fait l'objet d'essais de gazéification avec la production annexe de charbon de coque et d'engrais (Schilling, 1996).

1.1.3. Origine

Le centre d'origine du genre *Arachis* se situe très probablement dans la région centre-sud du Brésil (Gregory *et al.*, 1980). L'espèce cultivée, *A. hypogaea* L., serait originaire d'une région située aux confins de la Bolivie, de l'Argentine et du Paraguay, où l'espèce sauvage *A. monticola*, considérée comme son ancêtre probable, se trouve bien représentée. *A. monticola* est tétraploïde comme l'espèce cultivée et se croise d'ailleurs spontanément avec elle. L'arachide cultivée présente également des affinités avec des espèces annuelles mais diploïdes, comme *A. batizocoi* et *A. duranensis*, qui pourraient être ses ancêtres diploïdes immédiats. A partir de son centre d'origine, l'arachide aurait gagné l'ensemble du continent sud-américain, où on reconnaît actuellement six centres de diversification secondaires et tertiaires (Krapovickas, 1969; Gregory et Gregory, 1976).

L'arachide aurait été domestiquée il y a plus de 3 500 ans. Au XVI^e siècle, les Portugais l'ont introduite, à partir du Brésil, en Afrique, en Inde et en Extrême-Orient. Les Espagnols ont ensuite importée l'espèce, à partir de la côte ouest de l'Amérique du Sud, dans le Pacifique ouest, en Indonésie et en Chine. L'arachide a ensuite gagné l'Afrique de l'Est, à partir de l'Asie. Vers le milieu du XVI^e siècle, elle est parvenue en Amérique du Nord et dans les autres régions du monde. La convergence, en Afrique, de matériels provenant du Brésil, d'une part, des Philippines, de l'Inde et de la Chine, d'autre part, fait de ce continent un centre tertiaire de diversification original mais très récent par rapport à la période de domestication initiale.

1.1.4. Classification botanique

L'arachide cultivée, *Arachis hypogaea* L., est une légumineuse annuelle herbacée à fructification souterraine, de la famille des fabacées. Ce comportement géocarpique très particulier est caractéristique du genre *Arachis*. L'arachide cultivée est un allotétraploïde ($2n = 4x = 40$), hybride interspécifique, stabilisé par un doublement des chromosomes, entre deux parents sauvages non identifiés (Krapovickas et Rigoni, 1957).

Au sein du genre *Arachis*, l'arachide cultivée se classe dans la section *Arachis* (série *Amphiploïdes*), qui se caractérise par l'absence de rhizome et la présence de rares racines adventives. La grande majorité des espèces sauvages apparentée à l'arachide cultivée est diploïde. Au sein de l'espèce cultivée tétraploïde, on reconnaît deux sous-espèces : *A.*

Tableau I. Classification botanique de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) tétraploïde
(d'après Singh et Simpson, 1994 et Herselman, 2003)

Sous-espèce	Variété botanique	Type commercial	Ramification	Port
<i>Hypogaea</i>	hypogaea	Virginia	alternée	rampant à érigé
	hirsuta	Peruvian Runner	alternée	rampant
<i>Fastigiata</i>	fastigiata	Valencia	séquentielle	érigée
	vulgaris	Spanish	séquentielle	érigée
	aequatoriana	-		
	peruviana	-		



Figure 1. Un plant d'arachide en début de floraison (30^e jour) (Photo Clavel)



Figure 2. Emission des gynophores dans le sol à partir de fleurs fécondées (Photo Clavel)

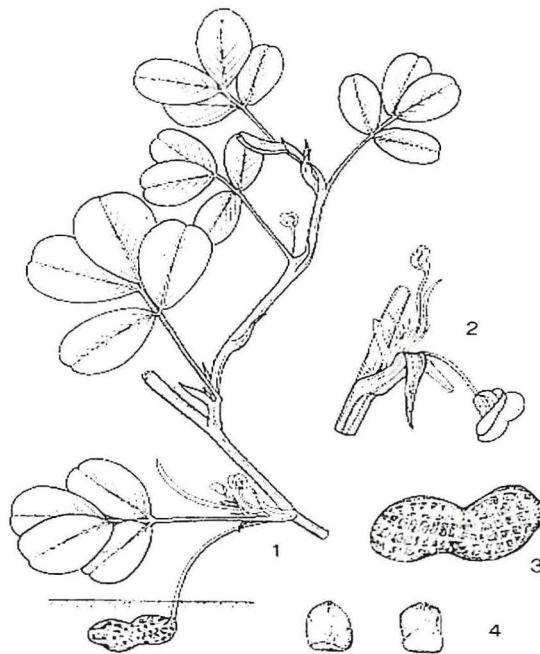


Figure 3. Représentation schématique d'un rameau de *Arachis hypogaea* L. 1) Rameau secondaire fructifère (portant une inflorescence, une fleur, un gynophore et un fruit) et un rameau végétatif – 2) Inflorescence – 3) Fruit (gousse bigraines) – 4) graines

hypogaea subsp. *hypogaea* et *A. hypogaea* subsp. *fastigiata*, chacune étant subdivisée en variétés botaniques, *hypogaea* et *hirsuta*, pour la première, *fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana* et *peruviana*, pour la seconde (Tableau I). A noter que la majorité des cultivars modernes dérivent seulement de 2 variétés botaniques, *hypogaea* (Virginia) et *vulgaris* (Spanish).

1.1.5. Mode de reproduction de l'espèce cultivée

L'arachide est une plante fortement autogame. Les fleurs sont de couleur jaune à jaune orangé de type papilionacé-cléistogames (Figure 1). Cependant le taux d'allogamie de l'arachide n'est pas nul et peut varier de 0,2 à 6,6 % selon les types botaniques, les variétés, les localités et les insectes pollinisateurs présents (Leuck et Hammons, 1965). Après la fécondation, la base de l'ovaire s'allonge à travers les pièces florales pour donner naissance à un prolongement à structure de tige, le gynophore, qui pointe vers le sol et contient les ovules fécondés à son extrémité (Figure 2). Le gynophore s'enterre verticalement tandis que le fruit ou gousse en formation prend une position horizontale entre 2 et 7 centimètres sous la surface du sol (Figure 3).

Une plante peut émettre de 600 à 1 000 fleurs selon son cycle, mais la proportion de fleurs produisant des gynophores et des fruits est réduite, de l'ordre du dixième, et variable dans le temps. En effet, les fleurs écloses tardivement ne disposent plus du temps suffisant pour donner des fruits mûrs. On distingue ainsi une période de floraison utile, très brève en régions sub-sahélienne, au-delà de laquelle les produits formés n'arrivent pas à maturité.

1.1.6. Stades de développement

L'arachide est une plante annuelle dont le cycle de développement varie de 90 à 125 jours en région tropicale. Trois grandes phases de développement peuvent être distinguées Boote (1982):

- Germination - début floraison
- Floraison - fructification
- Fructification - maturation

1.1.6.1. Germination–début floraison

La durée de cette phase est une caractéristique variétale. En climat tropical, elle est en moyenne de 20 à 35 jours, plus courte pour les variétés de type Spanish que pour les variétés tardives du groupe Virginia.

La germination débute dès que le taux d'imbibition de la graine atteint 35 à 45 %. La radicule apparaît très vite (24 à 48 heures), se développe rapidement (10 à 20 mm/j) et n'émet de racines latérales qu'après 3 ou 4 jours. A ce moment, l'hypocotyle devient visible, la croissance de ce dernier pousse les cotylédons vers la surface où ils s'étalent et laissent sortir la tige principale. Jusqu'à l'apparition des premières fleurs, la croissance végétative, mesurée par la longueur des rameaux, le nombre de feuilles ou le poids sec, est restreinte par rapport à celle du reste du cycle.

1.1.6.2. Floraison–fructification

Dès l'apparition des premières fleurs, le développement végétatif s'accélère (Caron et Granés, 1993). Pour les variétés hâtives le nombre de fleurs émises passe par un maximum entre le 25^e et le 35^e jour après semis et décroît ensuite régulièrement. La quantité de fleurs produites est sujette à de nombreuses variations. Une plante peut émettre de 600 à 1000 fleurs selon son cycle (Clavel et Gautreau, 2001). Pour une variété de type Spanish, un nombre de 200 à 300 fleurs est couramment atteint, le maximum se situant au environ de 600 par plante (Gillier et Sylvestre, 1969). Le taux d'utilisation des fleurs (transformation en graines) est faible, 10 à 20 % en moyenne, mais les fleurs formées les 2 ou 3 premières semaines, ont un fort taux d'utilisation (environ 60%). La fécondation et le développement du fruit limitent la floraison. Une semaine après fécondation, l'ovaire s'allonge et forme le gynophore qui pénètre dans le sol une dizaine de jours plus tard.

1.1.6.3. Fructification–Maturation

Cette phase dure environ entre 30 à 40 jours pour les variétés hâtives et entre 50 à 60 jours pour les variétés tardives. Elle comporte deux étapes : d'abord la coque se développe avec une évolution très faible de la taille de la graine puis cette graine commence à se développer par un fort accroissement de la pellicule et finalement de l'amande. Le poids frais de la coque atteint son maximum 2 à 3 semaines après la pénétration du gynophore dans le sol et la quantité de matière sèche accumulée est maximale à la 6^e semaine pour les Spanish et à la 10^e pour les Virginia.

1.1.7. Diversité génétique de l'arachide

La floraison et la croissance de l'arachide sont indéterminées et sa distribution géographique importante. La plasticité et la diversité morphologique de l'arachide sont, par conséquent, très fortes. Le port de la plante peut être érigé ou rampant, avec tous les stades intermédiaires. On distingue plusieurs types variétaux, principalement sur la base de leur système de ramification notamment de la fréquence des ramifications d'ordre élevé et de la disposition relative des rameaux végétatifs et des rameaux reproducteurs (Gillier et Silvestre, 1969). Bunting (1955) a ainsi défini deux groupes : l'un à ramification alternée l'autre à ramification séquentielle (Tableau I). Dans le type alterné, on observe des successions de 2 rameaux végétatifs et de 2 rameaux reproducteurs. Le port peut être rampant ou érigé mais, dans ce dernier cas, la ramification plus abondante donne un aspect buissonnant à la plante. C'est le groupe des Virginia, caractérisé par un cycle plus long (120 à 150 jours). Dans le type séquentiel, les inflorescences apparaissent à plusieurs noeuds successifs des ramifications. Les arachides de ce type sont toujours érigées, généralement peu ramifiées (4 à 5 rameaux d'ordre 1) et de cycle court (80 à 100 jours). Elles appartiennent au groupe « commercial » des Valencia et des Spanish. Ces différents types de cultivars (variétés commercialisées) — Virginia, Spanish et Valencia — s'inscrivent aisément dans la classification botanique de l'espèce mais ils excluent une partie de la variabilité des *Fastigiata* représenté par les variétés botaniques *aequatoriana* et *peruviana* (Tableau I).

La question des liaisons entre la diversité morphologique de l'arachide et sa diversité moléculaire n'est pas résolue et l'absence de résultats concluants en matière de marquage moléculaire pose problème pour une espèce de cette importance. L'arachide cultivée apparaît, en effet, encore récalcitrante aux techniques de marquage de l'ADN (Stalker *et al.*, 1997 ; Bhawat *et al.*, 2001 ; Herselman 2003) et la cartographie moléculaire reste embryonnaire sur cette espèce (Bertioli *et al.*, 2003). La diversification variétale initiale est pourtant considérable tant en Amérique du Sud (Krapovickas, 1969 ; Gregory et Gregory, 1976) et aussi dans les premiers foyers d'introduction en Asie, où subsiste probablement une forte variabilité exploitable. Elle est cependant menacée par la modernisation de l'agriculture et l'expansion des variétés améliorées (Singh et Simpson, 1994). Les premiers marqueurs, tels que les isoenzymes (Grieshammer et Wynne, 1990) et les RFLP (Kochert *et al.*, 1991) n'ont permis de ne révéler qu'une diversité limitée en liaison

toutefois avec la classification botanique. Il semble que les marqueurs AFLP, microsatellites ou l'association des deux donnent les meilleurs résultats en termes de diversité (He *et al.*, 1997 ; Hopkins *et al.*, 1999 ; Subramanian *et al.*, 2001 ; Herselman, 2003 ; Fergusson *et al.*, 2004). Cependant cette faible variabilité moléculaire est contredite par l'observation d'une grande diversité morphologique à l'intérieur de l'espèce cultivée (Upadhyaya, 2003a ; Upadhyaya *et al.*, 2003b) dont seule une petite part de la variabilité contenue dans le germplasm disponible a été exploitée par la sélection moderne (Isleib et Wynne, 1992; Swamy *et al.*, 2003). A cet égard, le fait que la quasi-totalité des cultivars actuels dérivent seulement des deux variétés botaniques, *hypogaea* (Virginia) et *vulgaris* (Spanish) doit être souligné car et c'est sans doute dans les méthodes et l'histoire de la sélection moderne que se trouve une grande partie des raisons expliquant la faible diversité moléculaire constatée jusqu'ici.

Les programmes d'élargissement de la base génétique des cultivars notamment au moyen de la sélection de population (Isleib, 1994) sont rares. La sous-utilisation des ressources génétiques de l'arachide par les sélectionneurs s'explique par le fait que les espèces sauvages du genre *Arachis* (*Arachis* spp.) en général diploïdes ne sont pas directement compatibles en croisement avec *A. hypogaea* L. et par la difficulté des interfécondations artificielles sur l'arachide. Une population de ce type a été cependant développée au Sénégal par sélection récurrente (Khalfaoui, 1990a ; Clavel et Annerose, 1997). L'objectif de ce programme était d'élargir la base génétique afin de rassembler des allèles favorables à la résistance à la sécheresse. Par ailleurs, certains programmes du Brésil, centre d'origine de l'espèce, et des USA ont développé des amphiploïdes synthétiques d'arachides sauvages, natives du Brésil et de Bolivie, et des hybrides entre des espèces sauvages et l'arachide cultivée dans le même objectif (Dos Santos *et al.*, 2003). Du fait de leur richesse potentielle en gènes de résistance, ces espèces sauvages de l'arachide font actuellement l'objet d'une grande attention et notamment d'analyse de diversité moléculaires à l'aide de marqueurs RAPD, (Bertioli *et al.*, 2003 ; Nobile *et al.*, 2004).

1.2. Adaptation des légumineuses au déficit hydrique

Dans ce chapitre, il sera fait une revue des caractères utilisables pour améliorer l'efficacité de la sélection pour l'adaptation à la sécheresse suivant deux approches. La première approche correspond au cadre d'étude décrit par Kramer (1980) puis Turner (1986b, 2000)

sous l'appellation de «Drought Resistance Framework». Elle identifie classiquement trois grands types de mécanismes : l'esquive («drought escape»), l'évitement («avoidance» ou «dehydration postponement ») et la tolérance («dehydration tolerance»). Chacun des grands mécanismes décrits dans cette classification est sous la dépendance d'un certain nombre de caractères plus ou moins complexes et plus ou moins faciles à identifier. L'intérêt, pour la sélection variétale, d'une recherche cognitive sur les réponses des plantes au niveau des organes, des cellules et des molécules est incontestable (Baker, 1989). Cependant l'amélioration individuelle des caractères associés à l'adaptation ne conduit pas toujours à des rendements augmentés en conditions de déficit hydrique (Ludlow et Muchow, 1990 ; Turner *et al.*, 2001).

La sélection, pour être efficace doit s'opérer en priorité sur les caractères dont la « valeur » (pour l'élaboration du rendement) est forte relativement à d'autres caractères de résistance (Blum, 1996). C'est la base de la deuxième approche appelée «Yield Component Framework ». L'indice de récolte et les caractères affectant l'efficacité l'utilisation de l'eau par la plante (Passioura, 1977 ; Fisher, 1981 ; Turner, 2000) ont été identifiés comme les facteurs principaux d'un modèle d'élaboration du rendement en condition de déficit hydrique. Le «Yield Component Framework » décompose le rendement en composantes physiologiques théoriquement indépendantes, chacune intégrant des processus complexes. Ce modèle est élaboré à partir de la relation générale suivante entre le rendement et ses composantes :

$$Y = TDM \times HI \quad (1)$$

où TDM représente la matière sèche totale (en général il s'agit des feuilles, tiges et graines car les racines sont rarement mesurées) et HI, l'indice de récolte.

A partir de l'équation (1), une équation conceptuelle a été proposée par Passioura en 1977 :

$$Y = W \times WUE \times HI \quad (2)$$

où W représente la quantité d'eau évapotranspirée par la culture et WUE, l'efficacité de l'utilisation ou « Water Use Efficiency », en anglais, (en grammes de matière sèche produite par gramme d'eau consommée par la culture)

Considérant que la matière sèche était davantage conditionnée par l'eau transpirée que par l'eau évaporée par le sol, Fisher (1981), propose une réécriture de l'équation (2) comme suit :

$$Y = T \times TE \times HI \quad (3)$$

Tableau II. Les principaux caractères impliqués dans les trois grands mécanismes du « drought-resistance-framework », leur utilité et leur facilité d'utilisation pour la sélection (d'après Turner *et al.*, 2001)

Mécanisme	Utilité	Facilité de sélection
Esquive		
Phénologie	Très haute	Facile
Plasticité de développement	Haute	Facile
Evitement de la déshydratation		
Contrôle stomatique	Haute	Difficile
ABA	Discutable	Difficile
Ajustement osmotique	Fonction des espèces	Difficile
Développement racinaire	Haute	Très difficile
Tolérance à la déshydratation		
Stabilité membranaire	Haute	Facile
Potentiel hydrique létal	Haute	Difficile
Proline	Discutable	Facile

où T est la transpiration et TE, son efficience (en quantité de matière sèche produite par unité d'eau transpirée).

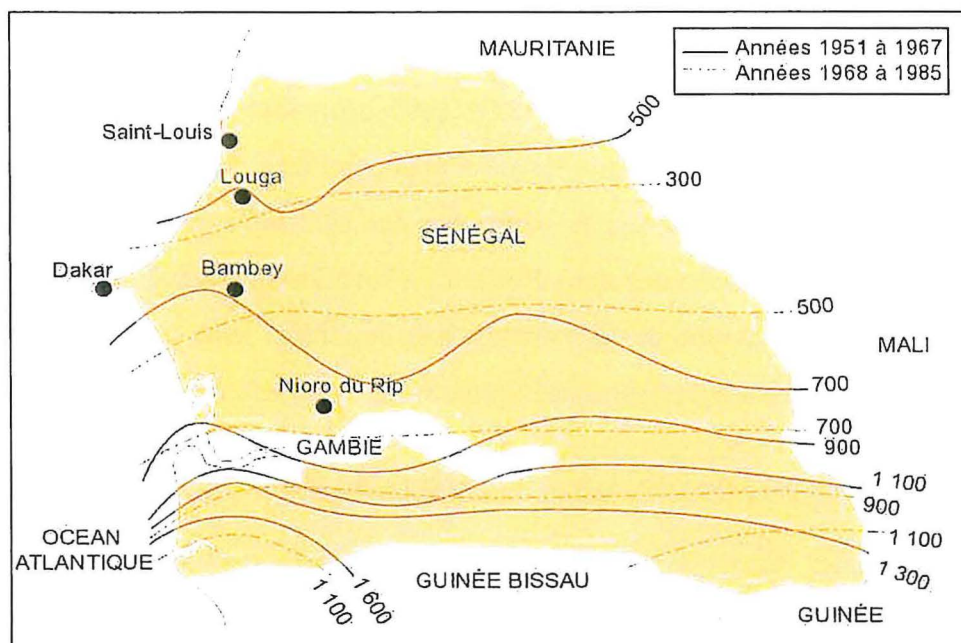
Ainsi, un certain nombre de travaux, réalisés principalement sur les céréales, (Turner *et al.*, 1982, 1997, 2001 ; Richard *et al.*, 1993, 1996 ; Ludlow et Muchow, 1990 ; Blum *et al.*, 1988) ont exploré l'utilisation plus ou moins combinée de ces deux approches pour la sélection. Ce chapitre analysera la pertinence des caractères proposés comme critère de sélection sur les légumineuses dans l'objectif d'améliorer le rendement en conditions de sécheresse. La présentation de cette analyse sera structurée selon le découpage proposé par Turner (2001) en «Drought Resistance Framework» et «Yield Component Framework».

1.2.1. Mécanismes de résistance et critères de sélection

Ces mécanismes décrits dans le «Drought Resistance Framework» sont les mêmes pour toutes les espèces végétales. Cependant la variabilité génétique qu'ils présentent est dépendante de l'espèce. Or, la question de la variabilité génétique est centrale pour un programme de sélection intraspécifique. Certains caractères comme le développement racinaire et la régulation stomatique ont une valeur adaptative universelle, d'autres comme l'accumulation d'ABA ou de proline (Madhusudhan *et al.*, 2002) paraissent présenter moins d'intérêt, d'autres encore comme l'ajustement osmotique semblent varier beaucoup moins chez les légumineuses que chez les céréales (Subbarao *et al.*, 1995). Les principaux caractères impliqués dans les trois grands mécanismes principaux de l'adaptation à la sécheresse, leur efficacité pour améliorer le rendement (« valeur ») et leur facilité d'utilisation pour la sélection des légumineuses sont résumés dans le tableau II. Les principales observations expérimentales ayant conduit à cette synthèse font l'objet des paragraphes qui suivent.

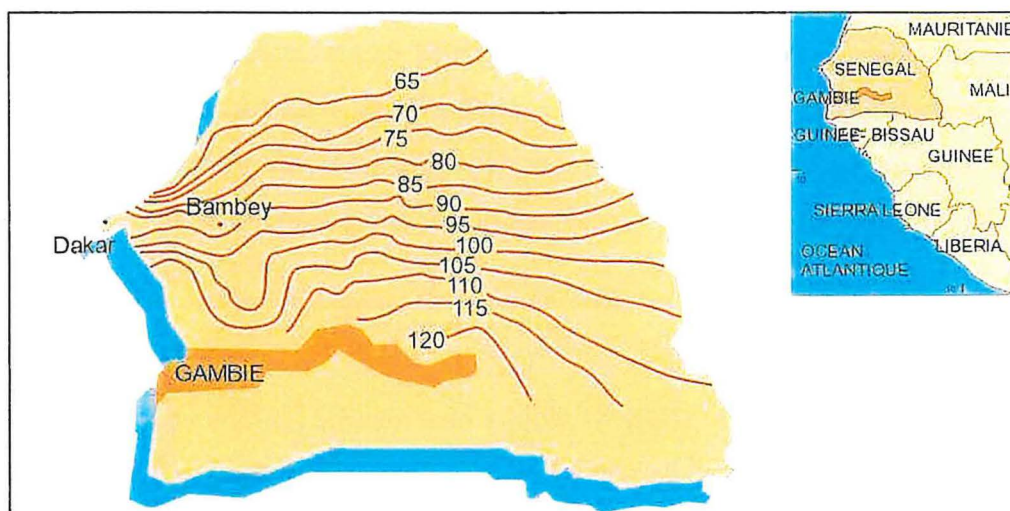
1.2.1.1. L'esquive

L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adéquation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies. La variabilité génétique pour la longueur de cycle est généralement importante dans les plantes et plus particulièrement chez les espèces à floraison indéterminée comme l'arachide. Le rendement de nombreuses variétés a été amélioré grâce au raccourcissement des longueurs de cycle (précocité) et ceci chez pratiquement toutes les espèces cultivées annuelles



Evolution des isohyètes moyens (millimètres) au Sénégal durant la période 1951-1985 (source : service de bioclimatologie de l'Isra).

Figure 4. Evolution des isohyètes moyens (mm) au Sénégal durant la période 1951-1985 (source : service de bioclimatologie de l'ISRA)



Calcul des durées de cycle (en jours) satisfait pour les variétés d'arachide du bassin arachidier au Sénégal.

Figure 5. Longueurs de cycles souhaitables (en jours) en fonction de la latitude pour les variétés d'arachide au Sénégal (d'après Khalfaoui, 1991b)

(Turner *et al.*, 2001), sur les légumineuses (Subbarao *et al.*, 1995), comme sur les céréales (Fukai et Cooper 1995 ; Fukai *et al.*, 1999 ; Siddique *et al.*, 1999).

Ce mécanisme est particulièrement efficace dans les environnements avec déficits hydriques fréquents en fin de cycle, schéma habituel dans les pays sahéliens. En effet, les sécheresses intervenues dans les années soixante-dix et quatre-vingt dans le Sahel ont entraîné un glissement des isohyètes vers le sud (Sikavumar, 1988, 1991 ; Khalfaoui, 1991a). La figure 4 en illustre les conséquences actuelles au Sénégal. L'arachide cultivée dans ces régions est affectée par une sécheresse qui correspond habituellement à la phase de remplissage des gousses (Annerose, 1988; Ndunguru *et al.*, 1995). Or, sur cette espèce, la réduction de rendement la plus importante a lieu lorsque la sécheresse intervient pendant cette phase (Nageswara Rao *et al.*, 1985). En outre, lorsque le stress intervient pendant le remplissage des gousses, il affecte particulièrement certains processus physiologiques et biochimiques conditionnant la qualité de l'arachide (Nautiyal *et al.*, 1991). Le développement de variétés d'arachide qui supportent mieux le déficit hydrique pendant la phase finale du développement des gousses est donc un objectif de recherche important pour ces zones (Khalifaoui 1991a ; Ndunguru *et al.*, 1995). Pour le Sénégal, le calcul des nouvelles longueurs de cycles souhaitables compte tenu de la nouvelle configuration climatique (Figure 5) a précédé la mise en place d'une stratégie de sélection basée sur la réduction de la longueur de cycle, (Khalifaoui, 1991a). Ces sélections ont permis d'améliorer très significativement les rendements de l'arachide pour les régions touchées par une réduction de la durée de l'hivernage (Clavel et Annerose 1997; Ndunguru *et al.*, 1995; Craufurd *et al.*, 2000). Cependant les sélections de variétés à cycles courts ne permettent pas toujours d'améliorer les rendements dans le cas où le déficit hydrique a lieu aussi en cours de cycle (Khalifaoui 1985). Par ailleurs, la réduction de la variabilité entraînant une réduction de la plasticité phénologique, elle est considérée comme une stratégie risquée dans le cas des légumineuses à floraison et à croissance déterminée (Turner *et al.*, 2001). Ainsi, on recherche aujourd'hui des variétés bien adaptées au niveau phénologique mais capables également de mettre en œuvre des mécanismes d'évitement et de tolérance.

1.2.1.2. L'évitement

Trois grands types de réponses permettent à la plante d'éviter ou, plus exactement, de retarder la déshydratation de ses tissus (Turner *et al.*, 2001). Ce mécanisme est appelé

évitement, en anglais « avoidance » ou parfois « dehydration post-ponement ». Le premier groupe de caractères est lié à l'efficacité de l'extraction de l'eau du sol par les racines. L'aptitude des racines à exploiter les réserves en eau du sol sous stress est une réponse particulièrement efficace pour l'élaboration à la production de graines (Passioura *et al.*, 1977). Le deuxième type de réponse est constitué par la régulation de l'ouverture-fermeture des stomates conditionne les échanges entre CO₂ et H₂O et par conséquent la croissance et la productivité des cultures (Ludlow et Muchow, 1990 ; Turner *et al.*, 1997). Le troisième correspond à l'ajustement osmotique que les plantes réalisent en réponse au déficit hydrique (Turner, 1986b). Lorsque le potentiel hydrique foliaire décroît, le potentiel de turgescence et la conductance stomatique sont maintenus grâce à une accumulation intracellulaire de solutés permis par ce mécanisme. La pertinence des caractères correspondant à ces réponses pour la sélection sera discutée pour chacun des trois formes d'évitement définies.

La capacité d'extraction de l'eau par le système racinaire

Un système racinaire capable d'extraire l'eau du sol est un trait essentiel pour la résistance à la sécheresse. Cette caractéristique revêt une importance particulière sur les cultures qui subissent régulièrement des déficits hydriques de fin de cycle (Khalfaoui, 1990a ; Subbarao *et al.*, 1995). Son impact sur le rendement est particulièrement élevé car elle intervient directement dans l'efficacité de l'utilisation de l'eau en conditions de stress, un des trois termes de l'équation de Passioura (1977). La majorité des résultats reportés montre une corrélation positive entre la profondeur d'enracinement et le rendement en grain notamment sur l'arachide (Ketring, 1984 ; Wright *et al.*, 1991).

Cependant deux types de raisons limitent beaucoup l'utilisation des critères racinaires par les sélectionneurs (Turner *et al.*, 2001). L'impraticabilité du criblage au champ pour cette caractéristique sur une grande échelle et la difficulté de corréler des observations au champ à celles qui sont faites en pots. L'absence d'une compréhension précise du rôle exact des racines en conditions de ressources hydriques limitées (Passioura, 1994) est un autre facteur limitant à la mise en place d'un système de criblage économe et efficace.

Quelques exceptions, notamment au Sénégal (Khalfaoui et Havard, 1993) ont été fournies dans le cas très spécifique des sols très sableux et de texture homogène de la surface jusqu'en profondeur, sur lesquels poussent les arachides dans cette région. Dans ce cas, en effet, une bonne corrélation entre les mesures d'elongation racinaire en rhizotrons et celles

réalisées au champ grâce à un dispositif d'injection d'herbicide en profondeur, a été trouvé. D'autres techniques utilisant la mesure de la force d'extraction de l'eau à l'aide de tensiomètres ou de la fluidité de la sève ont été suggérées (Mia *et al.*, 1996 ; Subbarao *et al.*, 1995) mais jamais utilisées en sélection.

La régulation stomatique

Située à l'interface entre l'intérieur (plus ou moins turgescent) et l'extérieur (plus ou moins sec) des tissus foliaires, les stomates jouent un rôle fondamental dans la régulation des pertes en eau de l'appareil foliaire. La régulation de l'ouverture-fermeture des stomates dépend du potentiel hydrique foliaire et de l'humidité de l'air au champ (Turner, 1997). Une faible conductance conduit à une fermeture des stomates rapide en conditions de déficit hydrique. Les génotypes à faible conductance sont plus sensibles au déficit de vapeur et à la baisse du potentiel hydrique foliaire que les génotypes à forte conductance. Une faible conductance est généralement proposée comme un trait favorable à l'adaptation à la sécheresse (Jones, 1979, 1980, 1987; Turner 1979, 1982, 1986 a, b, cités par Muchow et Ludlow, 1990). Cependant la fermeture stomatique réduit l'assimilation du CO₂ et inévitablement conduit à une réduction de l'activité photosynthétique. En conséquence l'intérêt d'une réponse stomatique plus ou moins rapide au déficit hydrique résulte d'un compromis entre la réduction de l'assimilation du CO₂ et la nécessité d'éviter la déshydratation (Ludlow et Muchow, 1990).

Des différences intervariétales existent chez les légumineuses. Elles ont notamment été montrées sur le niébé (Ogbonnaya *et al.*, 2003) et l'arachide (Bennett *et al.*, 1984 ; Nautiyal *et al.*, 1995). La mesure de la conductance stomatique et de la transpiration par porométrie exige une homogénéité parfaite des conditions environnementales incompatible avec les mesures sur un grand nombre de génotypes au champ. L'évaluation des réponses des stomates par porométrie n'est donc généralement pas retenue par les sélectionneurs pour le criblage de génotypes (Leport *et al.*, 1999, Turner *et al.*, 2001 ; Clavel *et al.*, 2004). L'élévation de température résultant de la fermeture des stomates peut être appréciée sur un grand nombre de lignées au champ par télé thermométrie en utilisant un thermomètre à infrarouge. Mais là encore, la validité des mesures est soumise à l'homogénéité des conditions environnementales, notamment la présence de vent et la densité du couvert, difficile à obtenir en conditions de déficit hydrique (Turner *et al.*, 2001).

Sur les céréales, la fermeture des stomates est contrôlée par un signal hormonal, l'acide abscissique ou ABA en réponse à l'assèchement du sol (Davies *et al.*, 1994). Mais les sélections réalisées sur l'accumulation de l'ABA dans les céréales n'ont pas conduit à une amélioration du rendement (Quarrie *et al.*, 1995). Chez les légumineuses, les travaux publiés sur l'intervention de l'ABA ne concerne que le lupin (Gallardo *et al.*, 1994). Sur l'arachide, il semble que le potentiel hydrique et la fermeture stomatique soit en liaison directe (Bennett *et al.*, 1984 ; Clavel *et al.*, sous presse).

L'ajustement osmotique

Ce mécanisme permet de maintenir la conductance stomatique et la photosynthèse à des potentiels hydriques bas, il intervient aussi en retardant la sénescence foliaire et en améliorant l'extraction de l'eau par les racines (Turner et Jones, 1980 ; Ludlow, 1980, 1987, Morgan et Codon, 1986, cités par Turner *et al.*, 1997, 2001). Le niveau d'ajustement osmotique réalisé par les légumineuses est modeste comparé à celui des céréales (Subbarao *et al.*, 1995). La variabilité génétique présente a été utilisée pour sélectionner des lignées de blé et de sorgho (Morgan et Condom, 1986 ; Ludlow et Muchow, 1990). Ce n'est pas le cas chez les légumineuses bien qu'il semble y avoir une variation relativement importante chez l'arachide (Ketring, 1986). Cette variabilité n'a pas été retrouvée dans la gamme des variétés à phénologie relativement comparables cultivées au Sénégal (Annerose, 1988; Clavel et Annerose, 1995). C'est une limitation majeure pour la prise en compte de ce caractère pour la sélection des légumineuses.

1.2.1.3. La tolérance

Stabilité des membranaires cellulaires

En réaction à une limitation hydrique, la plante limite l'extension de son feuillage, accroît la profondeur de son enracinement. Une fermeture plus ou moins précoce des stomates s'opère afin de réduire les pertes en eau de la plante par transpiration. Cette régulation stomatique conditionne le statut hydrique des feuilles qui restent turgescentes si les stomates se ferment très vite. Le mécanisme de tolérance des membranes cellulaires s'exprime lorsque ces dispositifs périphériques de protection des cellules ne sont plus efficaces. Le caractère de tolérance *sensu stricto* le plus connu est la résistance membranaire ou résistance protoplasmique. Elle est le plus souvent mesurée par la méthode des efflux d'électrolytes après choc osmotique au PEG (Blum et Ebercom, 1981 ;

Turner *et al.*, 2001). La tolérance membranaire s'exprime à un niveau particulièrement important chez les plantes dites de résurrection qui peuvent reconstituer leurs membranes après des périodes de plusieurs semaines de déshydratation (Gaff, 1980).

Sur les céréales l'existence d'une relation entre dégâts membranaires semble dépendre des génotypes utilisés. Non montrée initialement sur blé (Blum, 1988), elle a été observée sur les réponses de croissance et la productivité au champ de variétés de blé dur (Bajji, 2002). L'hypothèse que les plantes résistantes à la sécheresse au niveau cellulaire sont souvent capables de garder leurs stomates ouverts et donc un fort potentiel d'assimilation du CO₂ lors de sévères déficits hydriques a été émise lors d'une étude portant sur *Phaseolus vulgaris* (Costa França *et al.*, 2000). On a aussi montré, sur le blé dur, que l'indice de dommage membranaire était corrélé non seulement à la croissance des plantules mais aussi à la performance des plantes au champ (Bajji *et al.*, 2002). Les mêmes observations ont été réalisées sur le blé tendre (Dhanda et Sethi, 2002) mais dans cette étude les variétés présentant la stabilité membranaire la plus élevée et la meilleure production en grain étaient celles qui montraient un statut hydrique élevé.

Une variabilité génétique importante de ce caractère existe chez les légumineuses notamment chez le pois chiche, le soja et l'arachide (Srinivasan *et al.*, 1996). La forte capacité de tolérance de l'arachide a été soulignée (Nautiyal *et al.*, 1995 ; Marone et Annerose, 1995) ainsi que le fait qu'un des mécanismes majeurs mis en jeu était probablement le maintien de l'intégrité membranaire (Annerose, 1988; Clavel *et al.*, sous presse). La détermination de la résistance protoplasmique à différents stades de développement de l'arachide a permis d'observer qu'elle s'était accrue avec l'âge des feuilles mais que les classements variétaux n'ont pas été changés (Annerose, 1990). Cette observation offre l'opportunité d'effectuer des criblages efficaces au stade jeune (Clavel *et al.*, sous presse).

Au niveau moléculaire, un ralentissement du métabolisme protéique et une augmentation du catabolisme des protéines cellulaires en réponse à la contrainte hydrique ont été observés (Vasquez-Tello *et al.*, 1990) sur *Vigna unguiculata* (niébé). Sur arachide, une relation entre le niveau de tolérance membranaire de différents cultivars et le niveau d'acyl-lipide des membranes a été mise en évidence (Lauriano *et al.*, 2000). Certaines enzymes hydrolytiques impliquées dans la réponse des plantes à la sécheresse ont été précisées. Il s'agit d'acylhydrolases (Sahsah *et al.*, 1998 ; Matos *et al.*, 2001), d'une

Tableau III. Potentiels hydriques létaux pour une gamme de légumineuses (d'après Turner *et al.*, 2001)

Espèces	Potentiels hydriques létaux	Références
Niébé	-1,8 MPa	Shakel et Hall (1883) Sinclair et Ludlow (1986)
Mungbean (<i>Vigna radiata</i>)	-1,9 MPa	Sinclair et Ludlow (1986) Flower et Ludlow (1987)
Soja	-5,0 MPa	Sinclair et Ludlow (1986) Flower et Ludlow (1987)
Arachide	-3,4 à -8,2 MPa	Flower et Ludlow (1986, 1987)

ascorbate peroxydase (Ferrari-Iliou *et al.*, 1996), d'endoprotéases (Roy-Macauley *et al.*, 1992; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001) et de phospholipases (El Maarouf *et al.*, 1999). Roy-Macauley *et al.* (1992) ont montré qu'il existe une relation entre le déficit hydrique, le degré de sensibilité de la plante et les activités endoprotéolytiques chez les cultivars de *V. unguiculata* testés. La caractérisation de la nature des endoprotéases impliquées a permis de montrer que l'expression du gène de l'aspartyl protéase en conditions de déficit hydrique était plus faible chez les cultivars de niébé tolérants que chez les sensibles (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats a permis d'émettre une explication fonctionnelle de la tolérance membranaire sur le niébé (*Vigna Unguiculata* L.), fabacée tropicale comme l'arachide. Il apparaît donc que plus les plantes sont sensibles, plus les enzymes dégradatives sont efficaces, ce qui conduit à une destruction des membranes photosynthétiques. Il s'ensuit un manque de photosynthats et une réduction de la croissance et du rendement. La plante s'autodétruit de façon plus ou moins régulée *via* diverses hydrolases pour mieux survivre au stress. Cette hypothèse est renforcée par de récents résultats sur la tolérance au stress de l'appareil photosynthétique obtenus grâce à l'utilisation de la fluorimétrie. En effet, la fluorescence chlorophyllienne émise par une feuille soumise à un stress environnemental est étroitement liée à l'intégrité et à l'efficacité du photosystème II (PSII) lui-même situé sur les membranes thylacoidales (Maxwell et Johnson, 2000 ; Colom et Vazzana, 2003). Il semble en outre que cette mesure soit très sensible aux différences entre génotypes et corrélée aux rendements obtenus (Rizza *et al.*, 2001 ; Glyn et Colin, 2002).

Potentiel hydrique létal

Selon Sinclair et Ludlow (1988), la valeur du potentiel hydrique que peut atteindre la dernière feuille viable (capable de reprendre après réhydratation de la plante) représente une mesure clef de la capacité de tolérance d'une plante. Cette valeur varie selon les espèces. Si l'on se réfère au tableau III, l'arachide peut être considérée comme la légumineuse de grande culture la plus tolérante à la sécheresse. Certaines observations ont conclu que la tolérance à la déshydratation était liée à la capacité d'ajustement osmotique (Flower et Ludlow, 1987) mais des études de QTL ont suggéré que d'autres facteurs que l'ajustement osmotique étaient associés dans la tolérance (Lilley *et al.*, 1996). Compte tenu de la relativement faible capacité d'ajustement osmotique de l'arachide, il est possible que les niveaux de tolérance membranaire et la faible valeur du potentiel hydrique létal soit

liés. Peu de sélections ont fait appel à ce critère. Certaines études ont considéré le taux de survie de jeunes plantules mais les résultats obtenus n'étaient pas reliés à la survie des plantes à des stades plus tardifs ni à la production (Turner *et al.*, 2001).

1.2.2. Amélioration du rendement en condition de sécheresse

Cette approche relevant du «Yield-Component-Framework» propose un modèle qui intégrerait en composantes du rendement les mécanismes de réponse à la sécheresse précédemment décrits. Le modèle de base est fourni par l'équation (3) présenté en introduction de ce chapitre (1.2). L'objectif recherché est d'améliorer le rendement en conditions de déficit hydrique. Les deux principaux intérêts de cette méthode sont d'une part qu'une analyse en composantes fonctionnelles intégratives permettra de mieux comprendre les raisons des performances génotypiques sous stress (Turner *et al.*, 2001) et d'autre part qu'une sélection réalisée sur une réponse au déficit hydrique au niveau de la plante entière est plus efficace sur le rendement qu'une sélection portant sur un caractère simple plus difficile à relier à la production (Bidinger et Witcombe, 1989 ; Turner *et al.*, 2001). Cette approche permettrait de contourner les difficultés pratiques pour la mesure de certains caractères comme le système racinaire et la conductance stomatique sur de nombreux génotypes en utilisant des critères de substitution (« surrogates »), liés à ces caractères et utilisables en sélection. Cependant l'existence de relations négatives entre les composantes fonctionnelles et les limitations des mesures de substitutions peuvent entraîner des échecs en termes d'amélioration de la production.

1.2.2.1. Associations négatives entre les composantes physiologiques

Dans de nombreuses situations, le TE et HI de l'équation (3) que nous rappelons ici :

$$Y = T \times TE \times HI \quad (3)$$

sont négativement corrélés. Un exemple est donné par l'arachide chez laquelle TE et HI sont liés *via* TDM (Total Dry Matter) qui représente la biomasse totale (Nageswara Rao *et al.*, 1993). La part du poids des fanes dans TDM peut être élevée, ce qui entraîne un HI bas. Or, chez certaines variétés c'est une forte production de fanes qui affaiblit le HI alors que chez d'autres un HI élevé peut être dû à une faible proportion de fanes non associée à une forte production de gousses. Si on ne tenait compte que des composantes de l'équation (3), les lignées du premier type seraient écartées. Il est donc important de sélectionner en vue d'un HI élevé mais à condition que TDM soit constant. Des analyses dynamiques en termes

de taux de croissance journalier (C) et répartition de la matière sèche entre les grainés et les feuilles (partitioning coefficient, p) en tenant compte de la durée du cycle ont fait ressortir que les causes des variations de rendement chez l'arachide et le niébé étaient différentes : il semble que les arachides les mieux adaptées à la sécheresse aient un p élevé et un C plutôt faible (Greenberg *et al.*, 1992) alors que pour le niébé c'est un C élevé qui conditionne la production en condition de sécheresse (Williams et Saxena, 1991). Les explications physiologiques à ces différences sont inconnues (Turner *et al.*, 2001) mais l'existence de stratégies d'adaptation différentes sur deux fabacées tropicales témoignent de la variété des réponses adaptatives dans l'élaboration du rendement. L'origine en partie physiologique de ces corrélations négatives peut être expliquée. En effet si TE est apprécié en matière sèche produite par unité d'eau transpirée, la théorie prédit un accroissement de TE lorsque les stomates se ferment car le rôle premier de la fermeture des stomates est de limiter la transpiration. Cependant, dans les conditions de champ, l'augmentation de température due à la fermeture des stomates limite l'assimilation du CO₂ soit directement (Ludlow et Muchow, 1990) soit indirectement par les dégâts occasionnés au niveau des centres réactionnels (photosystèmes) de la photosynthèse (Colom et Vazzana, 2003). Par conséquent, du fait de ces échanges CO₂/H₂O au niveau des stomates, une faible conductance possède un coût physiologique sur la production en terme d'efficacité photosynthétique. Il s'ensuit donc que si l'amélioration de TE ou WUE est obtenue par une fermeture précoce des stomates, les conséquences peuvent être négatives sur l'élaboration du rendement (Ludlow et Muchow, 1990). Cela semble être le cas sur l'arachide, chez laquelle une transpiration et conductance stomatique élevées ont été observées sur les variétés les plus productives en conditions de sécheresse (Gautreau, 1977 ; Clavel *et al.*, 2004) alors que de telles observations n'ont jamais été réalisées sur le niébé.

1.2.2.2. Utilisation de mesures de substitution

Il est à l'heure actuelle quasiment impossible d'estimer et d'intégrer sur la durée d'un cycle les mesure de T et TE dans un programme de sélection. On cherche donc une estimation du TE de l'équation (3) par des mesures de discrimination isotopique du carbone (Δ) représentant le ratio de la pression interne et externe du CO₂ (Farquhar et Richard, 1984). Une corrélation négative a été observée entre TE et Δ (Hall *et al.*, 1993 ; Subbarao *et al.*, 1995 ; Turner *et al.*, 2001), on considère donc que les plantes présentant une faible Δ possèdent un fort TE (Withe, 1993 ; Wright *et al.*, 1994 ; Matus *et al.*, 1995). Cependant

Δ n'est pas directement et négativement corrélée au rendement au contraire, de nombreuses études ont montré une corrélation positive (Acevedo, 1993; Withe., 1993 ; Matus *et al.*, 1995). Les mesures de TE et T de l'équation (3) étant inversement liées, la sélection indirecte pour TE *via* Δ n'a pas réussi jusqu'à présent du fait de l'existence de ces liaisons complexes dont la nature, physiologique ou génétique, est inconnue (Turner *et al.*, 2001). L'hypothèse de la nature génétique des relations mises en évidence est actuellement testée dans un programme de sélection de l'arachide et du haricot, en Australie (Turner *et al.*, 2001 ; Wright *et al.*, 1998). Les résultats actuels montrent que la liaison négative entre TE et T semble avoir été rompue par la sélection pratiquée sur un certain nombre de génotypes. Cependant, lors des évaluations en essais multilocaux, les nouvelles lignées d'arachide développées en utilisant les composantes du modèle n'ont pas présenté de rendements améliorés par rapport à celles qui avaient été sélectionnées sur le rendement directement (Dovkiw, communication personnelle). La recherche conduite actuellement en Australie vise à connaître les raisons de cette absence de différences qui pourraient être de nature technique (manque d'efficacité du Δ pour traduire TE) ou physiologique (rupture de la liaison entre TE et T très difficile).

1.3. Les mécanismes moléculaires de la réponse à la contrainte hydrique

Ce chapitre concerne les résultats saillants récemment obtenus dans ce domaine toutes espèces confondues. Sur l'arachide, les biotechnologies, encore peu développées, font l'objet d'un chapitre à part (1.4.). Comme les réponses adaptatives des plantes, les gènes induits par la sécheresse sont très variés et leur activation se révèle très complexe. Quelques applications des résultats de ces recherches dans les biotechnologies végétales (choix d'un gène candidat et transgénèse) viennent d'être réalisées. Cependant elles ne concernent pas pour le moment le domaine agronomique c'est-à-dire la diffusion d'un cultivar transgénique à la fois productif et résistant à la sécheresse.

1.3.1. Variété des fonctions des gènes induits par le stress osmotique

Ces dernières années, un nombre important de gènes a été décrit comme répondant à la sécheresse au niveau transcriptionnel (Bray, 1997 ; Ingram et Bartels, 1996 ; Yamaguchi-Shinosaki *et al.*, 2002). Les produits de ces gènes interviennent non seulement dans la

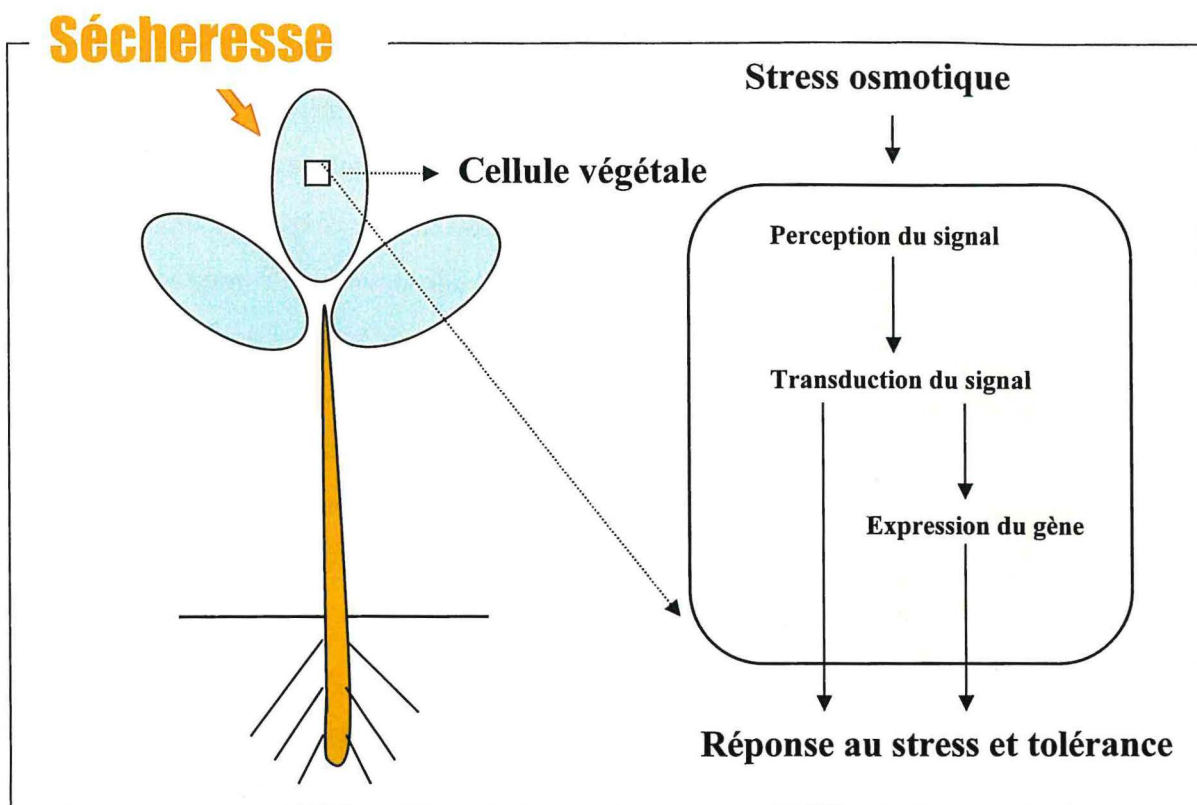


Figure 6. Représentation schématique des réponses moléculaires à la sécheresse dans une cellule végétale (d'après Yamaguchi-Shinozaki, 2002)

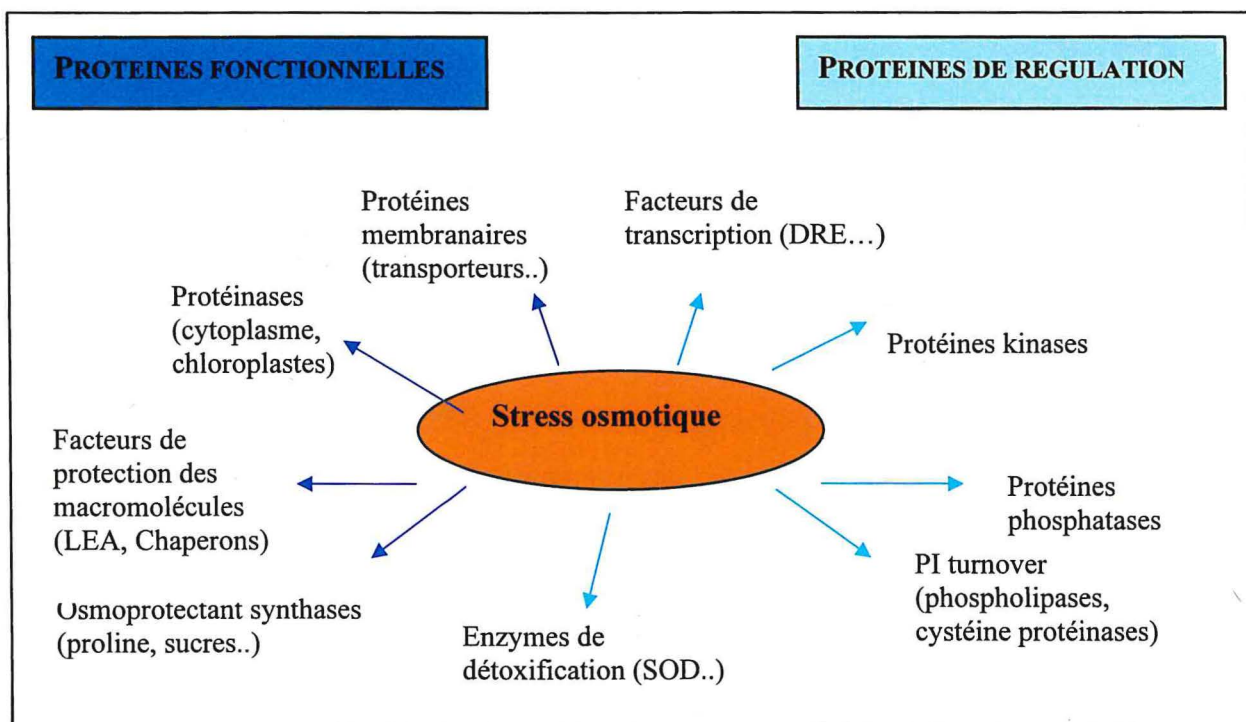


Figure 7. Gènes induits par le stress et leur fonction possible dans la réponse à la tolérance au stress osmotique (d'après Yamaguchi-Shinozaki, 2002)

tolérance au stress mais aussi dans la régulation de l'expression des gènes et dans la transduction des signaux de la réponse au stress (Yamaguchi-Shinozaki, *et al.*, 2002) (Figure 6). Ces produits de gènes induits par la sécheresse, ou, plus généralement, par le stress osmotique (stress hydrique, salin et du au froid) peuvent être classés en deux groupes : les protéines fonctionnelles et les protéines de régulation (Figure 7). La première étape de l'activation de ces gènes correspond à la perception du signal émis lors de la déshydratation, elle est suivie par une cascade de messagers secondaires qui modifient la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (Figure 8). Différents récepteurs ou senseurs non spécifiques répondent à différentes contraintes abiotiques. Ils induisent tous une augmentation du Ca^{2+} dans le cytoplasme, la production d'antioxydants (Knight *et al.*, 2000) et une série de phosphorylations qui activent des protéines impliquées dans la protection cellulaire ou leurs facteurs de transcription. Par exemple, les voies d'activation des gènes codant pour des protéines de type LEA (« Late Embryogenesis Abundant ») ont été trouvées sur certaines plantes très résistantes en réponse au stress hydrique (Ingram et Bartels, 1996 ; Thomashow, 1998). L'activation des LEA pourrait représenter les voies de réparation des dommages (Xiong et Zhu, 2002). La contrainte osmotique induit en particulier des changements dans la composition en phospholipides précurseurs de la production de messagers secondaires via les phospholipases (Figure 8). La phospholipase D (PLD) par exemple est activée par la sécheresse (El Maarouf *et al.*, 1999). Elle est impliquée dans une cascade de signaux conduisant à la fermeture des stomates (Jacob *et al.*, 1999). L'existence de cette très grande variété de gènes induits par le stress osmotique suggère des réponses complexes au niveau de la plante (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002).

1.3.2. Activation transcriptionnelle des gènes

De la même manière que les fonctions des gènes impliqués dans la réponse au stress sont très variées, l'activation de ces gènes est sous la dépendance de nombreux facteurs. L'acide abscissique (ABA) est produit sous l'influence du stress hydrique et son implication dans la modulation de la teneur en ARNm correspondant à nombreux gènes a été démontrée (Bray, 1993 ; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Les voies d'activation des gènes induits par la contrainte osmotique sont soit dépendantes soit indépendantes de l'ABA (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Les gènes induits par l'ABA sont souvent des protéines de type LEA ou déhydrine mais peuvent être aussi des gènes impliqués dans la

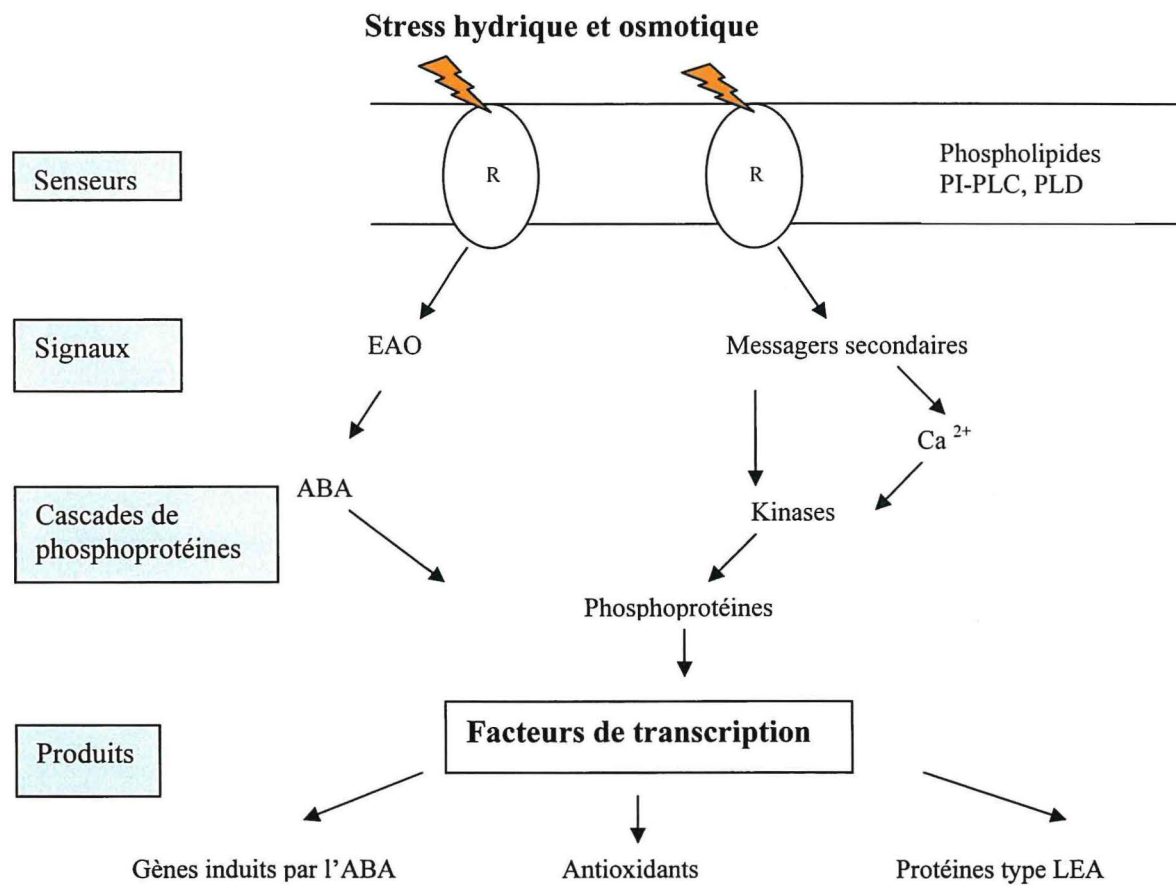


Figure 8. Représentation schématique des principales voies de signalisation majeures et principaux produits de transcription chez les plantes en réponse au stress osmotique.

R : récepteurs, EAO : espèces activées de l'oxygène, PI-PLC : phospholipase C, PLD : phospholipase D, ABA : acide abscissique, LEA : « Late Embryogenesis Abundant », (d'après Diop, 2002)

synthèse des osmolytes, la perméabilité membranaire, le catabolisme ou la réparation cellulaire (Figure 8). L'expression de tous les gènes de type LEA est régulée de façon transcriptionnelle et sous le contrôle de l'ABA (Wang *et al.*, 2003). L'induction des gènes non gouvernés par l'ABA est modulée par des facteurs de transcription dont les séquences, les plus connues sont de type DRE («Dehydration Responsive Element»). Ces séquences ont été caractérisées et sont activées par le stress osmotique (Liu *et al.*, 1998). La surexpression des gènes codant pour des protéines de régulation de type DRE augmente la tolérance des plantes transgéniques correspondantes au froid, au sel et au déficit hydrique (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki 2000 ; Thomashow, 2001 ; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002). La régulation de ces gènes par certaines enzymes fortement impliquées dans le «turnover» des protéines comme la cystéine protéinase est donc importante pour la tolérance aux contraintes. Cependant l'utilisation de ces gènes pour la transformation doit être considérée avec prudence étant donné que de nombreux métabolites sont produits par la plante en conditions de stress et que des modifications sont possibles au niveau post-transcriptionnel et de la traduction (Wang *et al.*, 2003).

1.3.3. Lipides membranaires et contrainte hydrique

La tolérance des membranes cellulaires face à la contrainte hydrique est l'un des mécanismes de résistance à la sécheresse les plus efficaces chez les plantes. Il a été mis en relation avec la performance au champ des génotypes sur différentes espèces végétales notamment sur des légumineuses (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Costa França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Dhanda and Sethi, 2002) et sur l'arachide (Clavel *et al.*, sous presse).

La destruction des membranes cellulaires est reflétée dans leur composition lipidique. Ainsi la contrainte hydrique induit une diminution de la teneur en phospholipides et du degré d'insaturation des acides gras, ce qui provoque une augmentation des acides gras saturés de type C16:0 et C18:0 et une « rigidification » des membranes cellulaires qui deviennent fragiles. Certaines enzymes impliquées dans la dégradation des phospholipides ont été identifiées. Ainsi les PLD représentent les principales enzymes responsables de la dégradation des phospholipides membranaires (Sahsah *et al.*, 1998). Cette activation de la PLD est réalisée indépendamment de l'ABA (Frank *et al.*, 2000). La quantification de la protéine correspondant à l'une d'entre-elle a été réalisée (El Maarouf *et al.*, 1999). Cette étude a montré que la contrainte hydrique induit la surexpression d'un gène de PLD et que les génotypes les plus tolérants possèdent la capacité de réprimer l'activation du gène en

condition de stress. D'autres enzymes lipolytiques sont impliquées dans la réponse à la contrainte hydrique comme la phospholipase C (PLC) qui génère deux messagers, le diacylglycerol et l'inositol, qui présentent plusieurs isoformes (Yamamoto *et al.*, 1995 ; El Maarouf *et al.*, 2001). Le déficit hydrique sévère induit également une diminution du contenu en lipides polaires (Pham Thi *et al.*, 1990). Dans les feuilles, les galactolipides sont majoritairement impliqués dans cette réponse (Ferrari-Iliou *et al.*, 1984). L'une d'entre-elle, homologue de la patatine, a été induite par le stress hydrique chez le niébé et son expression augmente en fonction de l'intensité du stress et du degré de résistance à la sécheresse (Matos *et al.*, 2001).

1.3.4. Endoprotéases et contrainte hydrique

Les protéases (ou protéinases) de plantes interviennent aux différentes étapes de la vie de la plante comme la germination, le développement et la sénescence. Elles sont regroupées en cystéine, serine, metallo et aspartyl-protéinases en fonction de l'acide aminé occupant le site actif (Barrett, 1986).

Les endoprotéases entrent en jeu dans de nombreux événements comme la dégradation des protéines anormales, la mort cellulaire programmée (MCP), le turnover des protéines, la dégradation des protéines de stockage des graines et la sénescence. La dégradation des protéines anormales participe à l'adaptation des plantes en conditions de contrainte environnementale (Estelle, 2001). La plupart des activités protéolytiques observées *in vitro* dans les extraits végétaux sont des protéases vacuolaires. Cependant les activités protéolytiques ont été mises en évidence dans les chloroplastes (Roy-Macauley *et al.*, 1992). L'activité totale des protéases augmente durant la croissance de la plante et est activée par la contrainte hydrique, en particulier celle de l'aspartic protéinase (Roy-Macauley *et al.*, 1992 ; Cruz de Carvalho *et al.*, 2001). Cet accroissement de l'activité protéolytique sous la contrainte, est plus forte chez les espèces sensibles comme le haricot que chez le niébé, plus résistant (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001). La MCP, appelée apoptose dans le cas des cellules animales, correspond à un mécanisme fondamental de la différenciation cellulaire par désintégration programmée de cellules particulières. Chez les plantes, les cystéines protéinases, protéases les plus connues, ont été principalement étudiées pour leur rôle important dans la réponse à l'attaque de pathogènes. Généralement, une synthèse d'inhibiteurs de protéases se produit de façon systémique suite à un stress biotique (Brown et Ryan, 1984). La blessure ou l'attaque est suivie par l'émission d'une

cascade de signaux qui conduit à la production d'acide jasmonique (Li *et al.*, 2002) qui induisent à leur tour la production d'inhibiteurs de protéases (Ryan et Moura, 2002). Les cystéines protéinases constituent aussi les enzymes-clés de régulation de l'apoptose chez les animaux (Martins, 1997). Dans le monde végétal, leur implication dans la MCP a été mise en évidence dans des suspensions cellulaires de tabac (Tian *et al.*, 2000) et d'orge (Khortout *et al.*, 2000). Les cystéines protéinases sont également activées dans le processus de dégradation des protéines de stockage durant la maturation. Elles ont été décrites chez différentes espèces végétales comme l'orge (Martilla *et al.*, 1995), le maïs (Mitsubishi et Oaks, 1994) ou le riz (Watnabe *et al.*, 1991). L'activité de ces enzymes est continue mais faible durant la vie végétale mais elles sont très impliquées dans le processus de sénescence. Une protéolyse accrue caractérise la sénescence génétiquement programmée des feuilles (Kumar et Knowles, 1996). Au cours de cette phase, l'assimilation du carbone est remplacée par le catabolisme de la chlorophylle et des macromolécules dont les produits sont recyclés (Gan et Amasino, 1997). Le rôle des cystéines protéinases dans la dégradation des polypeptides foliaires endommagés sous l'effet de la contrainte (Forsthoefel *et al.*, 1998) a été très étudié. Les transcrits de certaines cystéines protéinases s'accumulent en réponse à la contrainte hydrique (Koizumi *et al.*, 1993 ; Williams *et al.*, 1994) et à l'ABA (Forsthoefel *et al.*, 1998). Le contrôle de l'activité protéolytique en cas de contrainte pourrait permettre de différer la sénescence. Ce contrôle passe notamment par le blocage de l'activité des cystéines protéinases par leur inhibiteur naturel, les cystatines (Diop *et al.*, sous presse). L'accumulation des transcrits de cystatines a été observée en réponse au froid et à la salinité chez le riz (Pillai *et al.*, 2001) et le blé (Gaddour *et al.*, 2001).

1.4. Les biotechnologies sur l'arachide

Les réponses moléculaires des plantes à la sécheresse ont été présentées sur un plan général au chapitre précédent (1.3). Les travaux en biologie moléculaire sur arachide étant peu nombreux, le présent chapitre détaille les recherches en biotechnologie sur l'arachide y compris ceux qui ne relèvent pas de la réponse au stress hydrique. Les principaux résultats concernent la régénération de la plante, étape indispensable de la transformation génétique (transgénèse). Ils ont été principalement réalisés aux Etats Unis par le département d'horticulture de l'Université de Georgie. D'autres équipes travaillent dans ce domaine,

notamment au département de botanique de l'Université de Caroline du Nord (USA), à l'Institut de Biologie de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro (Brésil) et à l'Icrisat¹ (Hyderabad, Inde).

La synténie avec la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, est largement utilisée pour faire progresser les recherches dans ce domaine pour les monocotylédones. Depuis de nombreuses années, le riz s'est imposé à côté de *A. thaliana* comme plante modèle pour les céréales alors que les légumineuses (Fabacées) ne possède pas encore de plante de référence pour la génomique. Pourtant elles représentent un des taxons végétaux les plus importants tant du point de vue de la biologie et de l'écologie fondamentales que du point de vue agronomique et environnemental (Thoquet *et al.*, 2002). *Medicago truncatula*, légumineuse tempérée diploïde, semble faire l'objet d'un consensus pour jouer ce rôle chez les légumineuses. Cependant plusieurs travaux de génomique comparative en cours montreraient que le degré de la synténie entre *A. thaliana* et *M. truncatula* est faible (Thoquet *et al.*, 2002). Le niébé ou le pois chiche ont également été proposés pour ce rôle de légume modèle en ce qui concerne la réponse à la sécheresse (Ortiz *et al.*, 2002).

1.4.1. Marquage du génome et cartes génétiques

Le marquage moléculaire de l'ADN a pour objectif de cartographier et de localiser les gènes en relation avec les caractères phénotypiques d'intérêt. C'est l'outil de base du génotypage.

Le marquage de l'ADN ne concerne que des fragments chromosomiques importants sur arachide (Subramanian *et al.*, 2001). Or, pour que la sélection assistée par marqueurs (SAM) soit praticable le génome doit être saturé avec des marqueurs uniformément espacés. De plus, l'établissement de liaisons fortes entre marqueur et caractère – inversement quantifiée par un déséquilibre de liaison faible – en garantie l'efficacité (Gallais, 1995 ; Stuber *et al.*, 1999). Or, alors que sa diversité morphologique est importante (voir chapitre 1.1.7), l'arachide répond mal aux techniques de marquage de l'ADN (Halward *et al.*, 1993 ; Stalker, 1997 ; Herselman 2003) et le polymorphisme détecté par l'utilisation de marqueurs à l'intérieur de cultivars génétiquement proches est faible (Herselman, 2003; Fergusson *et al.*, 2004). Ce faible polymorphisme moléculaire est attribué à une polyploïdisation récente des génomes A et B (diploïdes) à l'origine de

¹ International Crop Institute for the Semi-Arid Tropics

l'espèce cultivée tétraploïde (Bagwat *et al.*, 2001) et au fait que les programmes de sélection n'ont utilisé qu'une faible partie de la variabilité disponible à l'intérieur de l'espèce cultivée (Upadhyaya *et al.*, 2002). Ce faible polymorphisme moléculaire peut s'expliquer par la capacité limitée de certains marqueurs moléculaires, comme les RFLPs et les RAPDs, à détecter des substitutions nucléotidiques isolées dans les chromosomes et l'utilisation d'un matériel végétal mal choisi (He et Prakash, 1997 ; Singh *et al.*, 1998). L'utilisation de la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en combinaison avec des enzymes de restriction de type *EcoRI/MseI* et *Mlu/MseI* s'est révélée plus efficace mais a confirmé le faible niveau de diversité génétique à l'intérieur de l'espèce cultivée (Herselman, 2003). A partir de cette technique des marqueurs de type microsarellites (ou SSRs pour « Single Sequence Repeats ») ont été développés. Ces microsatellites constituent, semble-t-il, les marqueurs les plus polymorphes à l'intérieur de l'arachide cultivée. Cependant le pourcentage de détection de microsatellites, moins de 5% des clones testés, demeure très modeste au regard des résultats obtenus sur beaucoup d'autres espèces (Hopkins *et al.*, 1999 ; He *et al.*, 2003). L'utilisation des espèces sauvages apparentées à l'arachide cultivée pourraient fournir un outil pour caractériser la variabilité génétique des collections du genre *Arachis* et contribuer à élargir la base génétique de l'espèce cultivée (Dos Santos *et al.*, 2003 ; Bertoli *et al.*, 2003). Les RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), marqueurs dominants réputés instables mais faciles d'utilisation, ont récemment permis de retrouver les relations précédemment reportées sur la base d'observations morphologiques, cytologiques et de compatibilité en croisement des espèces (Dos Santos *et al.*, 2003). A l'heure actuelle, l'utilisation des marqueurs de l'ADN n'a fourni qu'une seule application en termes de SAM sur l'arachide cultivée. Il s'agit de l'utilisation de marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length polymorphisms) pour l'acquisition de la résistance au nématode *Meloidogyne arenaria*. Cette transformation, réalisée à Collège Station (Texas A & M University), aux Etats-Unis, a permis d'obtenir une population (TP 263-3-5) résultant d'un croisement interspécifique entre une variété cultivée et une arachide sauvage, *Arachis cardenasii* (Choi *et al.*, 1999; Church *et al.*, 2000).

1.4.2. Génomique fonctionnelle et génie génétique

Le marquage de l'ADN ne permet aucune interprétation sur l'action individuelle des gènes et de leurs interactions. La génomique fonctionnelle, en revanche, ne vise pas la

localisation des gènes sur une carte, mais la connaissance de la fonction de ces gènes et l'analyse de leur expression. L'étude du génome est ciblée sur des gènes candidats dont on connaît la fonction. L'expression (ou transcrit) plus ou moins importante du gène est accessible à travers les changements d'ARNm eux mêmes traduits en protéines, qui sont en général des enzymes dont la fonction métabolique est connue.

L'objectif de ces études est parfois l'aide à la sélection par la mise au point de test de réponse variétale en termes d'expression de tel ou tel gène cible sous la pression du stress pour lequel la résistance est recherchée. Cependant, quelle que soit l'espèce considérée c'est, le plus souvent, la transformation génétique qui est visée par ces techniques. L'objectif à terme est d'inclure dans le génome de l'espèce cultivée des gènes intéressants. Cependant, les techniques de génie génétique sont moins développées sur les légumineuses que sur les céréales (Klueva *et al.*, 1998). En ce qui concerne l'arachide les gènes ciblés sont des gènes contrôlant des maladies et la qualité de l'huile où des gènes de résistance. Ces gènes sont souvent présents dans les espèces sauvages appartenant au genre *Arachis*, dont la grande majorité est, malheureusement, incompatible en croisement avec l'espèce cultivée.

1.4.2.1. Les méthodes de transformation

La transformation génétique consiste en un ensemble de méthodes permettant le transfert de gènes individuels conférant des caractères de résistance. Les caractères visés sont en général mono ou oligo-génique (contrôlés par un seul ou un faible nombre de gènes) comme la résistance à des insectes ou des nématodes ou une augmentation de la qualité des graines. A l'instar de la plupart des espèces, les techniques de transformation de l'arachide utilisent le gène-reporter β -Glucuronidase (GUS) dont l'expression est facilement détectable par fluorimétrie et qui permet donc de connaître l'efficacité de la transformation ainsi que l'expression des gènes dans les transformants (Tehryung *et al.*, 1999). La régénération des plantes transformées est réalisée sur le milieu classique d'induction MS (Murashige et Skoog, 1962 ; Gill et Ozias-Atkins, 1999) plus ou moins modifié.

Les premiers essais de régénération *in vitro* de l'arachide ont été réalisés dès 1992 à partir de gynophores prélevées sur des fleurs, juste après leur fécondation (Tallury *et al.*, 1992). Depuis, des arachides transgéniques ont été produites par bombardement de particules (Ozias-Atkins *et al.*, 1993 ; Brar *et al.*, 1994 ; Singsit *et al.*, 1997) ou *via* la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* portant une résistance à un antibiotique (Cheng *et al.*, 1997 ;

Sharma et Anjaiah, 2000; Rohini et Sankara Rao, 2001). Plus récemment, la mise au point d'une méthode d'électroporation a permis un transfert direct de gène dans des folioles embryonnaires (plus faciles à manipuler que les protoplastes) avec une bonne qualité de régénération (De Padua *et al.*, 2000).

1.4.2.2. Les principales applications du génie génétique sur l'arachide

Les résultats obtenus récemment sur cette espèce concernent la transmission de certaines résistances biotiques et l'augmentation de la qualité de l'huile dont le contrôle génétique est simple. Les résistances plus complexes comme la résistance à l'aflatoxine ou à la sécheresse n'ont pas encore abouti à des applications concrètes.

La résistance à des facteurs biotiques

Des plantes d'arachide fertiles ont été transformées *via A. tumefaciens* avec un gène hétérologue du tabac de type chitinase afin d'obtenir une résistance à *Cercospora arachidicola*, la cercosporiose précoce. L'analyse du transgène par Northern Blot (hybridation entre l'ADN de la sonde « chitinase » marquée et l'ARN de la plante) a montré une forte expression de la chitinase et la transmission du gène correspondant dans la descendance a été vérifiée en utilisant des Southern Blot (hybridations entre l'ADN marqué de la sonde et l'ADN des plantes). La résistance des plantes transformées et de leur descendance a été confirmée en serre (Rohini et Sankara Rao, 2001).

La résistance au virus du «Tomato Spotted Wilt» (TSWV) a été également obtenue par transformation en utilisant le bombardement de particules (Nascimento, 2003). La construction génétique a été réalisée avec un gène anti-sens de TSWV isolé à partir de plants d'arachide infestés. Des essais au champ ont montré que la résistance au champ des plantes transgéniques était améliorée. L'utilisation des plantes transformées dans l'amélioration variétale classique est donc envisagée (Yang *et al.*, 2004).

Augmentation de la qualité de l'huile

Une série d'investigations est actuellement réalisée dans l'objectif de modifier la qualité de l'huile d'arachide. Ces recherches visent l'augmentation du ratio O/L qui représente le rapport entre les deux principaux acides gras constituant l'huile d'arachide (80% des acides gras totaux), l'acide oléique, acide gras mono insaturé (une seule double liaison) et l'acide linoléique, acide gras bi insaturé (deux double liaisons). Une forte teneur en acide oléique



Figure 9. Graines d'arachide infestées par le champignon *Aspergillus flavus*, vecteur de l'aflatoxine (photo Clavel)

améliore la conservation de l'huile du fait d'une oxydation (rancissement) moindre et diminuerait les risques d'artériosclérose chez l'homme.

En utilisant en croisement la lignée F 435, mutant spontané à fort taux d'acide oléique (34:1), Moore et Knauff (1989) avaient conclu, à un contrôle génétique simple (deux gènes récessifs) de ce caractère. Les gènes qui contrôlent l'activité des désaturases, enzymes permettant d'augmenter le taux d'insaturation de l'huile chez l'arachide, ont été ciblés. L'expression d'un de ces gènes chez l'arachide a été analysée par RT-PCR (Differential Display) dans une descendance en ségrégation entre deux parents différents en termes de ratio O/L. Les résultats ont montré une stricte correspondance entre les phénotypes à fort taux d'acide oléique et la réduction de l'expression d'une de ces désaturases (Jung *et al.*, 2000a). Par ailleurs, il semble que le caractère contrôlant la haute teneur en acide oléique ne s'exprime que si il y a à la fois une réduction importante de l'expression de cette désaturase et une mutation d'une autre désaturase (Jung *et al.*, 2000b). Les comparaisons entre l'ADN génomique de la lignée mutante F 435 et un génotype à taux O/L normal (1,3:1) et leurs descendances obtenues par back cross ont révélé un polymorphisme limité à quelques séquences codantes. Ces résultats autorisent à penser qu'une sélection assistée par marqueurs permettra d'obtenir plus rapidement des lignées à forte teneur en acide oléique (Lopez *et al.*, 2000).

La résistance à l'aflatoxine en pré-récolte

L'aflatoxine est une toxine hautement cancérigène transmise par des champignons du sol saprophytes du genre *Aspergillus* (*A. flavus* et *A. parasiticus*) extrêmement fréquents dans les zones de production surtout si ces régions sont régulièrement soumises à des déficits hydriques en fin de cycle (Figure 9). La contamination de l'arachide par l'aflatoxine est aujourd'hui le problème majeur sur l'arachide avec la résistance à la sécheresse à laquelle elle est liée. Cependant, à ce jour, malgré un investissement constant de la recherche sur ce thème depuis les années soixante-dix, les sélections mises en oeuvre n'ont pas permis d'obtenir de variétés résistantes. Ainsi, depuis une dizaine d'années environ, la recherche sur l'arachide et sur d'autres plantes sensibles, comme le maïs, a recours aux biotechnologies dans ce domaine.

Au niveau du champignon des constructions de gènes impliquant un gène intervenant dans la biosynthèse de l'aflatoxine comme promoteur et le gène GUS comme reporter ont été réalisées. Ces outils moléculaires ont été utilisés afin d'identifier des agents et des

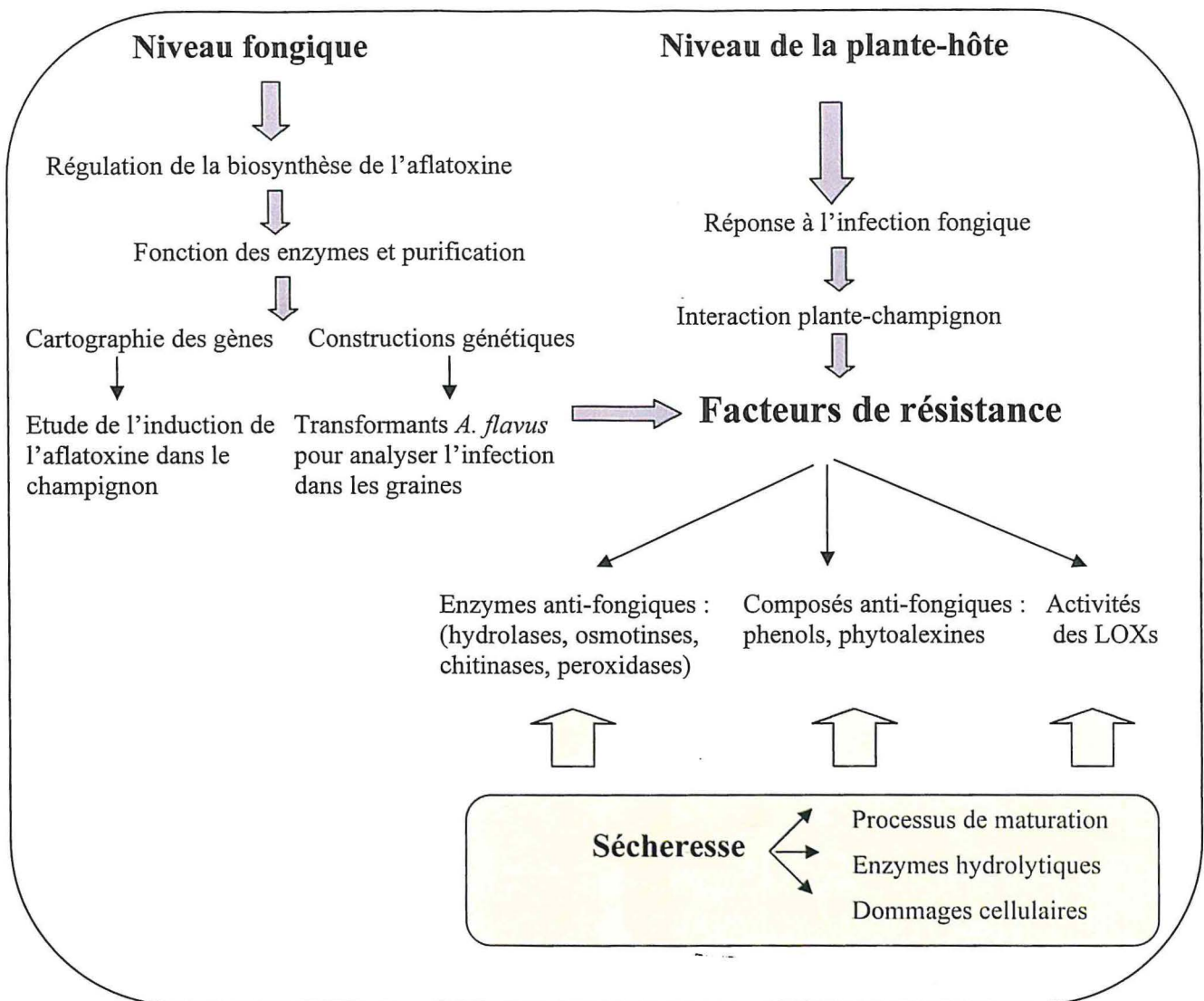


Figure 10. Schéma théorique montrant une intégration¹ des recherches en ingénierie génétique pour la résistance à l'aflatoxine en pré-récolte de l'arachide (d'après Clavel 2002b)

composés qui inhibent la production de l'aflatoxine (Cleveland *et al.*, 1997). Le principal résultat publié sur l'arachide concerne une étude histologique de l'infection réalisée *in situ* grâce à un transformant de *A. parasiticus* utilisant comme promoteur un précurseur de l'aflatoxine, le gène Nor-1 (Xu *et al.*, 2000). Sur le maïs, des transformants *A. flavus*-GUS ont permis d'évaluer la croissance et le degré de l'infestation fongique (Brown *et al.*, 1999) dans les graines et d'analyser l'expression des gènes reliés à l'aflatoxine (Flaherty *et al.*, 1995).

Dans le domaine plus complexe de l'interaction hôte parasite, les essais antérieurs tentant d'associer certains marqueurs protéiques à une résistance reconnue à l'aflatoxine ont échoué (Bianchi-Hall *et al.*, 1994). La principale difficulté réside dans l'intervention des conditions environnementales (températures, déficit hydrique) dans l'expression de la sensibilité des génotypes. Le gène codant pour la stilbene synthase constitue l'un des gènes candidats potentiels pour la transformation génétique. Il contrôle la synthèse des stilbene phytoalexines, molécules produites en réponse à l'infestation fongique et également au déficit hydrique (Misra, 1997; Strange et Subba Rao, 1994). Certains gènes codant pour des lipoxigenases (LOXs), importante famille d'enzymes régulant le métabolisme des acides gras, sont supposés jouer un rôle important dans l'interaction *Aspergillus*/graine d'arachide car les LOXs induisent l'expression de signaux de défense des plantes comme la production d'acide jasmonique et d'hydroperoxydes (Calvo *et al.*, 1999). Les gènes codant pour certaines LOXs, ont été récemment clonés dans l'arachide et leur expression a été étudiée dans des graines matures et immatures. Les résultats sur la présence de certains produits d'expression suggèrent que l'activation des LOXs induites par le champignon pourrait expliquer la grande sensibilité de l'arachide à l'aflatoxine en particulier dans les graines immatures (Burow *et al.*, 2000). Enfin d'autres enzymes ou protéines potentiellement anti-fongiques, constitutives ou induites en réponse à l'attaque du champignon sont proposées. Il s'agit notamment d'enzymes hydrolytiques comme les chitinases (Long-Xi *et al.*, 1998), chitosanases (Cuero *et al.*, 1995) et glucanases, d'osmotines, d'inhibiteurs de protéases (Cuero *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 1997), de deshydrogenases et de peroxidases (Fajardo *et al.*, 1994). Cependant aucune application concrète n'est encore disponible pour assister la création variétale. Une illustration graphique d'un montage théorique utilisant l'ingénierie génétique pour tenter d'améliorer la résistance à l'aflatoxine est donnée dans la figure 10 (Clavel, 2002b).

La tolérance à la sécheresse

Les progrès réalisés sur la compréhension des bases moléculaires de la résistance à la sécheresse des plantes sont limités comparés à ceux qui ont été réalisés sur les stress biotiques (Turner *et al.*, 2001). Les produits des nombreux gènes activés par le stress interviennent non seulement dans la tolérance au stress mais aussi dans la régulation de l'expression des gènes et dans la transduction des signaux de la réponse au stress (Yamaguchi-Shinozaki, *et al.*, 2002), voir chapitre 1.3.1. Par conséquent, comme en physiologie, il est difficile de distinguer les réponses constitutives des réponses adaptatives des plantes au niveau moléculaire.

Chez l'arachide, espèce dont la capacité d'adaptation (plasticité individuelle) est très forte, cette difficulté pourrait être accentuée et les investigations moléculaires représentent un véritable challenge (Turner *et al.*, 2001). Dans le cas de certaines espèces comme le maïs (Ribaut *et al.*, 1996 ; Frova *et al.*, 1999) ou le riz (Mackill *et al.*, 1999), on a pu relier la résistance à la sécheresse à des caractères quantitatifs (QTLs) en utilisant un polymorphisme moléculaire au niveau de l'ADN. Cependant, cette stratégie ne peut être envisagée chez l'arachide du fait du faible polymorphisme des marqueurs ADN (voir 1.4.1). La voie de la génomique fonctionnelle est actuellement explorée sur cette espèce. Des études récentes ont utilisé la RT-PCR et l'expression des gènes en réponse à la sécheresse sur l'arachide. La première étude (Jain *et al.*, 2001) indique des différences moléculaires en termes de transcrits entre les plantes stressées et irriguées au niveau de certains gènes. Plus intéressant, les résultats montrent aussi qu'en condition de stress prolongé, certains transcrits ont été exprimés plus longtemps sur le génotype « résistant » que sur le génotype témoin mais aucune explication fonctionnelle n'est donnée et le type de résistance du génotype n'est pas défini. Dans la deuxième étude qui inclut également le maïs (Guo *et al.*, 2004), la tolérance à la sécheresse est présentée comme la clef de la résistance à l'aflatoxine ce qui n'est qu'une approche très globale puisque le raisonnement est basé sur des corrélations statistiques entre résistance à la sécheresse et résistance à l'aflatoxine sans que les mécanismes spécifiques soit décrits ni qu'une hypothèse fonctionnelle soit envisagée. L'étude indique toutefois que certains transcrits d'ARNm sont exprimés de façon différentielle en fonction du stress hydrique et notamment ceux d'une nouvelle phospholipase de l'arachide.

CHAPITRE 2

VARIABILITE ET CONTROLE GENETIQUES DES CARACTERES AGRONOMIQUES EN CONDITIONS DE SECHERESSE

2.1. Introduction

La variabilité des variétés d'arachide cultivée est limitée car la plupart des cultivars récents descendent des mêmes croisements originels (Isleib and Wynne, 1992 ; Stalker, 1997). Cependant il est essentiel d'élargir la variabilité génétique disponible afin de garantir la capacité de réponse à la sélection en particulier dans le cas des caractères adaptatifs (Ortiz *et al.*, 2002). La sélection récurrente est très appropriée pour créer une nouvelle variabilité génétique relative à un caractère complexe tel que l'adaptation à la sécheresse (Khalfaoui, 1990 ; Clavel et Annerose, 1997). Cependant pour l'arachide, espèce strictement autogame et à petites fleurs, la difficulté des intercroisements est élevée et par conséquent les programmes de sélection récurrente sur arachide sont rares (Clavel et Gautreau, 1997a). Un programme de sélection récurrente sur test S1 a été conduit au Sénégal de 1985 à 1998. Il a permis de créer une population améliorée pendant 3 cycles en prenant en compte des critères agronomiques et physiologiques d'adaptation à la sécheresse (Clavel et Annerose, 1997). La population initiale a été créée à partir de huit variétés non apparentées, et éloignées sur le plan botanique et géographique (Figure 1). Une sélection familiale (premier cycle) et combinée individu-famille (à partir du deuxième cycle) selon deux processus réalisés en parallèle a été conduite (Khalfaoui, 1991c). Les caractères physiologiques concernés par la sélection étant très difficiles à mesurer sur de grands nombres, les familles issues du croisement pyramidal initial (cycle 1) ou des intercroisements de recombinaison (cycle 2) ont été séparées en deux groupes. Une première partie des familles a été testée en serre en conditions hydriques contrôlées pour les caractères physiologiques d'adaptation à la sécheresse tandis que l'autre partie a été évaluée au champ dans les conditions naturelles de l'hivernage. La sélection en serre (en rhizotons) et celle du champ ne portaient pas sur les mêmes familles ni sur les mêmes critères. La sélection réalisée en serre a retenu les individus qui possédaient des elongations racinaires, des régulations stomatiques (transpiration) et des résistances protoplasmiques les plus favorables à la résistance (sélection sur caractères physiologiques) alors que les individus sélectionnés au champ étaient issus des familles montrant une combinaison optimale des caractères de production et de qualité technologique (sélection sur caractères agronomiques). Les individus «physiologiques» ont été intercroisés avec des individus issus des meilleures familles «agronomiques» à la fin du premier cycle de sélection. Le

Planche II. Semis du test agronomique de descendance de la population en cours de sélection récurrente à Bambey lors de l'hivernage 1998 (Photos Clavel)



deuxième cycle de sélection (Pop2), a été réalisé à partir 96 familles choisies sur la base des performances familiales. Ces familles ont été conduites en S1 et testées sur le plan agronomique et physiologique. Un index empirique a été calculé sur la base des résultats réalisées par la variété Fleur 11, nouvelle variété introduite de Chine qui montrait régulièrement au Sénégal d'excellentes performances sur le plan de la stabilité de rendement (Mortreuil et N'Doye, 1993), lors des deux types de tests. L'application de cet index a permis de sélectionner 43 individus pour la recombinaison du 3^e cycle (Pop3). Un 44^e parent, la variété Fleur 11, a été introduite dans le plan de recombinaison en demi diallèle. Ce plan de croisement a permis d'obtenir 92 familles S1 constituant Pop3. Ce matériel végétal a fait l'objet de l'étude au champ réalisée à Bambey en 1998, en conditions pluviales avec déficit hydrique marqué notamment en fin de cycle (Planche II). L'objectif du test de descendance conduit en 1998 sur Pop3 était la recherche des meilleurs prédictors du rendement en condition de sécheresse chez l'arachide. L'analyse génétique a permis de réaliser une estimation des AGC (aptitudes générales à la combinaison (AGC) des lignées S1 et une estimation des espérances de gains génétiques (coefficients de prédiction génétique, CPG, au sens strict) des principaux caractères agronomiques et technologiques en conditions de déficit hydrique de fin de cycle. Un calcul d'index optimisant les gains génétiques sur les principaux caractères mesurés a été opéré. L'ensemble des calculs a été réalisé sur la base d'observations individuelles de chacune des 5 plantes (théoriques) qui constituaient une famille dans chaque répétition. Le dispositif choisi, blocs incomplets à disposition aléatoire à 6 répétitions, visait le contrôle maximal des micro-variations environnementales. Cette analyse génétique a fait l'objet d'un article en préparation avec l'aide Philippe Baradat, intitulé «Diallel analysis and multi trait selection in a breeding program for drought adaptation of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) » qui sera soumis à la revue **Euphytica**.

Diallel analysis and multi trait selection in a breeding program for drought adaptation of groundnut (*Arachis hypogaea* L.)

Introduction

Groundnut, *Arachis hypogaea* L., is the most important oilseed and cash crop grown in the semi-arid tropics (Ntare et al., 2001). It is cultivated mainly during the rainy season, characterized by low rainfall ranging between 300 and 600 mm, poor rainfall distribution and high variation (Sikavumar, 1991). The rainfall pattern in this region displays a frequent end-of-season water deficit (Ndunguru et al., 1995)

Plant adaptation to drought is achieved by cultivars able to ensure a sufficient production even under water deficit. It is a complex trait involving various mechanisms and characters whose genetic control remain often unknown, mainly in the case of leguminous species (Khalfaoui, 1990). This lack of knowledge occurs because it is difficult to perform experiments to analyse the genetic basis of production traits. Belhassen et al. (1995) have underlined the scarcity of results in this field. A part of this drawback is due to the low inheritance of seed yield in drought condition attributable to large variations of environment (Turner et al., 2001).

Selected groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties are mainly disseminated as pure lines whose variability in single crosses is limited. The strict autogamy of the species which is difficult to hybridize, explains this situation (Clavel and Gautreau, 2001). Therefore, exploitation of available intra-specific variability in groundnut is still limited (Singh and Simpson, 1994) and most groundnut cultivars have a very narrow genetic base (Upadhyaya et al., 2003a). In the case of composite traits like drought adaptation a recurrent selection program allowing recombination of favourable alleles from diverse genetic sources may be the most efficient way to create well adapted varieties (Khalfaoui, 1990; Clavel and Annerose, 1997).

Research work conducted in Senegal by CIRAD (International Cooperation Centre in Agronomical Research for Development) and ISRA (Senegalese Institute of Agricultural Research) has led to the creation of a novel drought-adapted population by association of

favourable physiological and agronomical traits using recurrent selection (Clavel and Annerose, 1997). For the present study, the third cycle of S1 families inter-crossing has been used (1) to identify the genetic and non-genetic components of the main agronomic traits influenced by drought (2) to provide accurate estimates of the genetic parameters of heritable traits (3) to compute selection indices optimizing genetic gains on yield and some quality characters. The particular interest of this study is to involve data on individuals from numerous progenies resulting from multiple crosses. This situation is seldom met in the case of annual crops, in particular plants for which only manual hybridization can be done.

Material and method

Genetic material

The initial breeding population (Pop0) was initially created in 1985 from eight modern cultivars (pure lines) genetically and geographically distant from each other owing complementary drought-adaptation characters (Table 1).

Table 1. Varieties (pure lines) involved in constitution of the initial breeding population (P0) used in the recurrent selection program.

Varieties	Theoretical cycle length (days)	Botanical type	Subspecies	Geographical Origin
47-16	120	Virginia (runner)	<i>Hypogaea</i>	India
59-127	120	Virginia (runner)	<i>Hypogaea</i>	Burkina-Faso
57-422	105	Virginia	<i>Hypogaea</i>	USA
73-33	105	Virginia	<i>Hypogaea</i>	USA and Australia
55-437	90	Spanish	<i>Fastigiata</i>	Argentina
TS32-1	90	Spanish	<i>Fastigiata</i>	Burkina –Faso
TG7 (79-40)	90	Spanish	<i>Fastigiata</i>	Inde (mutagenesis)
64G 195 (68-111)	90	Spanish	<i>Fastigiata</i>	South Africa

(from Khalfaoui, 1991b)

Three recombination-selection cycles were performed since 1985. Recombination used manual hybridisation of lines. After hybridisation, a variable number of plants from each cross were selfed in order to obtain S1 lines. Selection was performed on the basis of physiological drought-adaptive traits in controlled conditions and of agronomical performances of these S1 lines (Khalifaoui, 1990a). After each selection procedure, another sequence: hybridisation-selfing was performed to initiate the next cycle.

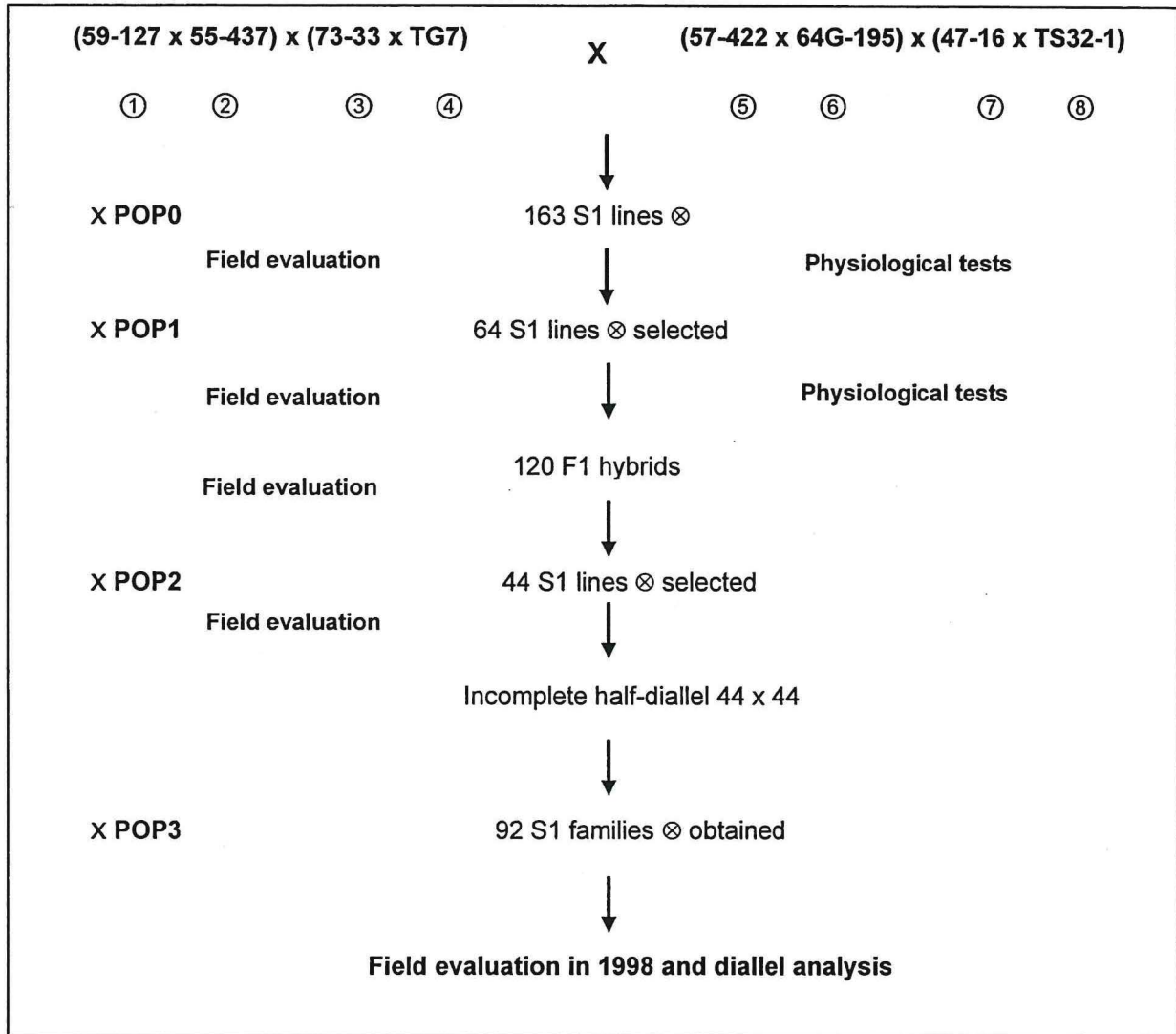


Figure 1. Obtention scheme of the 92 S1 families from the third population (POP3) using recurrent selection (X means intercrossing and ⊗ self pollinated)

During cycle 1, the initial breeding population was constituted by two double cross hybrids: [59-127 x 55-437] x [73-33 x TG7] and [57-422 x 64G-195] x [47-16 x TS32-1]. From these two hybrids, 163 S1 lines were obtained by selfing constituting Pop0 (Fig. 1). Among these lines, 64 were selected on the basis of physiological tests and agronomical performances. This selected S1 sub-sample is referenced as population Pop1. For cycle 2, total number of about 120 hybrid families were realised by combining the 64 selected lines of P1 population using two plants per line. From these hybrids, 96 S1 lines were obtained by selfing 120 hybrids. An empirical selection index combining physiological tests and field evaluation resulted into selection of 44 S1 lines. This selected S1 sub-sample is referenced as Pop2. For cycle 3, the 44 S1 parental lines of P2 population were recombined according to a 44 x 44 incomplete half-diallel mating design. From the F1 hybrids obtained, 92 resulting S1 lines were obtained by selfing from one to three plants for each hybrid combination. These S1 lines were mixed for each F1 combination in order to obtain the quantity of seeds necessary for a sufficient number of plants to characterise the entries of the mating design.

Field design

The statistical design was achieved using the DIOGENE software, an extended version of the OPEP software (Baradat et Labbé, 1995). The trial comprised a total of 90 rows with 6 linear plots of 5 plants on each. The 92 available S1 lines were arranged into 27 incomplete blocks of random genetic composition with 20 plots (10 rows of two plots) in each. The number of replications per line was six for most of them (86) and between three and five for six other families due to an insufficient number of seeds. The between-plant spacing was the same between and within row (0.5 m). The blocks were therefore square-shaped (5.5 m x 5.5 m). The position of each plant was referenced by two coordinates: row and abscissa, using the between-plant spacing as unit, to process data according to the spatial statistics described below.

Culture conditions

The experiment was established during the 1998 rainy season at the National Centre of Agronomical Research of Bambey (14.42°N and 16.28°W), located in the sub-Saharan zone of

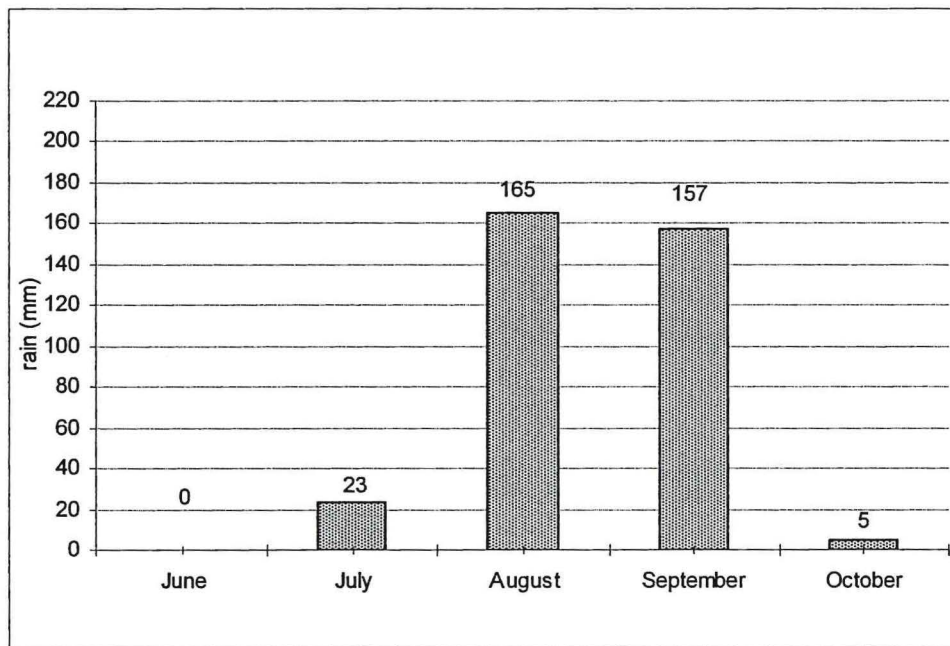


Figure 2. Distribution of rain during the rainy season 1998 in Bambeý. The total rain was 350 mm

Senegal. The soil of the Bambey Station is sandy (91-94%) with a low clay content (3-6%) as the most part of the soils of the “Senegalese Groundnut Basin”. Two seeds pre-treated with Granox (Captafol 10%-Benomyl 10%-Carbofuran 20 %) to protect them against soil-borne pests and diseases, were hand-sown per hole, at a depth of about 4 cm. The seedlings were thinned to one per hole one week after sowing. In order to don't deviate from the farmers' usual cultural practices for groundnut, no fertilizer was applied. The crop was protected against pests and maintained weed-free throughout the study.

The experiment was sown on July 21st, after the first significant rainfall. The plantlets were irrigated with 20 mm, one week after sowing in order to assure a good rooting. The plants were harvested 90 (October, 20) or 100 days (October, 30) after sowing according to the precocity group to which the families belonged. The total rainfall was 350 mm, amount slightly underneath the normal, with severe end-of-season water deficit which is of regular occurrence in this area (Fig.2). The 100 days varieties were watered with additional 20 mm just after the harvest of the 90 days varieties in order to allow identical conditions of watering for both precocity groups during the last month of the growing season. The harvested plants were exposed to ambient temperatures of 30 to 35°C to allow complete drying of haulms and pods to less than 5% pod moisture.

Measurements

All measurements were made on each individual plant. Pod and haulm yields were determined as the dry mass of pods and haulms after air-drying to constant weight. Total weight was the sum of pods and haulms dry weights. Number of pods and seeds per plant were counted.

Pod and seed quality traits were assessed through five variables: maturity percentage, shelling percentage, sound mature kernel (SMK) percentage, 100-kernel and 100-pod weights. The pods were individually hand-shelled to determine the maturity % on the basis on a visual classification of the colour of the internal pericarp of the hull of opened pods (Williams and Drexler, 1982). Only SMK were considered in estimating 100-kernel weight.

Data processing

Analysis of variance

Colum parent Row parent	01 (3)	02 (3)	03	04 (4)	05 (3)	06	07	08 (2)	09 (2)	10	11 (3)	13 (2)	14	15	16	18	19	21 (2)	23 (4)	24	28	29	32	33	34	36	38	39	41 (3)
S1 Parent 03 (5)	28	25																											
S1 Parent 06 (9)			25		26																								
S1 Parent 07 (2)						24																							
S1 Parent 10 (2)									25																				
S1 Parent 14 (5)									25																				
S1 Parent 15 (3)													28																
S1 Parent 16 (3)	25							25																					
S1 Parent 18 (6)				24	29	28					17																		
S1 Parent 19 (5)											27																		
S1 Parent 24 (6)														23	30	30	26												
S1 Parent 25 (3)		13												28						30									
S1 Parent 28 (2)				25																									
S1 Parent 29 (5)	08	21		23													29												
S1 Parent 30 (3)						21											26				22								
S1 Parent 31 (5)			29	28	29	24											29												
S1 Parent 32 (3)						17												26											
S1 Parent 33 (6)						16	10	21										30											
S1 Parent 34 (4)																						26	26						
S1 Parent 35 (3)											23								27					24					
S1 Parent 36 (5)										29									26						29				
S1 Parent 38 (6)																									28	30			
S1 Parent 39 (3)																				22						30			
S1 Parent 40 (3)			27									22															29		
S1 Parent 42 (5)													29								22						26	29	24
S1 Parent 43 (7)												24	53			22		24	25								26		25
S1 Parent 44 (4)													25						30								25		29

Figure 3. Compacted half-diallel mating design with 37 S1 parents and 72 S1 families obtained by selfing 1 to 3 plants from F1 families. For each cross the number of available S1 plants is given. For each S1 parent the number of crosses in which it was implied to obtain the F1 progenies is indicated between brackets (from 2 to 7). This number of crosses per parent is given only for the row entry is the same parent also exists as column entry.

After merging the scarce reciprocal crosses and eliminating doubtful or non-interconnected families (Searle 1987, pp. 139-168) data analysis concerned only 72 S1 families from the 92 represented in the field trial. The resulting mating design concerned 37 parents out of the 44 initial ones (Fig. 3). The biometrical analyses were carried out using the DIOGENE software, the environmental variation being controlled using the Papadakis++ model included in this library (Baradat and Perrier, 2003). The statistical model used was a simplification of the general model for diallel analysis of variance (Griffing, 1956). The procedure developed for unbalanced designs by Garretsen and Keuls (1977) for the random model was used to estimate the components of variance and covariance due to the general and specific combination aptitudes. The statistical model for the half-diallel model is written as follows:

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + a_j + s_{ij} + \beta_k + e_{ijkl}$$

where : μ is the general mean, a_i and a_j are the general aptitude to the combination of the parents i and j , s_{ij} is the specific aptitude to the combination of the couple (i,j) , β_k is the fixed effect of block k , and e_{ijkl} is the individual deviation to the mean family adjusted to the block.

The half-diallel model implemented by DIOGENE allows the exclusion of self pollinations so as not to bias the estimates of genetic parameters (Table 2).

Table 2. Model of analysis of variance of the half-diallel with random genetic effects and fixed block effects

Mean square and variance effect	DF	Mean square expectation, $E(MS)$	F test
block, MS_b	$B-1=26$	$\sigma_e^2 + [1/B - 1] \sum_{k=1}^B n_{..k} \beta_k^2$	MS_b/MS_e unbiased
General aptitude, GCA , MS_a , σ_a^2	$P-1=36$	$\sigma_e^2 + k_1 \sigma_a^2 + k_2 \sigma_s^2$	MS_a/MS_s biased
Specific aptitude, SCA , MS_s , σ_s^2	$C-P=35$	$\sigma_e^2 + k_3 \sigma_s^2$	MS_s/MS_r unbiased
intra-family, MS_e , σ_e^2	$N-C-B+1$ $=1745$	σ_e^2	

B :number of blocks, P :number of parents, C :number of confounded reciprocal crosses, N : total number of plants. The F test on nonzero of the GCA variance is realised according to the MS of SCA . It is biased if the half-diallel is non-orthogonal and unbalanced. The F test on nonzero of SCA variance is realised according to the intra-family MS . It is unbiased in every case.

The intra-family variance is estimated by the intra-family *MS*: $\hat{\sigma}_e^2 = MS_e$

The genetic model used doesn't take account of epistatic effects of genes, so the phenotypic, additive and dominance variances, respectively σ_P^2 , σ_A^2 and σ_D^2 , of random effects are given by the following expressions:

$$\sigma_P^2 = \sigma^2(y_{ijkl}) = 2\sigma_a^2 + \sigma_s^2 + \sigma_e^2$$

$$\sigma_A^2 = 1 + F/4 \text{cov}(HS) = 1 + F/4 \sigma_a^2$$

$$\sigma_D^2 = (1 + F)^2 / 4 [\text{cov}(FS) - 2 \text{cov}(HS)] = (1 + F)^2 / 4 \sigma_s^2$$

where : $\text{cov}(HS)$ is the covariance between Half-Sib families, $\text{cov}(FS)$ is the covariance between Full-Sib families and F is the inbreeding coefficient estimated to 0.375 for the S1 families.

Genetic parameters

The heritabilities and Coefficients of Genetic Prediction (*CGPs*) and heritabilities were calculated on adjusted values according to the block effect.

The heritabilities were classically defined by:

- Narrow sense heritability:

$$h_{ns}^2 = \sigma_A^2 / \sigma_P^2$$

- Broad sense heritability:

$$h_{bs}^2 = (\sigma_A^2 + \sigma_D^2) / \sigma_P^2$$

The *CGPs* of the measured traits were estimated at the individual level. The concept of *CGP* is a generalisation of heritability when two traits are considered. After Nei (1960) and his definition of "co-heritability", Baradat (1976) gave this name to the standardised regression of genetic (or genotypic) value of one trait on the phenotypic value on another trait (the values are expressed into phenotypic standard deviations). This genetic parameter was promoted by Van Buijtenen (1992) as practical way to compare the efficiencies of direct *versus* indirect

selection. Considering a $q \times q$ matrix of *CGPs* concerning q traits, the ratio of diagonal *CGP* of trait x_l (heritability of this trait) on an off-diagonal *CGP* directly gives the relative efficiency of direct selection of trait x_l compared to indirect selection of x_l using $x_{l'}$ as predictor. For two different characters, x_l and $x_{l'}$, its general formulation is as follows:

$$CGP(x_l, x_{l'}) = \text{cov} G(x_l, x_{l'}) / [\sigma_P(x_l) \sigma_P(x_{l'})]$$

As heritability, the *CGP* is defined at narrow and broad sense. It is symmetric and comprised between -1 and +1 as a correlation coefficient.

Significance and confidence intervals for the variance components and genetic parameters have been assessed using an all-but-one resampling Jackknife procedure (Lebart *et al.*, 1979; Saporta, 1990) implemented in an automatic way by the DIOGENE software.

Selection indices and genetic gains

A high levels of dominance and environmental variance having been noted, first step was to compute an adjustment of values using a method derived from Papadakis (1937, 1940; Dagnelie 1989; Pichot 1993) implemented on the DIOGENE software. This method allows reduce the environment effect from the phenotypical value of a character, by using a multiple regression on mean residual value of neighbour individuals.

After this treatment of data, Best Linear Predictors - BLP - selection indices (Henderson, 1977) established on the basis of a linear combination of C predicted traits, were computed, following the general model:

$$I = \sum_{l=1}^C b_l \hat{g}_i(x_l)$$

where $\hat{g}_i(x_l)$ is the predicted average genetic value of individual (or family) i for trait x_l and b_l is the relative weight associated to this trait.

The genetic model used, like *CGPs*, didn't imply any decomposition of genetic sources of variation, but was based only on the individuals, families and residual effects with corresponding variance-covariance matrices, only assuming that the actual individuals and families were a

representative sample of an infinite set of families originating from the same parental pool. Five traits were involved in the selection indices construction: Pod, Haulm, Mat, Shelling and 100-K. The indices used only one predicted (target) character, which was its own predictor, associated with the four other traits used as predictors, with weights 0, to improve index accuracy. They gave the maximum genetic gains which could be reached for each target trait using or not additional information on other traits. The index model used was symmetric because the five target characters were the same as the predictor characters: in this case each variable predicts its own genetic value and the genetic values of the four other characters. Six indices series were computed to find the expected genetic progresses for these traits considering only the additivity genetic value. The level of selection pressure considered was 5%. The indices were calculated for a combined individual-family selection and for family based selection. The first five ones series of calculated indices maximised the genetic gains for the trait affected by the coefficient one and the sixth gave the best combination of genetic gains according to the agronomical weight of traits. The expected genetic gains for every index calculation were computed as described by Baradat *et al.* (1995) in a general synthesis about allocation of predictor and target traits in a selection index. The quality of the prediction is assessed by the values of the correlation coefficient between the maximum theoretical genetic gain on target traits (H) and index (I), $r(H, I)$ (Baradat *et al.*, 1995).

Results

Preliminary analysis

Results from the analyses of variance using the non-orthogonal with fixed effect model realised on the initial values of the ten agronomical variables are shown in Table 3. High significant block, family and interaction block x family effects ($P < 0.05$) were observed on all variables studied. These highly significant effects justify fitting the values to the fixed block effect before the diallel genetic analysis.

Diallel analysis of variance

The diallel analysis according to the random model of Garretsen and Keuls (1977) without reciprocal effects estimated correlations of GCA and SCA effects for each measured trait.

Correlations of GCA and SCA effects are identical to those of additive effects and dominance effects, respectively, because the only term that differentiates these effects estimates is the inbreeding coefficient value which disappears in the correlation calculation. The results of this analysis are given in table 4 for the correlations of GCA effects and in table 5 for those of environmental effects.

The general interpretation of the correlations of GCA and SCA concerns the relationships between traits according to the breeding method used. As pod-yield is generally the main targeted traits, we will consider particularly the effect of selection for high yield on other traits. Since in a strategy of recurrent selection, the genitors choices will be founded on the additivity, results presented focused on GCA correlation effects (Table 4). Observed high significant correlations between GCA effects on pod-yield and other variables except Mat, Shelling and 100-K, indicate that the response to a selection pressure on pod-yield will be positively related to the other traits responses (Table 4). However, the three variables Mat, Shelling and 100-K, for which response to selection are not significantly correlated with the one of pod-yield are crucial quality traits for groundnut. In addition two of them, Mat and Shelling, are negatively correlated with haulm-yield which is an important by-product in the Sub-Sahel area. On the other hand, Mat, SMK and Shelling showed very high GCA effects correlations between each other. The correlations of SCA effects (referring to dominance, results not shown) with pod-yield, were all significant but the correlation between pod- and haulm-yield was weak (0.286, $P=2.9\%$). This adds to the probable difficulty to improve pod and haulm yields correlatively whatever the breeding method used. Therefore, in the case of selection based on GCA, a special attention must be given when breeding groundnut for high pod- and haulm-yield in drought conditions in order to not to lower the quality of the product.

Very high block and interaction block x family were previously observed (Table 3). The correlations of the environmental effects measure, by definition, the relationship between responses of two characters to the environment and thus reflect the physiological (or functional) relationships between characters. The results presented in table 5 show that the end-of-season

drought which is the main environmental constraint imposed in the experiment had similar effect on quantitative characters of yield and also on the maturity percentage: correlations were very high between pod-yield, number of pods and seeds, which are yield components. Highly significant correlation were, as well, observed between pod-yield and haulm-yield, size of pod (assessed by 100-P) and the maturity percentages. On the contrary these environmental correlations were very weak or non-significant with quality traits as Shelling, SMK and 100-K. For the last parameter the absence of environmental correlation with pod-yield can be explained by the method of measurement which only uses sorted “better” seeds. On the other hand, the environmental effect on Mat had a high level of correlation with those on Shelling, SMK and 100-K. In summary the environment had strong effect on quantitative variables but no correlative effect on quality variable except for Mat. However environmental effect on Mat was related to effect on other quality traits.

Genetic parameters

The percentages of additivity from the genetic variance were inferior to 50% for the ten traits except for SMK (Table 6). The pod and seed size (100-P and 100-S) showed a very low proportion of additivity, 11.55 and 17.88 % respectively, hence they will be probably extremely difficult to improve using genealogical selection from few numbers of initial crosses. Large differences between broad sense and narrow sense heritabilities on all variables suggest the preponderance of dominance effects but also strong environmental effects on these variables. The greatest values of broad sense heritabilities were observed on 100-P and 100-S with 0.918 and 0.771, respectively. Since very large differences are observed between broad and narrow sense heritabilities on fruit size, micro-environmental effects or genetic bias are probably stronger on these variables. Main consequences on the selection process are that the genetic progresses will be slow and uncertain on all variables except SMK if non-desirable environmental effects are not adequately controlled.

CGPs refer to the concept of generalised heritability. Its calculation involves the environmental variance in denominator contrary to the genetic correlation coefficient. They have been estimated at the narrow sense to determine notably how yield traits are related each other and if they can predict quality traits under water stressed conditions. *CGPs* estimates established at the

narrow sense show that they are generally significantly different from zero but with low values as expected giving the weak values of h^2_{ns} (Table 7). Generally *CGPs* between yield components are positives and highly significant whereas *CGPs* between yield components and quality traits are no significant and/or negative except for Nb-Seed in some cases. On the other hand high significant negative relationship between haulm yield and maturity indicates a genetic relationship between these two traits.

Selection indices and genetic gains

Selection indices computations involving five traits after their phenotypical values were adjusted using a Papadakis (1937 and 1940) derived method (cf *Data processing*). Six series of five indices (one by target trait) were established (Table 8). The first five indices calculated maximized the genetic gains for the trait with coefficient 1 and the aim of the last one is to obtain the best combination of genetic gains. Only additive genetic value was considered because in our specific case the empirical choice of one to three individuals for selfing from F1 to S1 may have produced a genetic bias in the estimate of ASC effect as these selfed individuals are not warranted to be representative of the initial cross gave. Data presented in Table 8 were established for combined individual-family genetic value. A selection pressure achieved on Pod (Table 8, series 1) allowed positive gains on all other considered traits. However, if the selection pressure is realised on Haulm (Table 8, series 2) or on Mat (Table 8, series 3), the genetic gains will be considerable on the target variable it-self but the expected genetic gains on Mat (when Haulm is targeted) and on Haulm (when Mat is targeted) will be negative. Selection pressure on Shelling led to limited gains or losses on other traits except on Mat (Table 8, series 4). Selection pressure on 100-K drew also considerable gain on Haulm but limited gain on Pod and losses on Mat (Table 8, series 5). The best combination of expected genetic gains with a selection pressure of 5% on these traits gave genetic gains of near of 20% on Pod, 15% on Haulm 13% on Mat and 4% on Shelling and 100-K (Table 8, series 6). Data concerning indices computations with selection made at the family level showed genetic responses very similar (results not shown). The quality of these predicted selection responses measured by $r(H,I)$ were higher for the family selection than for the individual

selection. In conclusion the best trait to be targeted is pod-yield because its own selection leads to the higher genetic gains on itself and do not lead to losses on other traits. On the other hand considering the individuals level do provide additional genetic gains whatever traits.

Discussion

Groundnut grown in the Sahel is very often affected by water deficit occurring during the pod-filling phase, which usually coincides with the end of the rainy season (Khalfaoui, 1991a; Nageswara Rao et al., 1985), the rainy season 1998 constituted a good representation of this situation. In addition to a decrease of the production, the major effect of the drought is to create a very strong variability of phenotypical responses depending notably on micro-variations of the soil structure. These spatial and micro-spatial variations in annual plants performances are the main characteristic of variety responses under drought (Williams, 1992; Richard, 1996; Ntare, 1999; Turner et al. 2001). The functional relationships between characters, reflected by the correlations of the environmental effects are especially useful in this context. The fact that the environmental effect on maturity correlates well with the one on pod-yield whereas additive effects of both variables were not correlated may explain difficulties to identify favourable traits (Subbarao et al., 1995) and to distinguish genetic effects and physiological relations in the breeding process for drought adaptation (Khalfaoui, 1990a).

The absence of correlation of the GCA effects between pod-yield and Mat on the one hand, and between Shelling and 100-K on the other hand, poses a particular problem for groundnut breeding. Low values of the maturity percentage lead to aflatoxin contamination that depreciates strongly the product as food and for the foreign markets (Mehan et al., 1995; Holbrook et al., 2000). High shelling percentage and kernel size (assessed by 100-K) give an increased commercial value to the product. However but both traits are rarely joined in the same genotype for co-evolutionary reasons within subspecies *hypogaea* (Virginia) and *fastigiata* (Spanish) (Gregory and Gregory, 1976; Isleib and al., 1994; Upadhyaya, 2003b). In addition, since the SCA correlation between pod and haulm-yields is low it would be difficult as well to increase the pod and haulm yields together using a single cross.

All traits seem mainly controlled by dominance. This may be explained by the fact that as the diversity between parents increases, the dominance and epistatic variation have a significant roles in the inheritance of quantitative traits (Halward and Wynne, 1991; Swamy et al., 2003). But this dominance may be due to the confounding of ASC and genetic derive. In case of high dominance the more efficient breeding method should be based on hybrid production however the strict autogamy and the difficulty in making crosses don't allow hybrid diffusion for groundnut. This re-enforces the general recommendation made that multiallelic combinations developed for a given habitat should be preserved. Intra-population genetic enhancement, as recurrent selection, constitutes an alternative able to exploit the genetic interactions observed. Major dominance effects are also due to strong environmental variability. Then, effort must be done to control the homogeneity of drought pressure. The 100-P and 100-S ecovalences are strongly correlated with the one of pod-yield, respectively 0.856 and 0.688 (results not shown), therefore the unsteady genotypes for fruit size will also be unsteady for pod-yield. In other words, when the fruit size does not vary according to the environment, the pod-yield will probably more stable. This probably depends on the potential size of the fruit that not must be excessively high in drought-prone area.

Prediction of one trait by another assessed by *CPGs* provided indication on genetic and also environmental associations since the environmental variance is involved in the calculation formula. The main conclusion concerns the negative relationship between haulm-yield and maturity which indicates that large vegetative aerial development is not associated with an adequate maturation under drought stress. Previously observed weak environmental correlation between haulm-yield and Mat gives more significance to this observation. This negative effect of Haulm selection on Mat which corroborates the negative GCA and SCA correlation of trait creates a particular difficulty for dual-purpose groundnut (fodder and seed production) largely appreciated in semi-arid zone (Dhéry et al., 1987; Clavel and Annerose, 1997; Omokanye et al., 2001). This is maybe partly due to differences existing in cycle duration of the lines which were not totally compensated by additional watering and delayed harvesting. However these important phenotypic correlations are more probably caused by existing co-adapted gene complexes within the

groundnut botanical subspecies *hypogaea* (Virginia) or *fastigiata* (Spanish) involved in the initial population (Upadhyaya, 2003a). In effect Spanish type are largely recognised to have shorter cycle duration and maturation and smaller pods than the Virginia type which have generally larger aerial part (Isleib et al., 1994; Schilling, 1996; Stalker, 1997).

Selection indices constructions showed that with a selection pressure of 5% it can be expected high and balanced genetic gains on the three more important agronomic trait on groundnut, pod and haulm yields and percentage of maturity of pods. However selection pressure on Haulm had negative impact on Mat. This response could be expected considering the negative *CGP* between haulm-yield and Mat. These predictions are superior that hope considering the low heritabilities values. This is attributed to the multi-character selection advantage but also agrees with an inheritance study on groundnut under drought that concluded that in some cases selection based on yield alone would be effective (Ntare, 1999). Individual-family selection seems to not improve the genetic gains compared to the family selection. This can be explained by the fact that the genetic values of families include individuals and related individuals in their calculations.

Conclusion

Intricate features between effects concerning genetic (breakable) and non genetic correlations (unbreakable) on production and quality characters cause to be difficult the choice of variable to combine for improving drought adaptation which normally implies yield quality. The selection indices computations indicated that a selection pressure on pod-yield was the more efficient way to improve pod and haulm-yield without depreciate the quality of pods. On the contrary if the selection is targeted on Haulm, the genetic gain will be high on Haulm but limited on Pod and negative on quality of seed. The rupture of these characters relationship will be difficult because they probably are under control of co-adapted gene-complexes strongly related due to the subspecies origin and drought stress selection pressure. Considering the current practise dual-purpose for groundnut in the Sub-Sahel area and high level of risk of aflatoxin contamination the recommended a breeding strategy will consist to breed for the higher pod-yield associated to the adequate maturation. A better way would consist in releasing two kinds of vegetal materials:

varieties presenting high haulm-yield associated with little size but good quality of kernel and varieties having high pod-yield probably poor haulm-yield and acceptable quality of seed.

Table 3. Analysis of variance of groundnut S1 families from the half diallel 37 x 37 for ten agronomic traits measured under end-of-season water deficit conditions

Factor	Block	Family	Interaction	Intra-plot	Mean
Df.	26	72	327	1417	
Traits ¹					
Tot	14125 11.19 ***	9327 7.39 ***	1875 1.49 ***	1262	89.16
Pod	2906 14.33 ***	1303 6.42 ***	262 1.29 ***	203	31.82
Haulm	4756 7.28 ***	5538 8.48 ***	954 1.46 ***	653	57.34
Nb-Pod	5014 12.34 ***	2562 6.31 ***	500 1.23 ***	406	46.60
Nb-Seed	6202 10.75 ***	4267 7.40 ***	831 1.44 ***	577	47.73
Mat	965 3.00 ***	3254 10.01 ***	435 1.35 ***	322	53.47
Shelling	140 4.71 ***	343 11.55 ***	38 1.29 ***	30	66.64
SMK	392 3.01 ***	793 6.10 ***	183 1.41 ***	130	52.19
100-K	113 2.86 ***	835 7.40 ***	51 1.28 ***	40	35.94
100-P	953 5.72 ***	4855 21.06 ***	235 1.41 ***	166	68.97

¹ total weight (Tot), pod-yield (Pod), haulm-yield (Haulm), number of pods (Nb-pod), number of seeds (Nb-seed), percentages of maturity (Mat), shelling (Shelling) and sound mature kernel (SMK), 100-kernel weight (100-K) and 100 pods weight (100-P)

line 1:MS; line 2:F value; line 3:Probability that $F > H_0$ (*, **, *** for 5, 1 and 0.1% of risk error, respectively)

Table 4. Matrix of the correlations of GCA effects of groundnut S1 families from the half diallel 37 x 37 for ten agronomic traits measured under end-of-season water deficit conditions

Traits ¹	Tot	Pod	Haulm	Nb Pod	Nb Seed	Mat	Shelling	SMK	100-K	100-P
Tot	1.000 0.000 ***									
Pod	0.805 0.066 ***	1.000 0.000 ***								
Haulm	0.969 0.013 ***	0.633 0.115 ***	1.000 0.000 ***							
Nb-Pod	0.674 0.107 ***	0.853 0.082 ***	0.524 0.139 *	1.000 0.000 ***						
Nb-Seed	0.322 0.122 *	0.821 0.071 ***	0.078 0.138 n.s	0.889 0.044 ***	1.000 0.000 ***					
Mat	- 0.302 0.160	0.178 0.183 n.s	-0.468 0.143 *	0.382 0.168 *	0.671 0.104 ***	1.000 0.000 ***				
Shelling	- 0.123 0.134	0.285 0.156 n.s	-0.279 0.120 *	0.187 0.168 n.s	0.556 0.109 ***	>1 ***	1.000 0.000 ***			
SMK	- 0.155 0.146	0.424 0.159 *	-0.379 0.131 **	0.506 0.172 **	0.829 0.093 ***	0.921 0.087 ***	0.905 0.052 ***	1.000 0.000 ***		
100-K	0.448 0.165 *	0.242 0.210 n.s	0.483 0.166 *	-0.300 0.199 n.s	-0.209 0.190 n.s	-0.366 0.199 n.s	0.062 0.160 n.s	-0.181 0.211 n.s	1.000 0.000 ***	
100-P	0.449 0.195 *	0.497 0.212 *	0.378 0.199 n.s	-0.026 0.268 n.s	0.121 0.231 n.s	-0.174 0.246 n.s	0.480 0.203 *	0.149 0.230 n.s	>1 ***	1.000 0.000 ***

¹total weight (Tot), pod-yield (Pod), haulm-yield (Haulm), number of pods (Nb-pod), number of seed (Nb-seed), percentages of maturity (Mat), shelling (Shelling) and sound mature kernel (SMK), 100-kernel weight (100-K) and 100 pods weight (100-P)

line:correlation coefficient (r); line 2:Standard Error; line 3:confidence level of probability that r is different from 0, noted *, **,*** for 5, 1 and 0.1 %, respectively, n.s is non significant.

Table 5. Matrix of the correlations of environmental effects of groundnut S1 families from the half diallel 37 x 37 for ten agronomic traits measured under end-of-season water deficit conditions

Traits ¹	Tot	Pod	Haulm	Nb Pod	Nb Seed	Mat	Shelling	SMK	100-K	100-P
Tot	1.000 0.000 ***									
Pod	0.828 0.014 ***	1.000 0.000 ***								
Haulm	0.951 0.004 ***	0.614 0.027 ***	1.000 0.000 ***							
Nb-Pod	0.826 0.017 ***	0.965 0.009 ***	0.631 0.028 ***	1.000 0.000 ***						
Nb-Seed	0.696 0.022 ***	0.886 0.010 ***	0.491 0.031 ***	0.839 0.011 ***	1.000 0.000 ***					
Mat	0.169 0.037 ***	0.256 0.035 ***	0.097 0.039 *	0.180 0.038 *	0.325 0.032 ***	1.000 0.000 ***				
Shelling	-0.049 0.041 n.s.	0.081 0.039 *	-0.113 0.041 **	0.030 0.039 n.s.	0.257 0.033 ***	0.569 0.033 ***	1.000 0.000 ***			
SMK	-0.056 0.034 n.s.	0.080 0.034 *	-0.124 0.033 **	-0.026 0.035 n.s.	0.386 0.028 ***	0.544 0.028 ***	0.679 0.023 ***	1.000 0.000 ***		
100-K	-0.023 0.058 n.s.	0.085 0.058 n.s.	-0.079 0.059 n.s.	0.110 0.057 n.s.	0.086 0.058 n.s.	0.488 0.067 ***	0.353 0.071 ***	0.434 0.051 ***	1.000 0.000 ***	
100-P	0.217 0.086 *	0.437 0.086 *	0.064 0.091 n.s.	0.380 0.126 **	0.677 0.146 ***	0.677 0.149 ***	0.539 0.139 **	0.739 0.145 ***	0.179 0.173 n.s.	1.000 0.000 ***

¹total weight (Tot), pod-yield (Pod), haulm-yield (Haulm), number of pods (Nb-pod), number of seeds (Nb-seed), percentages of maturity (Mat), shelling (Shelling) and sound mature kernel (SMK), 100-kernel weight (100-K) and 100 pods weight (100-P)

line 1:correlation coefficient (r); line 2:Standard Error; line 3:confidence level of probability that r is different from 0, noted *, **,*** for 5, 1 and 0.1 %, respectively

Table 6. Percentage of additivity of the genetic variance and heritabilities of groundnut S1 families from the half diallel 37 x 37 for ten agronomic traits measured under end-of-season water deficit conditions

Param. ¹	Tot	Pod	Haulm	Nb Pod	Nb Seed	Mat	Shell.	SMK	100-K	100-P
σ^2_a (%)	48.9	33.0	48.2	34.0	42.9	37.0	40.1	54.7	17.9	11.6
h^2_{bs}	0.30	0.30	0.34	0.29	0.32	0.42	0.46	0.25	0.77	0.92
h^2_{ns}	0.15	0.10	0.16	0.1	0.14	0.16	0.19	0.14	0.14	0.11

¹ σ^2_a (%): percentage of additivity in the genetic variance; h^2_{bs} : broad sense heritability; h^2_{ns} : narrow sense heritability

All estimates of heritability coefficients are significantly ($P < 5\%$) different from 0

Table 7. Narrow sense Coefficients of Genetic Prediction (CPGs) of groundnut S1 families from the half diallel 37 x 37 for ten agronomic traits measured under end-of-season water deficit conditions

Traits ¹	Tot	Pod	Haulm	Nb Pod	Nb Seed	Mat	Shell.	SMK	100-K	100-P
Tot	0.148 0.029 ***									
Pod	0.097 0.025 ***	0.099 0.029 ***								
Haulm	0.150 0.030 ***	0.080 0.023 ***	0.163 0.032 ***							
Nb-Pod	0.081 0.023 ***	0.084 0.024 ***	0.066 0.024 ***	0.098 0.028 ***						
Nb-Seed	0.056 0.022 *	0.095 0.026 ***	0.012 0.021 n.s.	0.102 0.026 ***	0.135 0.029 ***					
Mat	-0.046 0.023 *	0.022 0.025 n.s.	-0.075 0.022 ***	0.047 0.024 *	-0.022 0.031 n.s.	0.157 0.030 ***				
Shell.	-0.020 0.022 n.s.	0.039 0.023 n.s.	-0.049 0.023 *	0.025 0.024 n.s.	0.088 0.024 ***	0.197 0.025 ***	0.186 0.000 ***			
SMK	-0.022 0.021 n.s.	0.049 0.022 **	-0.057 0.021 **	-0.059 0.021 **	0.113 0.023 ***	0.135 0.023 ***	0.145 0.026 ***	0.138 0.026 ***		
100-K	0.064 0.027 *	0.028 0.028 n.s.	0.072 0.027 ***	-0.035 0.026 n.s.	-0.029 0.027 n.s.	-0.054 0.029 *	0.010 0.026 n.s.	-0.025 0.028 n.s.	0.138 0.040 ***	
100-P	0.056 0.029 n.s.	0.051 0.031 n.s.	0.050 0.028 *	-0.003 0.028 n.s.	0.014 0.028 n.s.	-0.022 0.031 n.s.	0.067 0.027 *	0.018 0.029 n.s.	0.124 0.039 ***	0.106 0.044 *

¹total weight (Tot), pod-yield (Pod), haulm-yield (Haulm), number of pods (Nb-pod), number of seed (Nb-seed), percentages of maturity (Mat), shelling (Shell.) and sound mature kernel (SMK), 100-kernel weight (100-K) and 100 pods weight (100-P)

line 1:CPG estimated at the narrow sense; line 2:Standard Error; line 3:confidence level of probability that CPG is different from 0, noted *, **,*** for 5,1 and 0.1 %, respectively

Diagonal CPGs are the h^2_{ns} (prediction of the genetic value of the trait by its own phenotypical value)

Table 8. Expected genetic gains (in %) for the five target traits with a selection pressure of 5% and the relative weights of each trait by choice of the best hybrid combinations based of the breeding values of the parents

	Trait ¹	Coeff. ²	Expect. ³	LB	UB
Series 1	Pod	1	23.72	22.75	24.67
	Haulm	0	22.17	20.97	23.35
	Mat	0	1.94	0.83	3.04
	Shelling	0	0.91	0.54	1.28
	100-K	0	3.74	2.79	4.69
$r(H,I)^2 = 0.56$				0.56	0.57
Series 2	Pod	0	17.11	16.09	18.12
	Haulm	1	30.72	29.78	31.65
	Mat	0	-9.91	-10.85	-8.99
	Shelling	0	-1.55	-1.88	-1.23
	100-K	0	7.57	6.73	8.41
$r(H,I) = 0.59$				0.58	0.59
Series 3	Pod	0	2.09	0.88	3.28
	Haulm	0	-13.82	-15.09	-12.59
	Mat	1	22.02	21.37	22.68
	Shelling	0	5.36	5.11	5.61
	100-K	0	-0.83	-4.38	-2.63
$r(H,I) = 0.58$				0.57	0.58
Series 4	Pod	0	3.88	2.29	5.44
	Haulm	0	-8.53	-10.32	-6.89
	Mat	0	21.12	20.43	21.82
	Shelling	1	5.59	5.31	5.85
	100-K	0	-0.83	-1.83	0.17
$r(H,I) = 0.58$				0.58	0.59
Series 5	Pod	0	8.09	5.99	10.18
	Haulm	0	21.21	18.97	23.44
	Mat	0	-7.03	-8.88	-5.19
	Shelling	0	-0.42	-0.94	0.09
	100-K	1	10.97	10.20	11.74
$r(H,I) = 0.49$				0.48	0.50
Series 6	Pod		18.50	17.29	19.71
	Haulm		14.45	12.94	15.96
	Mat		12.58	11.62	13.54
	Shelling		3.84	3.52	4.16
	100-K		3.72	2.74	4.71
$r(H,I) = 0.57$				0.56	0.58

¹ Traits are pod-yield (Pod), haulm-yield (Haulm), percentages of maturity (Mat), shelling percentage (Shelling), and 100-kernel weight (100-K)

² Coeff. is the coefficient of the trait in the indice calculation

³ Expect. is expected genetic gains with indications of LB and UB (lower and upper bonds)

⁴ $r(H,I)$ is the correlation coefficient between the maximum genetic gain and the indice for each indice calculation series

References

- Annerose, D. J. M., 1991. Characterisation of agricultural drought in semi-arid zones. II. Assessment of agricultural drought forms in Senegal by simulation of the crops water balance. *Oleagineux* 46: 61-67.
- Baradat, P., 1976. Use of juvenile-mature relationships in individual selection including information from relatives. in: IUFRO (Ed.), *Proceeding of IUFRO Meeting on advanced generation breeding*, pp.121-138, Bordeaux.
- Baradat, P. & T. Labbé, 1995. OPEP. Un logiciel intégré pour l'amélioration des plantes pérennes. in: CIRAD (Ed.), *Traitement statistique des essais de sélection*, pp.303-330, Montpellier.
- Baradat, P., T. Labbé & J. Bouvet, 1995. Conception d'index pour la sélection réciproque récurrente. Aspects génétiques, statistiques et informatiques. in: CIRAD (Ed.), *Traitement statistique des essais de sélection. Stratégies d'amélioration des plantes pérennes*, pp.101-150, Montpellier.
- Baradat P. & T. Perrier, 2003. Papadakis++. Un ajustement multi-dimensionnel du phénotype à l'environnement. Notice d'utilisation du logiciel. Document de l'UMR INRA-CIRAD AMAP, Montpellier, 123 pp.
- Belhassen, E., D. This & P. Monneveux, 1995. L'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. *Cahiers Agricultures* 4: 251-261.
- Clavel, D. & D. J. Annerose, 1997. Breeding groundnut for drought adaptation in Senegal. *International Arachis Newsletter* 17: 33-35.
- Clavel, D. & J. Gautreau, 2001. Groundnut. in: CIRAD and Science Publishers (Eds.), *Tropical Plant Breeding*, pp.246-266, Plymouth.
- Dagnélie, D., 1989. The method of Papadakis in agricultural experimentation. An overview. *Revue Générale d'Agronomie* 7: 298-362.
- Dhéry, M., J. Ogier & E. G. Ducarne, 1987. L'arachide, une spéculation intéressante pour les périmètres irrigués de la zone soudano-sahélienne. *Oléagineux* 42: 119-122.
- Garretsen, F. & M. Keuls, 1977. A general method for the analysis of genetic variation in complete and incomplete dialleles and North Carolina 2 designs. Part I. Procedures and general formulas for the random model. *Euphytica* 26: 537-551.
- Griffing, B., 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallele crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 463-493.
- Halward, T. & J. C. Wynne, 1991. Genetation means analysis for productivity in two diverse peanut crosses. *Theor. Appl. Genet.* 82: 784-792.
- Henderson, C. R., 1977. Prediction of future records. in: The Iowa State University Press (Ed.), *Proc. Intern. Conf. on Quantitative Genetics*, 16-21 August 1976, pp.615-638.
- Holbrook, C. C., C. K. Kvien, K. S. Rucker, D. M. Wilson, K. S. Rucker, C. S. Kvien, J. E. Hook & M. E. Matheron, 2000. Preharvest aflatoxin contamination in drought-tolerant and drought-intolerant peanut genotypes. *Peanut Sci.* 27: 45-48.
- Khalfoui, J. L. B., 1990. Genetic adaptation to drought of cultivated species and consequences on plant breeding. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 137: 125-137.
- Khalfoui, J. L. B., 1991a. Determination of potential lengths of the crop growing period in semi-arid regions of Senegal. *Agric. For. Meteorol.* 55: 351-263.
- Khalfoui, J. L. B., 1991b. Approche de l'amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse. Cas de l'arachide au Sénégal. in: Aupelf-Uref (Ed.), *Amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, pp.51-63, Paris.
- Lebart, L., A. Morineau & J. P. Fénelon, 1979. *Traitement des données statistiques*. Dunod (Ed.), 510 pp.
- Mehan, V. K., N. Ramakrishna, R. C. Nageswara Rao & D. Mc Donald, 1995. Preharvest Aflatoxin contamination of groundnuts subjected to terminal drought stress in postrainy season. *Mycotoxin Research* 11: 103-109.
- Monteverde-Penso, E., J. C. Wynne, T. G. Isleib & R. W. Mazingo, 1987. A comprehensive breeding procedure utilizing recurrent selection for peanut. *Peanut Sci.* 14: 1-3.

- Nageswara Rao, R. C., Sardar Singh, M. K. V. Sikavumar, K. L. Srivastava & J. H. Williams, 1985. Effect of water deficit at different growth phases of peanut. I. Yield responses. *Agron. J.* 77: 782-786.
- Nei, M., 1960. Studies on the application of Biometrical Genetics to plant breeding. in: (Ed.), *Memoirs of the College of Agriculture of Kyoto University*, vol 32, pp.100, Kyoto.
- Ntare, B. R., 1999. Early generation testing for yield and physiological component in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica* 107: 141-147.
- Ntare, B. R., J. H. Williams & F. Dougbedji, 2001. Evaluation of groundnut genotypes for eat tolerance under field conditions in Sahelian environment using a simple physiological model for yield. *J. Agric. Sci.* 136: 81-88.
- Papadakis, J., 1937. Méthode statistique pour les expériences au champ. *Bulletin scientifique d'amélioration des plantes de Thessalonique* 23: 30.
- Papadakis, J., 1940. Comparaison de différentes méthodes d'expérimentation phytotechnique. *Revue Générale d'Agronomie* 7: 298-362.
- Pichot, C. 1993. Variabilité au stade adulte de *Populus trichoderma* et prédiction juvénile-adulte chez *P. trichocarpa* et *P. deltoides*., INA-PG, Paris.
- Richards, R. A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul.* 20: 157-166.
- Saporta, G., 1990. Probabilités, analyse des données et statistiques. Technip (Ed.), Paris, 493 pp.
- Searle S.R., 1987. Linear models for unbalanced data. Wiley (Ed.): 536 pp.
- Swamy, B. P. M., H. D. Upadhyaya, P. V. K. Goudar, B. Y. Kullaiswamy & Sube Singh, 2003. Phenotypic variation for agronomic characteristics in a groundnut core collection for Asia. *Field Crops Res.* 84: 359-371.
- Turner, N. C., G. C. Wright & K. H. M. Siddique, 2001. Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Adv. Agron.* 71: 193- 231.
- Upadhyaya, H. D., 2003. Phenotypic diversity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) core collection assessed by morphological and agronomical evaluations. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50: 539-550.
- Upadhyaya, H. D., R. Ortiz, P. Bramel & Sube Singh, 2003. Development of a groundnut core collection using taxonomical, geographical and morphological descriptors. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50: 139-148.
- Van Buijtenen, J. P., 1992. Fundamental Genetic Principles. in: Fins, L., Friedman, T. & Brotschol, V. (Ed.), *Handbook of Quantitative Forest Genetic*, pp.403, Dordrecht.
- Williams, J. H., 1992. Concepts for the application of crop physiological models to crop breeding. in: Nigam, S. (Ed.), *Groundnut - A Global Perspective: Proceedings of an International Workshop ICRISAT Center*, pp.345-352, Patancheru, India.
- Williams, J. H. & J. S. Drexler, 1981. A nondestructive method for determining peanut pod maturity. *Peanut Sci.* 8: 134-141.

2.2. Synthèse des résultats

2.2.1. Contrôle génétique des caractères

L'analyse du plan de croisement en demi diallèle incomplet de Pop 3 a été réalisée selon le modèle aléatoire de Garretsen et Keuls (1977). Les résultats ont concerné 10 caractères agronomiques considérés comme les plus importants sur l'arachide. Des corrélations importantes entre les effets additifs (AGC, Aptitude Générale à la Combinaison) du rendement en gousses et ceux de certains autres caractères ont été mises en évidence. Cependant les effets additifs, donc héréditaires, des rendements en gousses n'ont pas été corrélés avec ceux des taux de maturité, du coefficient au décorticage et de la taille des graines, caractères de qualité très importants sur l'arachide. Dans le même temps ces effets étaient très liés entre eux pour ces trois derniers caractères. Par ailleurs, les relations fonctionnelles entre caractères, bien traduites par les corrélations des effets environnementaux, ont montré que rendement et maturité étaient les deux variables les plus affectées par les micro variations environnementales alors que l'absence de corrélation d'AGC entre ces caractères signifie qu'une pression exercée sur l'un de ces caractères n'entraînerait pas forcément d'effet positif sur l'autre. Des relations complexes sur le contrôle génétique ont donc été mises en évidence sous la contrainte hydrique. Elles soulignent le risque d'exercer une pression de sélection sur le rendement uniquement sans contrôler les caractères qualitatifs et notamment la maturité. En effet si le rendement est privilégié et que des valeurs basses sur les taux de maturité sont obtenues, cela pose un problème particulier sur l'arachide, celui du danger important de contamination par l'aflatoxine. Cette toxine très puissante rend la consommation du produit très dangereuse pour la santé et son exportation impossible (Mehan *et al.*, 1995 ; Holbrook *et al.*, 2000).

La plupart des caractères mesurés ont montré un contrôle génétique majoritairement dominant et non additif ce qui devrait conduire à privilégier la sélection d'hybrides et à éviter la sélection généalogique. Or, du fait de la stricte autogamie de l'arachide et de la difficulté d'obtenir des populations de sélection, la pratique courante sur arachide est orientée vers la sélection généalogique à partir de croisements simples. A cet égard, la sélection récurrente qui permet dans une certaine mesure de tirer bénéfice des effets de dominance, est donc intéressante. Néanmoins ces effets de dominance pourraient être liés à

la diversité génétique entre les parents d'origine et aux fortes interactions environnementales. Dans notre plan de croisement particulier, les composantes de la dominance ont probablement été majorées par le fait que les 1 à 3 individus choisis au hasard pour le passage en S1 n'étaient pas forcément représentatifs du croisement initial ce qui a entraîné une « derive génétique ». Ainsi, dans la suite de l'étude, seules les prédictions et espérances de gains génétiques au sens large prenant en compte l'additivité. Il est néanmoins important que les effets micro-environnementaux qui entraînent le même type de biais soient diminués par des dispositifs d'étude et d'analyse spécialement adaptés, ce qui semble difficile à réaliser en conditions de sécheresse.

2.2.2. Prédiction génétique d'un caractère par un autre

La qualité de la prédiction génétique d'un caractère par un autre a été évaluée par le calcul de coefficient de prédiction génétique au sens strict (CPG, Nei, 1960 ; Baradat, 1976). Le CPG fournit des indications sur les relations génétiques mais aussi environnementales qui lient les caractères. La principale conclusion tirée des calculs de CPG concerne la relation négative entre le poids de gousses et de fanes avec la maturité des gousses. Ce résultat indique qu'une biomasse aérienne importante est souvent associée à une mauvaise maturité des gousses. Ce point, comme le précédent sur les corrélations d'AGC, pose un problème pratique. Dans les zones à faible potentiel agricole comme le Sahel, la demande sociale est très forte sur des produits à utilisations multiples, à la fois fourrage pour le bétail, huile artisanale pour la consommation humaine et produit de rente pour l'industrie de transformation en huile. Ces résultats montrent qu'un programme de sélection visant la création d'une arachide à usage mixte trouverait rapidement ses limites.

2.2.3. Index de sélection

Les constructions d'index de sélection sur les cinq principaux caractères agronomiques et technologiques de l'arachide (poids de gousses, de fanes, taux de maturité, coefficient au décorticage et taille des graines) ont indiqué qu'une pression de sélection exercée sur le rendement en gousses était la voie la plus efficace pour améliorer ce même rendement en gousses. Les calculs d'index ont montré par ailleurs, qu'une pression de sélection exercée sur le rendement en gousses permettrait aussi d'améliorer significativement le poids de fanes et le taux de maturité malgré l'absence de corrélation d'effets génétiques mise en évidence précédemment par le calcul direct. Ces estimations de gains génétiques réalisées

par le calcul d'index montrent que l'on peut obtenir une amélioration du rendement et de la maturité simultanément si la sélection s'exerce sur le rendement uniquement, en dépit des faibles héritabilités des caractères considérés. Il faudra néanmoins accorder une attention particulière aux caractères qualitatifs pour éviter leur dérive car ils sont hérités indépendamment du rendement en gousses. En revanche si la sélection est ciblée sur le poids de fanes, la qualité des graines sera dépréciée, ce qui confirme le résultat précédent sur les CPG. Dans le cas d'une utilisation mixte des produits arachidiers, il semble donc que deux types variétaux distincts doivent être proposés aux utilisateurs afin d'optimiser les gains génétiques.

Sur le plan méthodologique, les calculs d'index ont montré que les sélections combinées individus-familles, qui exigent des mesures individuelles et non des moyennes familiales des caractères, n'amélioreraient pas les gains génétiques attendus par rapport à des mesures familiales. Ce résultat doit être pondéré car les valeurs génétiques intervenant dans le calcul d'index ont tenu compte de la valeur des caractères sur les individus et sur leurs apparentés.

2.3. Conclusion

Cette étude a permis de confirmer que les héritabilités au sens strict des caractères agronomiques sous contrainte hydrique étaient faibles. Dans le cadre d'une sélection directe sur caractères agronomiques, le moyen le plus sûr d'améliorer le rendement en gousses est d'exercer une pression sur le rendement en gousses lui-même en contrôlant leur maturité. En revanche, une forte pression sur la biomasse aérienne entraînera une forte baisse de la qualité des graines et notamment une baisse de leur niveau de maturité.

Sur le plan appliqué, ce programme a eu des retombées sur le développement agricole. Afin de satisfaire à une demande en cultivars améliorés, des sélections généalogiques ont démarré dès le deuxième cycle de sélection. Elles ont permis la diffusion de 4 nouvelles variétés dont le rendement et/ou la qualité est supérieure aux anciens cultivars dans le circuit de la production de semence.

CHAPITRE 3

CARACTERES ASSOCIES A LA PRODUCTION EN CONDITIONS DE DEFICIT HYDRIQUE DE FIN DE CYCLE

3.1. Introduction

Dans le Nord et le Centre du Sénégal la pluviométrie a été très réduite depuis les sécheresses intervenues dans les années soixante-dix (Figure 4, chapitre 1). Les saisons des pluies (appelées hivernages) sont également devenues plus courtes : les pluies démarrent souvent plus ou moins tôt en juillet pour se terminer en début octobre. Le schéma le plus fréquent est un retard dans le démarrage des pluies qui ne laisse alors plus qu'une cinquantaine jours d'alimentation hydrique correcte pour les plantes car les fins d'hivernage sont régulièrement observées en tout début octobre (Sikavumar, 1988). L'arachide dont la résistance à la sécheresse est largement reconnue est l'espèce la plus cultivée dans la partie la plus sèche du « Bassin Arachidier » sénégalais. Son cycle théorique de culture a donc été réduit et de ce fait elle est généralement cultivée en conditions de déficit hydrique de fin de cycle (Annerose, 1988; Ndunguru *et al.*, 1995).

Le travail de création variétale conduit au Sénégal a permis de proposer cinq nouvelles variétés précoces possédant un rendement amélioré en conditions de déficit hydrique en fin de cycle par rapport au témoin 55-437. La variété 55-437 a été développée au Sénégal en 1955, son excellente adaptation à la sécheresse en fait un cultivar encore aujourd'hui largement utilisé dans les pays du Sahel (Greenberg *et al.*, 1992 ; Ndunguru *et al.*, 1995). Les nouvelles lignées, d'un cycle équivalent ou plus court que celui de 55-437, ont été évaluées durant plusieurs années dans les conditions naturelles des hivernages notamment au niveau de la station expérimentale de Bambey (14,42°N et 16,28°W) située au cœur de la zone ciblée entre les isohyètes 300 et 500 mm (Figure 4, chapitre I). Le comportement agronomique de ces nouvelles variétés était connu mais les distinctions fines sur la phénologie, le développement foliaires et les caractères physiologiques restaient à préciser notamment dans des conditions de bonne alimentation hydrique.

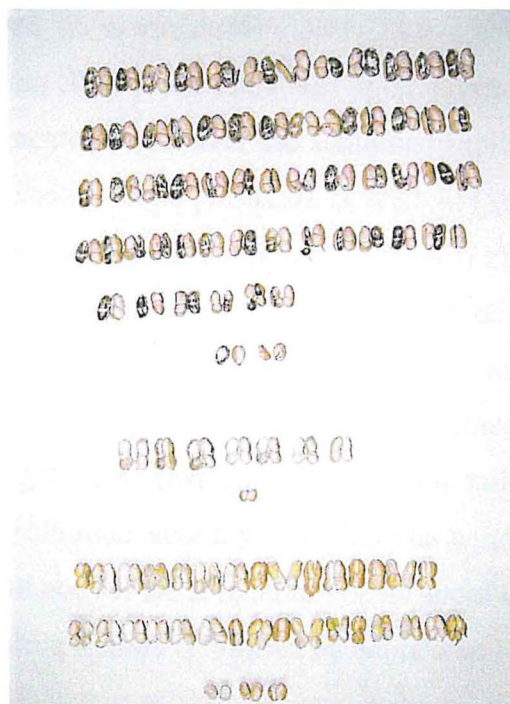
L'objectif de l'étude conduite était de comparer les génotypes au plan phénologique, développemental et physiologique en condition d'alimentation hydrique contrôlée au champ (irrigation d'appoint et suivi du statut hydrique du sol) et de préciser les conditions d'expression des différences variétales en termes de période de mesure. L'étude a porté sur l'expression de la précocité (floraison et maturité), les rendements et certains caractères liés au rendement (répartition des assimilats vers les gousses, *p*, et indices de résistance-sensibilité au stress), la qualité des gousses produites, l'indice foliaire et la transpiration.

Planche III. 1) Prélèvements de disques foliaires sur une arachide de 70 jours pour la mesure des CRE, 2) Analyse de la maturité des gousses après la récolte (gousses mures en haut et gousses immatures en bas), 3) Variétés SR1-4 (premier plan) et Fleur 11, 10 jours avant récolte (photos Clavel)

1)



2)



3)



Les corrélations entre les caractères mesurés et les rendements ou les indices de résistance-sensibilité au stress ont été calculés afin de déterminer si les traits considérés pouvaient être utilisés comme critère de sélection sur l'arachide (planche III).

Cette étude a fait l'objet d'un article intitulé « Potential agronomic and physiological trait of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions », par Danièle Clavel, Benoît Sarr, Edouard Marone et Rodomiro Ortiz, publié dans **Agronomie**.

Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions

Danièle CLAVEL^{a*}, Benoît SARR^b, Edouard MARONE^c, Rodomiro ORTIZ^d

^a Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, TA70/01, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^b Centre AGRHYMET/CILSS, BP 11011, Niamey, Niger

^c CERAAS, BP 3320, Thiès-Escale, Senegal

^d IITA, c/o L.W. Lambourn and Co, Carolyn House, 26 Dingwall Road, Croydon, CR9 3EE, UK

(Received 16 June 2003; accepted 8 January 2004)

Abstract – Groundnut grown in the Sahel is often exposed to end-of-season drought. The aim of this study was to identify traits associated with yield variation during end-of-cycle water deficit, which could be used as selection criteria. Five new selected Spanish varieties (80–90 days) were compared with the check cultivar, 55-437. Earliness and general adaptation of the varieties did not impair the expression of significant genetic variation for some traits relative to flowering, productivity and physiology. The partitioning coefficient (p) and yield under water stress conditions of the five varieties were higher than those of cultivar 55-437. The water deficit affected leaf area index, relative water content and transpiration at about 2 weeks after the occurrence of water deficit at the soil level. Since genotypic differences seemed to be greatest at this time, measuring physiological traits during this period may provide useful information for breeding early groundnut varieties under end-of-season water deficit conditions.

Spanish groundnut / drought adaptation / end-of-season water deficit / selection criteria / traits variation

1. INTRODUCTION

Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is a major oilseed and cash crop in the Sahel. It is cultivated mainly during the rainy season, characterised by low rainfall ranging between 300 and 600 mm, poor rainfall distribution and high variation. The growing season is short, starting more or less early in July and ending regularly in early October [22]. This short growing season is a consequence of the significant reduction in the length of the rainy season, which since 1970 has been linked to the deteriorating rainfall conditions in the Sahel [13]. In this context, groundnut is mainly cultivated under water-limited environments [23].

Water deficit stress occurring during the seed-filling phase has been observed to cause the greatest reduction in groundnut pod yield [14]. Stress occurring at the pod-development phase is found to be detrimental to several physiological and biochemical processes [17]. Groundnut grown in the Sahel is very often affected by water deficit occurring during the pod-filling phase, which usually coincides with the end of the rainy season [19]. If selection is based only on drought-escape mechanisms, which are mainly provided by the genotype's earliness, yield would be limited particularly under abundant rainfall conditions. The development of groundnut cultivars that withstand water deficit stress better during the pod-formation and pod-

filling stages is therefore an important research objective for this region.

A wide range of putative selection criteria that could be used to increase drought tolerance in plants is available. There are, however, very few examples of success obtained using physiological traits in breeding programmes [25]. The main reason for this is that few of these traits have been studied in terms of their functional significance to seed yield [2, 25]. In addition, screening techniques using these traits have usually proved to be laborious and costly [20, 25]. Physiological traits that contribute to drought resistance in groundnut have, however, been identified [18, 28, 15], but they have had very little relevance to breeders. The approach developed here therefore focuses on testing a range of agronomic and physiological traits in order to identify those that could be useful for selecting drought-tolerant genotypes under the targeted environment.

Research work conducted in Senegal has led to the creation of early groundnut cultivars through precocity transfer and association of favourable physiological and agronomic traits using recurrent selection [5]. The aim of the present study is to refine the comparative assessment of yield, phenological, physiological and seed quality traits under both end-of-cycle drought and well-watered conditions. The extent of the variation of these traits between genotypes, and their relationship to grain

* Corresponding author: clavel@cirad.fr

Table I. General description of the six Spanish groundnut varieties from Senegal studied in the experiment conducted in 1994, 1995 and 1996.

Variety designation	Origine	Botanical classification	Cycle duration ²	Pedigree	Comments
55-437	Isra-Cirad ¹	Spanish	90	Unknown: ancient selection (1955)	Commonly cultivated cultivar from Africa
Fleur 11	Isra-Cirad	Spanish	90	Spanish × Virginia (China origin)	Recently released in Central Senegal
GC8-35	Isra-Cirad	Spanish	80	55-437 × Chico (genealogical selection)	Recently released in Northern Senegal
55-114	Isra-Cirad	Spanish	80	55-437 × Chico (back-cross selection)	Experimental line
55-138	Isra-Cirad	Spanish	80	55-437 × Chico (back-cross selection)	Experimental line
SR1-4	Isra-Cirad	Spanish	90	Recurrent selection from a population selected for drought adaptation	Experimental line

¹ Institut sénégalais de recherches agricoles – Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

² In days, from sowing to maturity under rainfed conditions in Senegal.

yield, will be analysed in order to identify useful selection criteria for breeding cultivars with increased yield under drought.

2. MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted during the 1994, 1995 and 1996 rainy seasons in the field, located at the experimental station of the National Centre for Agronomic Research in Bambey, Senegal (14.42°N, and 16.28°W). This is one of the centres of the Senegalese Institute of Agricultural Research (ISRA). The station is situated in the semi-arid zone (isohyets 400–500) of the "Groundnut Basin" of Senegal.

2.1. Plant material

The study was carried out on six early Spanish varieties, all of which were developed in Senegal, within the framework of a European project aimed at improving groundnut adaptation to drought (Tab. I). Three of these varieties have an 80-day (d) cycle and the other three a 90-d cycle. One of the 90-d cycle varieties, cultivar 55-437, commonly grown in the Sahel [11, 19], was used as a check. The others were chosen for physiological studies (1996 experiment) because they generally produced higher yields than 55-437 under natural end-of-cycle drought conditions.

2.2. Experimental conditions

The plants were sown on a sandy (91–94%), ferruginous tropical soil with low clay content (3–6%) which is very frequent in the sub-Saharan region. Two seeds, pre-treated with Granox (Captafol 10%-Benomyl 10%-Carbofuran 20%) to protect them against soil-borne pests and diseases, were hand-planted per hole, at a depth of about 4 cm. Inter- and intra-row spacings were 50 cm and 15 cm, respectively. The seedlings were thinned to one per hole one week after sowing. This corresponds to a sowing density of 133 300 plants/ha. In order not to deviate from the farmers' usual cultural practices for groundnut in the Sahel, no fertiliser was applied. The crop was protected against pests and kept weed-free throughout the study. The 1994 and 1995 comparative variety trials were sown in

mid-July after the first significant rainfall. The varieties were harvested 90 or 80 days after sowing (DAS) according to their precocity group. These dates corresponded to about ten to twenty days after the end of the rains. In the 1996 trial, the sowing date was slightly delayed in order to simulate an end-of-cycle water deficit [19]. Two hand-harvests were carried out on the 11th and 20th November according to the maturity group of the genotypes, corresponding, respectively, to 83 and 92 DAS. The harvested plants were exposed to ambient temperatures of 30 to 35 °C so as to allow complete drying of haulms and pods to less than 5% pod moisture.

2.3. Rainfall pattern and watering regime

The total amount of rainfall recorded during the 1994 and 1995 growing seasons was 494 and 495 mm, respectively. Though these amounts were the same for the two years, differences were observed in their distribution. In 1994, 68 mm of the total amount of rainfall was recorded between 60 and 90 DAS, whereas in 1995, during the same period, 130 mm of the total amount of rainfall was recorded. Thus a higher water deficit was produced at the end of the cycle in 1994. During the 1996 trial, rainfall was supplemented by irrigation using an oscillating ramp system. Before planting, 30 mm of water was supplied to all the plots. The first complementary irrigation was applied 23 DAS. However, plants subjected to water deficit conditions did not receive any complementary irrigation until 84 DAS, when 60 mm of water was supplied only to the 90-day cultivars (Fig. 1b). The total amount of water, including the rainfall three weeks prior to sowing, supplied to the 80-d cycle genotypes was 319 mm for plants subjected to water deficit conditions compared with 494 mm for non-stressed plants (+35%). The total amount supplied to the 90-d cycle genotypes was 379 mm for plants subjected to water deficit conditions against 554 mm for non-stressed plants (+32%) (Fig. 1).

2.4. Experimental design

The 1994 and 1995 trials were arranged in a completely randomised block design with four replicates. The plots consisted of 6.6-m-long rows, with each row containing 41 plants. Data

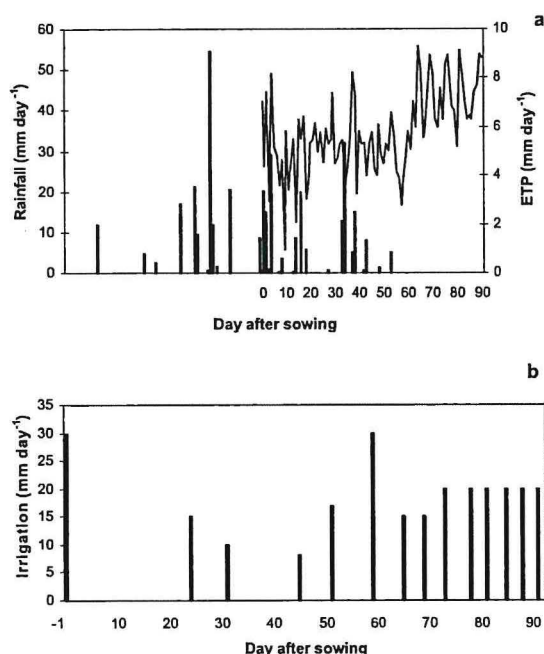


Figure 1. Daily rainfall and evapotranspiration (a), irrigation timing and amounts (b) throughout the 1996 trial.

were collected from the 4 central rows of each plot, corresponding to an area of 12.30 m².

The experimental design of the 1996 trial was a split-plot with three replications. Water treatment at two levels, irrigated and end-of-cycle water deficit, was arranged in main plots. The six varieties were arranged in sub-plots. There was a total of 36 sub-plots consisting of 8.4-m-long rows, with each row containing 27 plants. Data were collected from the 4 central rows of each plot, corresponding to an area of 8.30 m².

2.5. Measurements and observations

Soil moisture measurements were made during the 1996 trial using a neutron probe (Troxler 4300, Laboratories, Research Triangle Park, North Carolina). The probe calibration, based on gravimetric measurements made in the same field, was calculated according to the following formula:

$$HV \text{ (cm}^3 \text{ cm}^{-3}\text{)} = 0.037X - 0.503, (R^2 = 0.94; n = 44),$$

where HV is the soil water content and X the measured neutron count.

Readings were taken weekly through access tubes installed in the central row of each plot, at distances of 10 cm, at a soil depth of between 0.1 and 2.7 m. The degree of soil drying was expressed as the fraction of transpirable soil water (FTSW)

according to the definition of Sinclair and Lecoœur [24] FTSW can be expressed in terms of water availability as follows:

$$FTSW (\%) = \frac{(\text{stock ERD} - \text{stock Pf 4.2})}{(\text{stock Pf 3} - \text{stock Pf 4.2})},$$

where:

- Stock ERD is the soil water content at the “effective rooting depth”;
- Stock Pf 4.2 is the soil water content at the permanent wilting point at the effective rooting depth;
- (Stock Pf 3–stock Pf 4.2) is the difference between total soil moisture stored in the root zone at field capacity and permanent wilting point;
- ERD was indirectly estimated during soil water deficit from the intersection point of two successive water profiles when irrigation was withheld.

The flowering traits measured were date of appearance of the 1st flower (1st F), date of appearance of at least one flower on 50% (F50%) and 75% of the plants (F75%) and number of flowers appearing daily from 20 to 40 DAS (FL-dx). The latter measurement was made only during the 1996 trial.

Pod and haulm yields were determined as the dry mass of pods and haulms after air-drying to constant weight. These measurements were made on the whole area of the given plots, except for FL-dx, which was only made on five plants from the given plots.

Seed quality traits were evaluated on a 200 g sample of dried pods randomly taken from each plot and then hand-shelled. The maturity, shelling and sound mature kernel (SMK) percentages were determined. Only sound mature kernels were considered when estimating the 100-kernel weight in grams. The maturity % was estimated based on a visual classification of the colour of the internal pericarp of the hull of opened pods [26].

Leaf area index (LAI) and physiological measurements were recorded in the 1996 experiment. LAI was computed as the ratio of sample leaf area to ground area using a leaf area meter (LAI-2000, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). The measurements were made weekly, at 36, 44, 51, 58, 64, 79 and 86 DAS.

Leaf transpiration (E), stomatal conductance (G_s) and relative water content (RWC) measurements were made on the second pair of leaflets of the third leaf, counting from the top of the main shoot, of three randomly-selected plants in the given plot. A steady state Porometer (LI-1600, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA) was used for measuring E and G_s, at 36, 43, 50, 64, 71 and 78 DAS. RWC was determined by the gravimetric method, 36, 43, 64, 71, 78 and 90 DAS using the following formula:

$$RWC = \frac{(\text{fresh weight} - \text{dry weight})}{(\text{turgid weight} - \text{dry weight})}.$$

The measurements were made using 10 0.5-cm-diameter leaf disk samples obtained using a cork borer. The fresh weight of the disks was obtained by weighing immediately after they were punched out. They were then rehydrated for 4 h in the dark at room temperature, 28 ± 1.5 °C, and then reweighed to obtain the turgid weight. The dry weight was determined after oven drying for 24 h at 85 °C.

2.6. Derived measurements

Two drought-response indices, a stress-susceptibility index (SSI) and a stress-tolerance index (STI) were calculated:

$$SSI = 1 - (Y_s/Y_i) / 1 - (\bar{Y}_s / \bar{Y}_i) \quad [9]$$

$$STI = (Y_i \times Y_s) / (\bar{Y}_i)^2 \quad [8],$$

where Y_i is the pod yield of plots subjected to maximum evapotranspiration, Y_s , the pod yield of plots subjected to water deficit, and $\bar{Y}_s$ and $\bar{Y}_i$, the mean yield of all genotypes under stress and non-stress environments, respectively.

A functional relation derived from the harvest index was used for analysing yield (Y) variation as follows [7, 25]:

$$Y = CGR \times Dr \times p,$$

where CGR is the crop growth rate, Dr , the duration of reproductive growth, and p the partitioning coefficient of assimilates to pods. The CGRs, PGRs and p were estimated using the method of Williams [27]:

$$CGR = \text{Haulm yield} + (\text{Pod yield} \times 1.65) / Dt$$

$$PGR = (\text{Pod yield} \times 1.65) / (Dv - Dr - 15)$$

$$p = PGR / CGR,$$

where 1.65 is the fixed adjusting value for the higher energy of pods [7], PGR is the pod growth rate, Dt is the number of days from sowing to harvest and Dv is the duration of the vegetative phase (from sowing to 50% flowering). For the PGR calculation, the beginning of the pod-filling phase was taken as 15 days after the date of 50% flowering according to [19].

2.7. Statistical methods

The data were processed for analysis of variance, means comparisons and regression analysis using the SAS/STAT software (version 6.22). Means were compared using the Student-Newman-Keuls (SNK) test for single effects or Duncan's multiple range tests in the case of significant interaction genotype $\times$ water regime, at the 0.05 probability level. While yield is clearly the breeding objective, the relationships between each measured trait and pod yield or indices were determined using simple linear regression analysis at the $P < 0.005$ level, with the measured trait as the explicative variable.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Soil moisture status

Rainfall and complementary irrigation in the 1996 trial maintained FTSW values of non-stressed plots between 0.6 and 1.0 for all varieties except Fleur 11, which showed values lower than 0.6 between 64 and 78 DAS (Fig. 2a). FTSW values between 0.6 and 0.8 are generally considered as optimum for maintaining the water status and leaf transpiration of plants [21]. Under irrigated conditions, therefore, only Fleur 11 could have been exposed to moderate water deficit conditions between 64 and 78 DAS (Fig. 2a).

In the case of the stressed plots, FTSW values progressively decreased below 0.6 to between 0.2 and 0.3, depending on the variety (Fig. 2b). These values correspond to the threshold value below which crop productivity is severely affected. All

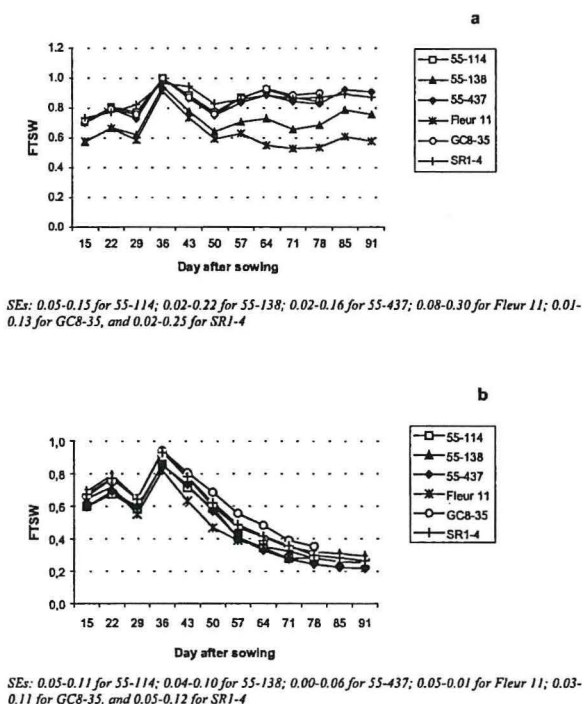


Figure 2. Evolution of the "fraction of transpirable soil water" (FTSW) with time under well-irrigated (a) and stressed (b) conditions in the 1996 trial.

the varieties studied started experiencing water deficit conditions at about 50 DAS with the exception of Fleur 11, which started a few days before. This was due to the very poor rainfall of 34.5 mm recorded from 40 DAS to harvest (Fig. 1b).

3.2. Yield component attributes

The data obtained from the 1994 and 1995 rainy season trials generally showed the highest pod yields for Fleur 11 and the lowest for 55-437 (Tabs. II and III). In 1996, variety differences for pod and haulm yields were highly significant ($P < 0.01$) under irrigated and water deficit conditions (Tab. IV). Fleur 11 produced the highest pod and haulm yields of 2116 and 4246 kg ha⁻¹, respectively, under irrigated conditions. Under water deficit conditions, its pod yield of 1049 kg ha⁻¹ was among the highest, while its haulm yield of 2426 kg ha⁻¹ was among the lowest. Conversely, 55-437 showed the lowest pod yield of 1475 and 791 kg ha⁻¹ under both irrigated and stressed conditions, respectively. Its haulm yield of 4019 kg ha⁻¹ was, however, not significantly affected under water deficit. In effect, the high drought tolerance of the aerial parts of 55-437, which is an important by-product in the Sahel, is one of the reasons why this cultivar is still largely cultivated in this region. The behaviour of the other varieties was intermediate between that of Fleur 11 and 55-437.

Table II. Agronomic traits of the six Spanish groundnut varieties measured under rainfed conditions during the 1994 trial (data come from three varieties trial including other genotypes).

Variety	1st F (DAS)	F50% (DAS)	F75% (DAS)	Pod (kg ha ⁻¹)	Haulms (kg ha ⁻¹)	Maturity (%)	Shelling (%)	SMK (%)	100-k.w. (g)
55-437 (Check)	23.0a	26.0a	27.7b	598.5b	2704.2a	26.2f	64.7bc	35.0b	26.7cde
55-114	22.7a	25.3a	26.2b	841.3a	3018.5a	53.1abc	66.2bc	44.3ab	31.0abc
GC8-35	22.0ab	24.7a	27.0b	612.5b	2466.1a	58.5ab	64.3bc	44.3ab	30.0abcd
55-437 (Check)	23.5a	27.0b	29.0ab	620.6ab	3114.6a	19.7d	62.3ab	37.2ab	25.0cd
55-138	23.0ab	26.0bc	27.0ab	725.7ab	3066.3a	46.0abc	64.3ab	38.8ab	27.3bc
GC8-35	23.0ab	25.0c	25.5ab	681.3ab	3320.1a	59.7a	66.0a	49.6ab	28.7bc
55-437 (Check)	23.5b	26.5abc	30.0	584.6c	2737.5	58.8cd	68.4abc	56.7	28.7c
SR1-4	25.5b	27.0ab	31.0	533.9c	2218.2	75.6a	74.6a	60.3	36.0abc
Fleur 11	23.0bc	24.5d	25.5	1410.9a	2956.9	61.5cd	66.1abc	50.3	43.8a

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test.

1st F, F50%, F75% = days after sowing (DAS) for the 1st flower appearance, 50%, and 75% of plants flowered, respectively.

Maturity, Shelling, SMK, and 100-k weight = percentages of maturity, of shelling, of sound mature kernels and 100-kernel weight, respectively.

Table III. Agronomic traits of the six Spanish groundnut varieties measured under rainfed conditions during the 1995 trial (data come from three varieties trial including other genotypes).

Variety	1st F (DAS)	F50% (DAS)	F75% (DAS)	Pod (kg ha ⁻¹)	Haulms (kg ha ⁻¹)	Maturity (%)	Shelling (%)	SMK (%)	100-k.w. (g)
55-437 (Check)	21.7ab	24.0bc	25.3b	952.2a	4074.2a	50.4ab	69.1bc	49.7a	28.2d
55-114	21.7ab	23.3bcd	24.7b	984.0a	3407.5b	49.7ab	67.9bcd	44.4ab	37.4ab
GC8-35	21.0ab	23.3bcd	24.0b	888.5ab	3212.1b	68.2a	67.7bcd	43.9ab	33.7bc
55-437 (Check)	21.8a	24.4ab	25.5bc	748.4abc	2842.9ab	47.8b	68.5bcd	39.5	27.1c
55-138	21.8a	24.1ab	24.8bc	981.0ab	3158.1ab	63.6ab	70.3bc	48.3	35.7b
GC8-35	20.7ab	23.6 b	23.9cde	754.1abc	3466.7a	62.5ab	69.4bcd	47.2	34.0b
55-437 (Check)	22.5b	24.3d	25.3d	1054.1f	2939.3a	83.3a	73.1bc	61.2a	32.9c
SR1-4	22.6b	26.0c	27.0b	1176.9cde	3182.5a	81.5a	77.4a	67.1a	41.3bc
Fleur 11	21.0c	23.0e	23.7e	1598.2a	3663.2a	68.6b	70.9d	52.9a	50.7a

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test.

1st F, F50%, F75% = days after sowing (DAS) for the 1st flower appearance, 50%, and 75% of plants flowered, respectively.

Maturity, Shelling, SMK, and 100-k.w. = percentages of maturity, of shelling, of sound mature kernels and 100-kernel weight, respectively.

Fleur 11 was ranked as being the most susceptible, with a SSI value of 1.22, and the most tolerant, with a STI value of 0.79 (Tab. IV). The ranking of the varieties based on these two indices were quite different and even completely opposed in the case of Fleur 11. The SSI is the most currently used index by authors and its calculation leads to the identification of stress-tolerant varieties with low yield potential. On the other hand, the STI allows the identification of varieties with high yield potential and stress tolerance [8]. This was confirmed by the regression curves of the values of these indices against yield under both conditions, which show no significant fit between yield and SSI under irrigated conditions (Figs. 3a and b).

Water treatments have no effect on the partitioning coefficient (p); therefore, all the varieties studied maintained parti-

tioning under drought conditions (Tab. IV). Considering that under drought, p is a more reliable selection criterion for identifying genotypes tolerant to end-of-season drought than yield [19], it could be concluded that the varieties tested generally showed adaptation to drought. In addition, all the varieties showed a more suitable p performance than the 90-d check cultivar 55-437 (Tab. IV). From previous results obtained on groundnut, it was suggested that early genotypes have an advantage in p expression and the harvest index under end-of-season stress, and that differences in p may well be genetic rather than a response to drought [28]. Also, the fact that the p of the 90-d varieties, Fleur 11 and SR1-4, were comparable with the p of the 80-d cultivars confers upon them a particular interest for breeding purposes.

Table IV. Yield components, partitioning coefficient (p) and drought-response indices of the six Spanish groundnut varieties under well irrigated (irrigated) and water stressed (stressed) conditions in the 1996 trial.

Variety	Environment	Pod yield (kg ha ⁻¹)	Haulms yield (kg ha ⁻¹)	p^1	SSI^2 (rank)	STI^2 (rank)
55-437	irrigated	1475	4019 a	0.56 b	1.14 (5)	0.41 (6)
55-437	stressed	791	3293 ab			
55-437 mean		1133 b	3656			
Fleur 11	irrigated	2116	4246 a	0.72a	1.22 (6)	0.79 (1)
Fleur 11	stressed	1049	2426 cd			
Fleur 11 mean		1582 a	3335			
GC8-35	irrigated	1657	3507 ab	0.81a	0.95 (4)	0.58 (4)
GC8-35	stressed	1003	2002 d			
GC8-35 mean		1330 ab	2755			
55-114	irrigated	1495	3364 ab	0.81a	0.83 (2)	0.52 (5)
55-114	stressed	987	1971 d			
55-114 mean		1241 b	2667			
55-138	irrigated	1792	3795 ab	0.75a	0.94 (3)	0.67 (2)
55-138	stressed	1076	2985 bc			
55-138 mean		1434 ab	3390			
SR1-4	irrigated	1666	3669 ab	0.71a	0.77 (1)	0.62 (3)
SR1-4	stressed	1097	2555 cd			
SR1-4 mean		1331.1 ab	3112			
Mean irrigated		1683.2 a	3766.7 a	0.75		
Mean stressed		1000.4 b	2538.6 b	0.71		
Variety (V)		**	***	***		
Environment (E)		*	***	n.s	n.s	n.s
V × E interaction		n.s	*	n.s		

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test, n.s. is non significant and *, **, *** are significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

¹ $p = \text{PGR/CGR}$ [27].

² Drought-response indices: SSI (stress susceptibility index [9]) and STI (stress tolerance index [8]), following by the ranking according to drought tolerance between brackets.

3.3. Flowering pattern

In groundnut, the flowering pattern is the dominant attribute that determines fruit number [6]. Consequently, early flowering is an important phenological feature, because it contributes to drought escape, which is an essential drought adaptation mechanism of plants under terminal stress [16]. Only the first initiated flowers will effectively result in pods that contribute to yield when the rainy season is short [15]. Hence, traits regarding the flowering pattern were considered from 20 to 30 DAS.

The measurements made during the flowering period (1st F, F50% and F75%) in the rainfed variety trials conducted in 1994 and 1995 showed a significant difference between Fleur 11 and SR1-4 (Tabs. II and III). The results of the 1996 trial generally show a highly significant cultivar effect ($P < 0.001$) and no environment effect (Tab. V). The measurements of 1st F, F50% and F75% confirm previous results; that is, Fleur 11, despite its 90-d cycle duration, flowers the earliest and SR1-4 the latest. Similar results were obtained concerning the number of flowers appearing daily (FL-dx). Since the flowering dates and rank of varieties did not vary according to the year, the flowering pattern seems to be basically controlled by the genotype. Data con-

cerning the rhythm of appearance of flowers (FL-dx) did not provide any additional information on variety differences. Selection for early flowering is therefore possible based on the first three traits, 1st F, F50% and F75%. Though Fleur 11 and SR1-4 showed different flowering durations, their p values are similar. This corroborates the hypothesis that p is genetically and specifically controlled [28] because it does not seem related to the length of the reproductive phase.

3.4. Seed quality traits

The results of the rainfed trials conducted in 1994 and 1995 showed low values for seed quality traits compared with the irrigated treatment of 1996. This was particularly pronounced in 1994 when the water deficit was very marked at the end of the cycle (Tabs. II and III). The data of the 1996 trial showed that all traits were strongly affected by water deficit stress (Tab. VI). Significant variety effects were observed in the 1996 trial for maturity level, seed weight, shelling and SMK % traits. Variety × environment interaction was significant ($P < 0.01$) for all traits except SMK %, which, in effect, was the most severely affected by water deficit stress ($P < 0.01$).

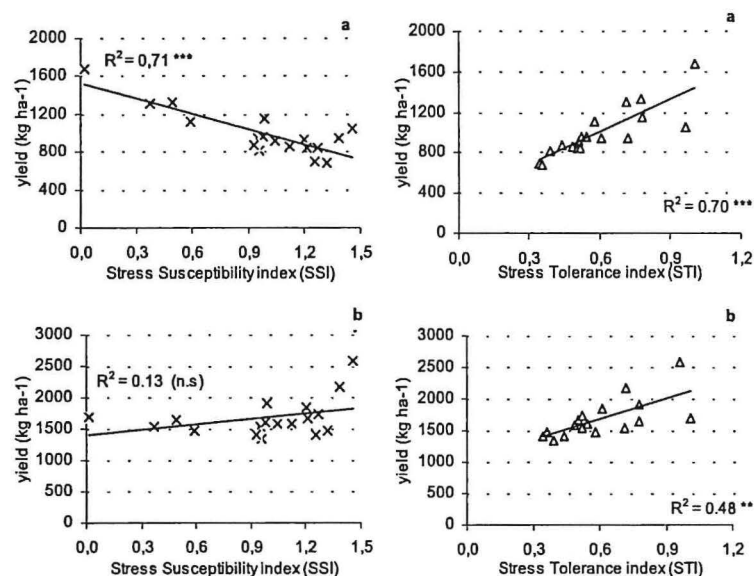


Figure 3. Relationships between yield under stressed conditions (graphs a) and yield under well-irrigated conditions (graphs b) and stress-response indices (SSI and STI) in the 1996 trial.

n.s. is non significant and *, **, *** are significant at 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels, respectively

Maturity level, shelling percentage and 100-kernel weight of all the varieties, with the exception of SR1-4, were reduced under water deficit stress. These three traits were, however, significantly reduced only for Fleur 11. The opposite responses to water deficit of Fleur 11 and SR1-4 for these traits explain that the interactions $G \times E$ were significant ($P < 0.01$). The determination of the maturity percentage of pod set is essential to evaluate drought escape mechanisms in groundnut during late-season drought. Variety SR1-4 regularly showed the best maturity % in the trials conducted in 1994 and 1995 (Tabs. II and III). In 1996, this variety showed the highest

maturity level in both environments, whereas it flowered later than the others (see Sect. 2.3). Conversely, water deficit stress caused the greatest decrease in Fleur 11 pod quality. This can be attributed to its large pod size, which requires more water for filling and ripening. Fleur 11 could therefore not be recommended for the northern areas of the Groundnut Basin of Senegal, which are characterised by very short rainy seasons [4].

Further information brought to light is that the measured traits appear to be genetically variable and very susceptible to drought. They should, therefore, be given particular

Table V. Flowering pattern of the six Spanish groundnut varieties at the beginning of the flowering period in the 1996 trial.

Variety	1st F (DAS)	F50% (DAS)	F75% (DAS)	FL-d23 (nb)	FL-d24 (nb)	FL-d25 (nb)	FL-d26 (nb)
55-437	20.5 a	22.3 b	23.3 b	1.4 c	2.3 b	4.2 c	4.8 bc
Fleur 11	19.0 b	21.2 c	22.0 c	4.3 a	5.0 a	6.0 b	6.2 a
GC8-35	19.7 ab	21.3 bc	22.0 c	4.5 a	6.0 a	8.0 ab	7.0 a
55-114	19.7 ab	22.0 bc	22.0 c	2.8 b	5.2 a	6.5 b	5.7 ab
55-138	19.7 ab	22.0 bc	22.8 bc	2.3 bc	5.5 a	8.8 a	6.7 a
SR1-4	20.4 a	23.3 a	25.2 a	1.1 c	1.9 b	2.8 c	3.8 c
Mean irrigated	20.0	22.0	22.9	2.4	4.0	5.9	4.7
Mean stressed	19.7	22.1	22.9	2.6	4.2	6.0	6.4
Variety (V)	***	***	***	***	***	***	***
Environment (E)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
V $\times$ E interaction	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test, n.s. is non significant and *, **, *** are significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

1st F, F50%, F75% = days after sowing for the 1st flower appearance, 50%, and 75% of plants flowered, respectively.

FL-d23, FL-d24, FL-d25, FL-d26 = number of flowers appeared daily at 23, 24, 25, and 26 DAS, respectively.

Table VI. Percentage maturity, shelling, SMK (sound mature kernel) and 100-k.w. (kernel weight) of the six Spanish groundnut varieties under well irrigated (irrigated) and water stressed (stressed) environments in the 1996 trial.

Variety	Environment	Maturity (%)	Shelling (%)	SMK (%)	100-k w. (g)
55-437	irrigated	70.1 a	73.6 abc	69.1	34.7 d
55-437	stressed	51.9 ab	70.6 bcd	64.1	32.4 d
55-437 mean				67.0 ab	
Fleur 11	irrigated	77.6 a	74.5 ab	67.9	54.1 a
Fleur 11	stressed	41.9 b	68.7 d	57.1	45.5 b
Fleur 11 mean				62.5 bc	
GC8-35	irrigated	68.2 a	69.6 cd	62.0	36.1 cd
GC8-35	stressed	64.1 a	68.8 d	56.5	34.4 d
GC8-35 mean				59.2 c	
55-114	irrigated	67.1 a	70.6 bcd	61.7	39.4 bcd
55-114	stressed	61.5 a	69.1 d	61.2	37.1 cd
55-114 mean				61.5 bc	
55-138	irrigated	73.7 a	73.6 abc	67.1	39.1 bcd
55-138	stressed	69.7 a	67.9 d	56.5	33.2 d
55-138 mean				61.8 bc	
SR1-4	irrigated	73.5 a	76.4 a	72.2	42.8 bc
SR1-4	stressed	81.0 a	75.5 a	71.4	42.5 bc
SR1-4 mean				71.8 a	
Mean irrigated		71.7	73.1 a	66.7 a	41.1
Mean stressed		61.7	70.1 b	61.3 b	37.5
Variety (V)		*	***	*	***
Environment (E)		n.s.	*	**	n.s.
V × E interaction		**	**	n.s.	**

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to SNK test, n.s. is non significant and *, **, *** are significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

consideration during the process of selection in order to select cultivars with both high production and adequate seed quality under water deficit.

3.5. Development and physiological components

Significant variety differences were observed for LAI from the beginning of the measurements, at 36 DAS, 2 weeks before the occurrence of water deficit estimated based on the FTSW pattern, until 64 DAS (Tab. VII). The water treatment effect was significant from 64 DAS and thereafter. Fleur 11 showed the highest significant LAI of between 2.52 and 4.77 from 36 DAS to 58 DAS. At 58 DAS, corresponding to about 8 days after the onset of water deficit, no significant effect on the LAI was observed. A significant ($P < 0.05$) cultivar × environment interaction was observed at 64 DAS. This corresponded to a significant decrease in LAI under drought, revealed only for Fleur 11 (Tab. VII). As water deficit stress increased towards the end of the cycle, the LAI of Fleur 11 became comparable with those of the other genotypes. This same phenomenon was

also observed for the FTSW (Fig. 2b). This suggests a probable link between leaf development of the genotypes and water consumption kinetics expressed by FTSW. It can be deduced, based on the early manifestation of cultivar differences, that the phenotypic expression of LAI is linked to the genotype and that the differential effect caused by water deficit stress on genotypes (interaction) appears to be temporarily accentuated after about 2 weeks of stress. This could probably be the best period to carry out selection based on this trait.

Significant water treatment by variety interaction effects ($P < 0.05$) were observed at 64 DAS for RWC measurements (Tab. VIII). The first group of varieties, 55-437, SR1-4 and GC8-35, showed weak changes of about 5% according to the water regime conditions, whereas 55-114, 55-138 and Fleur 11 showed a greater decrease in RWC of about 12–15% under drought. Measurements made before this date did not show any differences between environments or genotypes. As in the case of LAI measurements, the most interesting feature was observed at 64 DAS, when the varieties seemed to be arranged into groups. These observations, considered together with yield-related measurements (yield under stress, p and STI), show that a rapid decrease in RWC does not impart drought susceptibility, particularly in the case of Fleur 11 and 55-138.

The water treatment effect was also observed at 64 DAS for transpiration rates (E) as well as the closely related measurement of stomatal conductance G_s (results not shown). However, contrary to the other traits, regardless of the measurement date no variety effect was observed (Fig. 4). It could be concluded that genetic variability is difficult to observe for these transpiration-related traits, despite a strong water treatment effect observed between 50 and 64 DAS (Fig. 4).

3.6. Relationship between yield and measured traits

For a trait to be considered as a selection criterion for plant breeding, it must, above all, be variable, but also associated with yield. It is therefore essential to determine whether or not pod yield was correlated with a particular agronomic or physiological component [3, 25]. However, because the relationship of yield to physiological attributes is not clearly understood [2, 12], an essential step would consist of searching for simple correlations between variable traits and yield under stress or drought-response indices. In the 1996 trial, the traits that significantly correlated with pod yield or drought-response indices are E and G_s at 64 DAS, RWC at 64 DAS, maturity % and 100-kernel weight (Tab. IX). No significant regression was observed between flowering traits and yield in this study. This suggests that variety differences in flowering are not associated with yield. This could be attributed to the relative similarity in the phenology of the varieties. A significant correlation ($P < 0.05$) between E and G_s at 64 DAS and pod yield (Y_s) was observed under the stressed environment. No significant correlation was found between E at 64 DAS and pod yield under irrigation (Y_i). Though this trait showed significant negative correlation with SSI ($r = -0.592$, $P < 0.01$), no significant ($r = 0.391$) positive association with STI was observed. This confirms that a high transpiration rate and stomatal conductance under water deficit stress are favourable attributes for drought tolerance in groundnut, as already indicated by other authors [10, 18].

Table VII. Leaf area index (LAI) of the six Spanish groundnut varieties measured at 36, 44, 51, 64, 79 and 86 days after sowing (DAS) in the 1996 trial.

Variety	LAI 36	LAI 44	LAI 51	LAI 58	LAI 64	LAI 79	LAI 86
55-437 irrigated					3.59 b	2.81 a	
55-437 stressed					2.84 b	2.02 a	
55-437 mean	1.71 b	2.47 b	2.90 b	4.46 a	3.21 b	2.41 a	2.58 a
Fleur 11 irrigated					4.60 a	3.01 a	
Fleur 11 stressed					2.90 b	2.06 a	
Fleur 11 mean	2.52 a	3.10 a	3.98 a	4.77 a	3.75 a	2.53 a	2.40 a
GC8-35 irrigated					2.88 b	2.62 a	
GC8-35 stressed					2.65 b	1.63 a	
GC8-35 mean	1.71 b	2.46 b	2.64 b	3.81 b	2.76 a	2.12 a	
55-114 irrigated					3.14 b	2.63 a	
55-114 stressed					2.34 b	1.51 a	
55-114 mean	1.83 b	2.57 b	2.81 b	4.02 b	2.74 b	2.07 a	
55-138 irrigated					3.61 b	2.73 a	
55-138 stressed					2.70 b	1.42 a	
55-138 mean	1.85 b	2.80 ab	3.31 b	4.50 a	3.15 b	2.07 a	
SR1-4 irrigated					2.92 b	2.78 a	
SR1-4 stressed					2.36 b	1.62 a	
SR1-4 mean	1.71 b	2.43 b	2.67 b	3.86 b	2.64 b	2.20 a	2.47 a
Mean irrigated	1.93	2.69	3.06	4.40	3.45 a	2.76 a	2.93 a
Mean stressed	1.85	2.59	3.04	4.07	2.63 b	1.71 b	2.04 b
Variety (V)	***	*	**	***	***	n.s.	n.s.
Environment (E)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*
V × E interaction	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test, n.s. is non significant and *, **, *** are significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

Table VIII. Relative water content (RWC) at 64 days after sowing (DAS) of the six Spanish groundnut varieties cultivated under well irrigated and water stressed conditions in the 1996 trial.

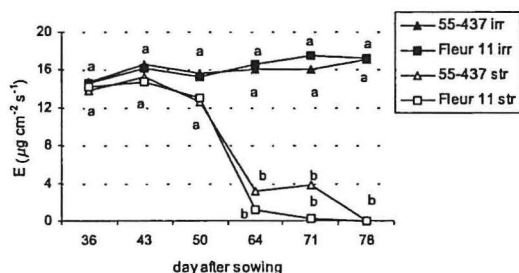
Variety	Well irrigated	Water stressed
55-114	93.56a	79.93b
55-138	92.52a	81.00b
55-437	94.92a	90.89a
Fleur 11	93.18a	79.28b
GC8-35	94.08a	85.78ab
SR1-4	94.92a	90.14a
Mean	93.86a	84.50b
Variety effect (V)		**
Environment effect (E)		**
V × E interaction		*

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test, n.s. is non significant and *, **, *** are significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

RWC at 64 DAS showed a close negative correlation ($r = -0.601$, $P < 0.001$) with Y_i . The negative association ($r = -0.446$) with STI was significant at $P < 0.05$, but no relationship was found with SSI. These negative correlations confirm the unfavourable effect of a high RWC on pod yield under both environments as suggested above. This result could be explained by the lack of osmotic regulation mechanism in groundnut [1], which ensures a direct link between stomatal aperture (high carbon assimilation) and decreasing RWC.

The high value of seed quality traits such as maturity % and 100-kernel weight appears to be closely associated with high Y_i ($P < 0.001$). However, no association was observed with Y_s . Correlations were indeed observed between maturity % and SSI ($r = -0.483$, $P < 0.05$) and between seed size and STI ($r = 0.557$, $P < 0.05$) (Tab. IX). However, the weakness of these associations and the lack of correlation with Y_s does not make these traits, when considered alone, relevant for an indirect assessment of drought adaptation.

The relationship between the studied traits and yield differed considerably under the two water treatments. This highlights the need for selection to be carried out as early as possible under both environments in order to select genotypes that perform



Same letter designates to the same statistical group according to the SNK test at $P < 0.05$

Figure 4. Evolution of the transpiration rates (E) from 36 to 78 days after sowing (DAS) on the most contrasting varieties, 55-437 and Fleur 11, under well-irrigated (irr) and stressed (str) conditions in the 1996 trial.

well even under favourable conditions. In the case of all four traits, when significant correlations were observed for SSI, they were non-significant for STI and vice versa.

3.7. Conclusion: selection criteria for groundnut drought adaptation

In this study, the relative similarity in the phenology of the varieties did not impair the expression of significant differences for some traits relative to flowering, productivity and physiological responses, during end-of-season water deficit stress. As such, some guidelines to improving the selection of groundnut cultivars could be given.

At the agronomic level, no direct link was found between flowering and productivity. The p coefficient was the same for Fleur 11 and SR1-4, the two varieties that showed the most pronounced difference in flowering. This confirms that flowering time and yield-related traits have to be selected independently to improve drought adaptation in groundnut.

Seed quality traits were very sensitive to drought. Their measurement has to be considered over and above yield by breeders, because they are not associated with yield under stress conditions, neither are they clearly related to drought-response indices.

The results of this work show that the genotypes did not respond in the same way to both of the stress-response indices calculated on the basis of yield, under stress and non-stress environments. This is particularly true for Fleur 11 and 55-437, with nearly the same indices, which were high in the case of SSI, and at both extremes in the case of STI. This confirms that the two indices do not give equal assessment of varieties.

The timing for the application of stress in order to have maximum genetic variability and/or interaction, was determined from soil moisture and physiological traits measured in the 1996 trial. Observations made on LAI, RWC and E can be summarised for practical use in a breeding programme. For these three traits, the water treatment effect appeared at the same date close to 64 DAS, corresponding to about two weeks after the onset of the water deficit stress. Before this period, no environment effect was observed for any of these traits. Since

Table IX. Correlation coefficients (r) between transpiration rate (E) and relative water content (RWC) at 64 DAS, maturity % and 100-kernel weight traits, and pod-yield under both conditions as well two drought-response indices for the six Spanish varieties in the 1996 trial.

Attribute ¹	Correlation coefficient (r)			
	pod-yield ²		drought-response index ³	
	Yi	Ys	SSI	STI
E 64 DAS	0.116	0.574*	-0.592**	0.391
RWC 64 DAS	-0.601***	-0.267	0.002	-0.446*
Maturity %	0.655***	0.278	-0.483*	-0.023
100-kernel weight	0.672***	0.412	-0.145	0.557*

*, **, *** indicate significance at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

¹ E 64 DAS = transpiration rate at 64 days after sowing (DAS); RWC 64 DAS = relative water content at 64 DAS; Maturity % = percentage of maturity at harvest; 100-kernel weight = weight of 100 SMK (sound mature kernels).

² Yi = pod-yield under irrigated conditions; Ys = pod-yield under stressed conditions.

³ SSI = stress susceptibility index [9]; STI = stress tolerance index [8].

differences between varieties for these traits were not obvious beyond 64 DAS, measurements around this date will probably provide useful information for breeding early groundnut genotypes under end-of-season water deficit conditions.

Acknowledgement: This work was realised through funds from the EEC/DG 12/STD for the groundnut drought adaptation breeding programme in Senegal. We would also like to thank all the research scientists and technicians who have contributed to this program. Special thanks go to Dr. Serge Braconnier, Dr. Harold Roy-Macauley and Dr. Florent Maraux for their assistance in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Bennett J.M., Boote K.J., Hammond L.C., Relationship among water potential components, relative water content, and stomatal resistance of field-grown peanut leaves, *Peanut Sci.* 11 (1984) 31-35.
- [2] Boyer J.S., Advances in drought tolerance in plants, *Adv. Agron.* 57 (1996) 187-211.
- [3] Blum A., Toward standard assays of drought resistance in crop plants, Molecular approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environment, *Proc. CIMMYT Strategic Planning Workshop, Mexico, 1999*, pp. 29-35.
- [4] Clavel D., N'Doye O., La carte variétale de l'arachide au Sénégal, *Agric. Dév.* 14 (1996) 41-46.
- [5] Clavel D., Annerose D.J.M., Breeding groundnut for drought adaptation in Senegal, *IAN 17* (1997) 33-35.
- [6] Craufurd P.Q., Wheeler T.R., Ellis R.H., Summerfield R.J., Escape and tolerance to high temperature at flowering in groundnut, *J. Agric. Res. (Camb.)* 135 (2000) 371-378.
- [7] Duncan W.G., McCloud D.E., McGraw R.L., Boote K.J., Physiological aspects of peanut yield improvement, *Crop Sci.* 18 (1978) 1015-1020.

- [8] Fernandez G.C.J., Selection criteria for assessing stress tolerance, in: Adaptation of food crops temperature and water stress, Proc. of an International Symposium, Taiwan, 1992, pp. 257–269.
- [9] Fisher R.A., Maurer R., Drought resistance in spring wheat cultivars. I. grain yield response, Aust. J. Agric. Res. 29 (1978) 897–912.
- [10] Gautreau J., Levels of intervariety leaf potentials and adaptation of groundnut to drought in Senegal, Oléagineux 32 (1977) 323–332.
- [11] Greenberg D.C., Williams J.H., Ndunguru B.J., Differences in yield determining processes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in varied drought environments, Ann. Appl. Biol. 120 (1992) 557–566.
- [12] Gupta N.K., Sunita Gupta, Arvind Kumar, Effect of water stress on physiological attributes and their relationship with growth and yield of wheat cultivars at different stages, J. Agron. Crop Sci. 186 (2001) 55–62.
- [13] Khalfaoui J.L.B., Determination of potential lengths of the crop growing period in semi-arid regions of Senegal, Agric. For. Meteorol. 55 (1991) 351–363.
- [14] Nageswara Rao R.C., Sardar Singh, Sikavumar M.K.V., Srivastava K.L., Williams J.H., Effect of water deficit at different growth phases of peanut. I. Yield responses, Agron. J. 77 (1985) 782–786.
- [15] Nageswara Rao R.C., Williams J.H., Sikavumar M.K.V., Wadia K.D.R., Effect of water deficit at different growth phases of peanut. II. Response to drought during preflowering phase, Agron. J. 80 (1988) 431–438.
- [16] Nageswara Rao R.C., Williams J.H., Murari Singh J.H., Genotypic sensitivity to drought and yield potential of peanut, Agron. J. 81 (1989) 887–893.
- [17] Nautiyal P.C., Ravindra V., Vasantha S., Joshi J.C., Moisture stress and subsequent seed viability, Oleagineux 46 (1991) 153–158.
- [18] Nautiyal P.C., Ravindra V., Joshi J.C., Gas exchange and leaf water relations in two peanut cultivars of different drought tolerance, Biol. Plant. 37 (1995) 371–374.
- [19] Ndunguru B.J., Ntare B.R., Williams T.J.H., Greenberg D.C., Assessment of groundnut cultivars for end-of-season drought tolerance in Sahelian environment, J. Agric. Res. (Camb.) 125 (1995) 79–85.
- [20] Richards R.A., Defining selection criteria to improve yield under drought, Plant Growth Regul. 20 (1996) 157–166.
- [21] Sadras V.O., Milroy S.P., Soil water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchanges: a review, Field Crops Res. 47 (1996) 253–266.
- [22] Sikavumar M.V.K., Predicting rainy season potential from the onset on rain in southern Sahelian and Sudanian climatic zones of West Africa, Agric. For. Meteorol. 42 (1988) 295–305.
- [23] Sikavumar M.V.K., Drought spells and drought frequencies in West Africa. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Res. Inf. Bull. 13 (1991).
- [24] Sinclair T.R., Lecoecur J., Field pea transpiration and leaf growth in response to soil water deficits, Crop Sci. 36 (1996) 331–335.
- [25] Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.M., Adaptation of grain legume (pulses) to water-limited environments, Adv. Agron. 71 (2001) 193–231.
- [26] Williams E.J., Drexler J.S., A non-destructive method for determining peanut pod maturity, Peanut Sci. 8 (1982) 134–141.
- [27] Williams J.H., Concept for the application of crop physiological models for crop breeding, Proc. Int. Workshop, ICRISAT, Patancheru, 1992, pp. 345–351.
- [28] Wright G.C., Hubick K.T., Farquhar G.D., Physiological analysis of peanut cultivar response to timing and duration of drought stress, Aust. J. Agric. Res. 42 (1991) 453–470.

3.2. Synthèse des résultats

3.2.1. Rendements et traits reliés au rendement

L'expérimentation conduite en conditions d'alimentation hydrique contrôlée a permis d'observer que les prélèvements hydriques au niveau du sol des six variétés ont été similaires en conditions de déficit hydrique. Toutes les variétés ont des coefficients de partition des assimilats vers les gousses (p) supérieurs à celui du témoin 55-437 d'une et d'autre part p n'a pas été affecté par le stress de fin cycle. Les indices de réponses au stress, STI (Stress Tolerance Index, Fernandez, 1992) et SSI (Stress Susceptibility Index, Fisher et Maurer, 1978) n'ont pas permis de discriminations statistiques entre les géotypes mais les STI ont été correctement corrélés aux rendements en conditions de stress et en condition de non stress alors que SSI n'a été corrélé au rendement qu'en conditions de stress.

3.2.2. Précocité

Les résultats ont montré que la précocité de floraison avait été correctement évaluée par le nombre de jours séparant le semis de la première mise à fleur ou par une mise à fleur au moins sur 50% des plantes. Les autres traits liés à la floraison (rythme, intensité) n'ont pas présenté d'intérêt supplémentaire pour la différenciation variétale. Pour une durée de cycle totale équivalente au témoin, une variabilité génétique a été mise en évidence pour la précocité de floraison, la rapidité de la phase de remplissage de la gousse et la maturation des gousses : par exemple, la variété Fleur 11 possède une floraison très précoce et une phase de maturation longue alors que c'est l'inverse pour la variété SR1-4. Les sélections destinées à accroître la précocité de l'arachide doivent donc bien porter sur les deux caractères, floraison précoce et maturation des gousses rapides.

3.2.3. Variabilité des mesures physiologiques

L'indice foliaire (LAI) semble contrôlé par le géotype mais une interaction géotype x environnement apparaît après 14 jours de stress. Cette interaction significative est apparue à la même période sur les CRE cependant les deux mesures ne semblent pas liées entre-elles (pas de corrélation). Les baisses rapides de CRE ont été constatées chez les géotypes les plus performants sous les deux conditions. L'effet du traitement hydrique est également

apparu après 14 jours de stress sur la transpiration et la conductance stomatique mais ces mesures n'ont permis aucune discrimination génotypique.

3.2.4. Corrélations entre les traits mesurés et les rendements

Les corrélations significatives entre les traits mesurés et les rendements ou les indices de réponse au stress en termes de rendement ont été peu nombreuses. Elles ont concerné le pourcentage de maturité des gousses, et la taille des graines et les CRE après 14 jours de stress, mesures qui ont montré des corrélations élevées voisines de 0,65 ($P < 0.001$) avec les rendements en conditions de bonne alimentation en eau. Les corrélations concernant les CRE étaient toutes négatives, hautement significatives avec le rendement sous stress ($r = 0,60$, $P < 0,001$) et plus faibles avec ($r = 0,45$, $P < 0,05$) avec STI. Cette observation confirme qu'une déshydratation rapide des tissus en début de stress est plutôt liée à une bonne production chez l'arachide en condition de déficit hydrique.

3.3. Conclusion

Les résultats sur les rendements et les caractères liés au rendement comme le coefficient de partition p , ont montré la bonne adaptation de l'ensemble du matériel testé et la supériorité des nouvelles lignées par rapport au témoin, 55-437 sur p . Cependant le p faible de 55-437 est surtout dû à une production de fanes peu affectée par le déficit hydrique qui est un caractère favorable dans le cas d'une forte demande locale d'arachide à utilisation mixte, gousses (vente et consommation) et pailles (alimentation animale).

Le SSI de Fisher et Maurer (1978) qui traduit une réduction relative de rendement normalisé sur la population est l'indice le plus couramment utilisé, mais il paraît moins pertinent car les variétés à hauts rendements potentiels ont été pénalisées. Cela n'a pas été le cas quand le STI (Fernandez, 1992) a été utilisé. Cet indice intègre mieux la réduction de rendement et le rendement potentiel en permettant de repérer les variétés présentant des rendements plutôt élevés en l'absence de stress et relativement peu diminués en conditions de stress.

Les conditions permettant de réaliser des distinctions variétales et de mettre en évidence des interactions génotype x traitement pour LAI et CRE sont similaires, soit en milieu de la période de stress, mais les deux caractères ne sont pas corrélés. Les mesures de conductance stomatique ne peuvent pas être envisagées pour la sélection variétale car elles

présentent de fluctuations micro environnementales trop importantes mais l'effet du traitement a été très sensible après 14 jours de stress, comme dans le cas des CRE. Il semble donc que cette période de mesure soit la plus favorable à l'expression des différences variétales pour les caractères physiologiques considérés. Les corrélations négatives du CRE avec le rendement ont montré qu'une baisse rapide de turgescence foliaire, probablement provoquée par une faible résistance stomatique, était favorable à l'adaptation à la sécheresse chez les génotypes précoces testés.

CHAPITRE 4

VARIABILITE GENETIQUE DES CARACTERES D'ADAPTATION CHEZ DES LIGNEES APPARENTÉES

4.1. Introduction

La première des conditions à remplir dans un programme de sélection pour l'adaptation à la sécheresse est d'utiliser ou de créer du matériel végétal dont la longueur de cycle est adapté à la longueur de la saison de culture (Wright et Nageswara Rao 1995 ; Richard, 1996 ; Fukai *et al.*, 1999, Turner *et al.*, 2001) qui correspond, en Afrique, à la saison des pluies. Les sécheresses intervenues dans les années soixante-dix et quatre-vingt dans le Sahel ont entraîné au Sénégal un glissement des isohyètes vers le sud (Figure 4, chapitre 1). Le cycle de culture a donc été réduit et de ce fait l'arachide est généralement cultivée, en conditions de déficit hydrique de fin de cycle dans ces régions (Annerose, 1988; Ndunguru *et al.*, 1995). Or, sur cette espèce, la réduction de rendement la plus importante a lieu lorsque la sécheresse intervient pendant cette phase qui correspond au remplissage des gousses (Nageswara Rao *et al.*, 1985). Par conséquent dans le nouveau contexte climatique des régions sahéliennes, le raccourcissement des cycles des cultivars est une nécessité (Annerose, 1991 ; Khalfaoui, 1991a). Les longueurs de cycle théoriques pour la zone visée, entre les isohyètes 300 et 500 mm, ont été calculées (Figure 5, chapitre 1) à partir d'une méthode basée sur la simulation des bilans hydriques (Khalfaoui, 1991b).

Un certain nombre de traits physiologiques sont considérés comme des critères de sélection potentiels sur l'arachide (Nautiyal *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 1991; Nageswara Rao *et al.*, 1988). Cependant ces caractères n'ont pas été pleinement utilisés par les sélectionneurs car les études physiologiques ont souvent lieu sur du matériel génétique très contrasté et les liaisons de ces caractères avec le rendement ne sont pas connues (Richard, 1996). Des lignées ont été obtenues par rétrocroisement (ou back cross, BC) successifs sur des variétés parentales récurrentes, 55-437 (lignées BC55) et 73-30 (lignées BC73), variétés commerciales de 90 jours dont les cycles de culture étaient devenus trop longs. La précocité a été transférée grâce à l'utilisation d'un géniteur de précocité, Chico, variété peu productive d'une longueur de cycle de 75 jours dans programme de rétro-croisement. Les lignées obtenues après 4 à 5 cycles de rétro-croisement sont qualifiées d'isogéniques et possèdent plusieurs intérêts. Le premier est de permettre d'«isoler» donc d'évaluer l'effet du caractère «précocité» intégré dans un fond génétique commun, celui du parent récurrent. Un autre est de réduire la plasticité naturelle des plantes, très forte sur l'arachide du fait d'une floraison indéterminée, ce permet de déterminer plus finement les différences de

Planche IV. Lignées isogéniques : 1) Vue d'ensemble des essais en 2002, 2) Irrigation d'appoint avec des rampes basculantes, 3) Mesure de la fluorescence chlorophyllienne, 4) Bottes des variétés Chico (parent mâle) et 55-437 (parent femelle) et du nouveau cultivar GC8-35, en cours de séchage au champ (Photos Clavel)

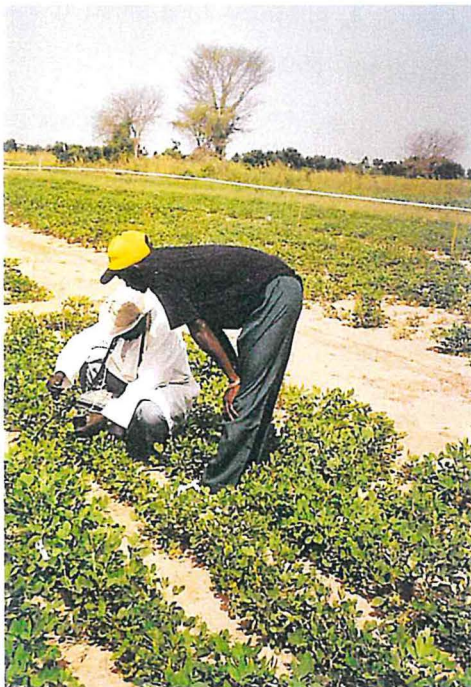
1)



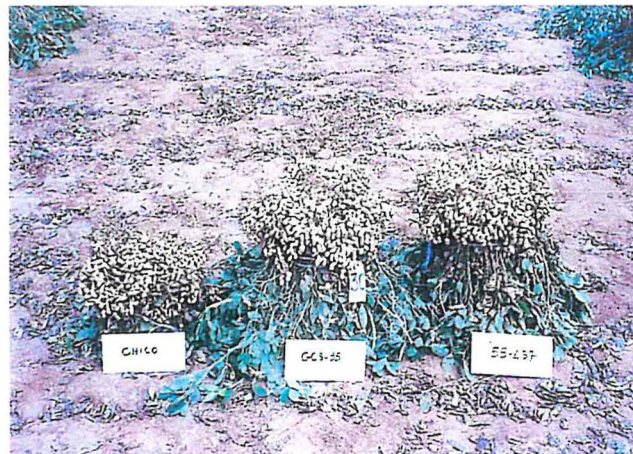
2)



3)



4)



réponse au stress (Lazar *et al.*, 1995). Ce matériel végétal a fait l'objet de l'étude au champ réalisée à Bambey en 2001 et 2002, en conditions d'hivernage avec irrigation partiellement contrôlées pour obtenir un déficit hydrique de fin de cycle (planche IV).

L'objectif de cette étude était de fournir des critères physiologiques de sélection utilisables sur l'arachide en conditions de déficit hydrique de fin de cycle. La validation des mesures agronomiques et physiologiques en tant que critères de sélection était fondée sur deux facteurs. Le premier a reposé sur l'évaluation de leur variabilité génétique, c'est-à-dire leur pouvoir de discrimination génotypique à l'intérieur des deux groupes de lignées génétiquement proches. Le deuxième facteur de validation des critères était constitué par l'établissement de corrélations entre ces caractères, mesurés à différents stades, et les rendements finaux en conditions hydriques favorables ou non. La particularité de travail par rapport à une étude strictement physiologique était que la recherche de critères de sélection a été réalisée sur du matériel végétal à variabilité génétique réduite et donc représentatif de celui qui est habituellement disponible à la fin d'un programme de sélection sur plante autogame.

Cette étude a fait l'objet d'un article « Genotypic variation in drought adaptation among closely related groundnut lines and potential traits for breeding » par Danièle Clavel, Omar Diouf, et Serge Braconnier acceptée sous réserve de modification par la revue **Field Crops Research**.

Full title: Genotypic variation in drought adaptation among closely related groundnut lines and potential traits for breeding

Authors: D. Clavel^{*1}, O. Diouf², S. Braconnier³

***Author for correspondence:** Danièle Clavel

Affiliation: CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement)

Postal Address: CIRAD, TA70/01, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cédex 5

Tel (33) 04 67 61 58 00

Fax (33) 04 67 61 56 93

E-mail: clavel@cirad.fr

¹ CIRAD, TA70/01, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5

² ISRA/CERAAS, BP 3320, Thiès-Escale, Thiès, Sénégal

³ CIRAD, CERAAS, BP 3320, Thiès-Escale, Thiès, Sénégal

Address of the place where the work was done: CERAAS (Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse), BP 3320, Thiès-Escale, Thiès, Sénégal

Genotypic variation in drought adaptation among closely related groundnut lines and potential traits for breeding

D. Clavel, O. Diouf, S. Braconnier

Abstract

Groundnut is the most important oilseed and cash crop in the Sub-Sahel regions. It is mainly cultivated under late-season drought that occurs during the pod-filling phase and regularly causes great reduction in pod yield. Two sets of extra-early closely related groundnut lines (80 days) were developed in Senegal through back-cross between two productive 90 days cultivars, 55-437 and 73-30, and a precocity donor of 75 days, Chico. However reduced genotypic variability of breeding lines is one of the major drawbacks encountered by breeders when improving materials for physiological traits. The objective was to improve selection criteria by establishing relevance of breeding traits based on the extent of their genotypic variation (ability to discriminate among genotypes) and their relationship with yield under both well-watered and late-season drought stress. Yield, harvest index (HI), drought response indices (SSI and STI), and physiological traits – relative water content (RWC), leaf area index (LAI) and parameters of *in vivo* chlorophyll fluorescence (SFI, “Structure-Function-Index” and F_v/F_m) – were measured on the two sets of lines during two crop seasons (2001 and 2002). Results showed that HIs of lines were higher and more stable across watering condition than those of the parental lines confirming their high adaptive capacity for reallocation of assimilates to the grains. The SSI (Stress Susceptibility Index) correlated positively with yield under well-watered and negatively with yield under stress whereas STI (Stress Tolerance Index) correlated positively with yield under both treatments showing that STI is more efficient to characterise end-of-season drought resistance. Yields obtained in 2001 correlated with yields of 2002 but yields under well-watered were not correlated with yields under drought showing the robustness of varietal yielding across years but not across treatments in groundnut. Few measurements of RWC and LAI discriminated genotypes and the genotypic differentiation was more marked on the 73-30 derived lines which also showed morphologic

dissimilarities. Fluorescence parameters gave greater discrimination among lines. Correlations between these physiological traits and yields or drought response indices were highly variable according to lines, treatments and years. However significant correlations were repeatedly established between SFI and pod yields across conditions indicating that the photochemical response is probably constitutive (independent of stress). This complexity make difficult to establish simple and generally valid physiological selection criteria. Nevertheless the approach developed in this study could provide relevant selection criteria useful of developing high yielding cultivar adapted to drought.

Keywords: Groundnut (*Arachis hypogaea*); Genetic variability; Closely related lines; Yield correlations; Breeding; Drought adaptation; Physiological traits; Earliness; Late-season water deficit;

Genotypic variation in drought adaptation among closely related early groundnut lines and potential traits for breeding

D. Clavel, O. Diouf, S. Braconnier

1. Introduction

Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is the most important oilseed and cash crop in the Sub-Saharan regions (Ntare, 2001). It is cultivated during the rainy season, characterized by low rainfall ranging between 300 and 600 mm, and short growing season, starting in July and ending in October (Sikavumar, 1988). In this environment, groundnut commonly experiences late-season water deficit (Sikavumar, 1991; Ndunguru et al., 1995) causing reduction in pod-yield when occurring during the pod-filling phase (Nageswara Rao et al., 1985; Wright et al., 1991). Stress occurring at this phase is found to be detrimental to several physiological processes as photosynthesis and stomatal conductance decreases (Nautiyal et al., 1995). Therefore, development of early maturing groundnut cultivars that escape water deficit during pod-formation and pod-filling stages is a main breeding objective for this region (Annerose, 1991; Khalfaoui, 1991). Breeding programmes based on selection for earliness and grain yield have proven their efficacy in different drought-prone areas (Fukai et al., 1999; Reddy et al., 2003; Rosales-Serna et al., 2004) and specially on groundnut growing in Sub-Saharan zone where coarse textured soil are prevalent (Subbarao et al., 1995). But in order to improve the genetic progress for yield stability under field conditions it is critical that main physiological mechanisms of drought resistance are also included as selection criteria.

A certain number of physiological traits that contribute to drought resistance in groundnut have been identified (Nautiyal et al., 1995; Wright et al., 1991; Nageswara Rao et al., 1988) and recently reviewed (Turner et al., 2001; Reddy et al., 2003). However these traits have not fully exploited by breeders because physiological studies focused only on few contrasting genotypes while the extent of useful genetic variability remains unknown (Richard, 1996). In addition, the

multi-faceted feature of adaptation to drought is further complicated by the phenological plasticity of the response of the crop to stress thus making screening difficult and sometimes ineffective (Lazar et al., 1995) because it reduces the negative impact of the stress (Rosales-Serna et al., 2004). For these reasons, this study proposes an approach combining production with physiological characters on back-crossed sister lines having weak phenological and phenotypic variability. The breeding program on which this study is based produces extra-early lines maturing in less than 90 days (Khalfaoui, 1991; Clavel and Annerose, 1997) destined for areas where rainy seasons were drastically shortened since about twenty years (Annerose and Diagne, 1990). This genetic material constituted by two series of near-isogenic lines possessing comparable genetic background and reduced variability. Since appropriate phenology and high yield under well-watered conditions are important characters for cultivars adapted to rainfed lowland conditions (Chapman et al., 1993; Fukai et al., 1999; Clavel et al., 2004), these lines were evaluated under both well-watered and end-of cycle drought conditions.

The objective of this study was to improve selection strategy by proposing physiological characters contributing to drought resistance in the field for using in addition to direct selection for yield. The extent of the variation of the physiological traits among genotypes and their relationship to grain yield will be analysed in order to identify relevant selection criteria in breeding cultivars with enhanced yield under drought. The particularity of this study is to compare genetically close lines thus reducing genotype by environment interaction. As proposed elsewhere for rice (Lazar et al., 1995; Jackson et al., 1996; Fukai et al., 1999), genetic and developmental similarities of lines will be used to determine specific physiological distinctions accounting for variation in susceptibility to drought.

2. Materials and methods

2.1. Genetic material

Two series of experimental lines were created using back-crosses (BC) schemes from two initial crosses involving two 90-d varieties used as female recurrent parent. These lines were

crossed with the 75-d line, Chico, as male parent and precocity donor. The 90-d parental lines were the Spanish non dormant Sub-Saharan drought-adapted cultivar, 55-437, and the Spanish dormant Sub-Saharan drought-adapted cultivar, 73-30 (Khalfaoui, 1990a). Four successive BC were realised on 55-437 and five on 73-30, leading about 200 lines per BC with a theoretical isogeny of 97% and 98.5%. The lines were then selected on the basis on precocity and yield traits and stabilised by selfing in F4. Twelve F4 lines from 55-437 and eight from 73-30 were evaluated and selected under field conditions during the rainy seasons 1999 and 2000, accounting for a total amount of 505.9 mm and 613 mm of rainfall, respectively. All experiments were conducted at the experimental station of Bambey (14.42°N and 16.28°W), located in the semi-arid zone of the 'Groundnut Basin' in Senegal. Soils of this station are sandy (91-94%) and ferruginous with low clay content (3-6%), typical of the Sub-sahelian region. Lines were compared with three control lines, both parents and the commercial line, GC8-35 (Clavel and Annerose, 1997), which also has 55-435 and Chico as parents. The check lines were regularly inserted in the field between series of four successive experimental lines with two replicates. Lines that were superior or equivalent to the recurrent parent or commercial line on precocity and yield were chosen for further evaluations. This procedure resulted in seven F6 lines from 55-437, named BC55, and four F7 lines from 73-30, named BC73, that constituted the plant material used in the present study. Three lines (two from 55-437 and one from 73-30) evaluated from 1999 to 2001 were not re-evaluated in 2002 because of poor yields and/or high phenotypical with an other line.

2. 2. *Experimental conditions*

The study was comprised by four experiments conducted during the rainy seasons 2001 and 2002 at the experimental station of Bambey. Two seeds pre-treated with Granox (Captafol 10%-Benomyl 10%-Carbofuran 20 %) per hole were hand-sown. Inter-and intra-row spacing was 50 cm and 15 cm, respectively. The seedlings were thinned to one per hole one week after sowing resulting in a density of 133,300 plants ha⁻¹. In order not to deviate from the farmers' usual cultural practices for groundnut in the Sahel, no fertilizer was applied. The crop was protected against pests and maintained weed-free throughout the study.

2. 3. Rainfall pattern and watering regime

Sowing was in early September at a period where the soil was water saturated. This sowing date was 5-6 weeks later than optimal practices in order to submit the plants to terminal stress in the stressed treatment. In this geographic area, this delay has little effect on temperature and photoperiod experienced by the plants (Ndunguru et al., 1995). Mean temperatures were comprised between $28 \pm 1.5^\circ$ (night) and $36 \pm 1.5^\circ$ (day), which are of the same order in rainy season with no significant variation from one year to the other. In addition, groundnut is weakly sensitive to photoperiod, which is not considered as an environmental impact factor for a breeding program with limited geographical mandate (Williams and Boote, 1995)

Total amount of rainfall plus irrigation accounting for the experiments were 456.8 in 2001 and 543.4 mm in 2002 under watered conditions and 356.8 mm in 2001 and 368.4 mm in 2002, under stressed conditions (Table 1). Differential irrigation was applied 50 days after sowing (DAS) after 340.6 mm in 2001 and 308.4 mm in 2002 (Table 1). This water shortage period was chosen because previous experiments on comparable genetic material conducted in the same site showed that a water cumul of about 320 mm at 50DAS conducted to an FTSW (fraction of transpirable soil water) that decreased progressively below 0.6 after this date on early groundnut (Clavel et al., 2004). This FTSW value represents a threshold below which plant generally begin experience water deficit (Sadras and Milroy, 1996).

In control plant, irrigation was added during the whole cycle according to the rainfall pattern in order to provide optimal water supply which is below field capacity for groundnut in particular at the beginning of cycle. As rainfall distribution resulted in a large quantity of water during the first growing month in 2001 (228.4 mm in September) while much less rain fell at the same period in 2002 (115.4 mm in September). The complementary irrigation and total water supply was higher in 2002 than in 2001 under well-watered and under stressed conditions but relative water shortages for stressed plants were -28% in 2001 and -47% in 2002 (Table 1). All plots were harvested 80 DAS which is the date of optimum maturity previously established on these lines under comparable water regimes.

2. 4. Measurements

Pod and haulm yields were determined as the dry weights of pods and haulms after air-drying to constant weight done from the whole area of each given plots. The harvest indices (HI) were calculated as the ratio of the dry weights of pods and pod + haulms. For assessment of agronomic drought resistance two yield based drought responses indices were established from pod-yield individual measurements. The stress susceptibility index (SSI) measure the relative yield reduction, normalised for the population and stress tolerance index (STI) integrates both stress induced yield reduction and yield potential of a genotype relative to the population yield potential, as following:

$$SSI = 1 - Y_s / Y_i / 1 - \bar{Y}_s / \bar{Y}_i \quad (\text{Fisher and Maurer, 1978})$$

$$STI = (Y_i \times Y_s) / (\bar{Y}_i)^2 \quad (\text{Fernandez, 1992})$$

where, Y_i is the pod yield of well-watered (irrigated) plots, Y_s , the pod-yield of stressed plots and $\bar{Y}_s$ and $\bar{Y}_i$, the same parameters averaged for the population.

Groundnut having indeterminate flowering, earliness is classically measured by the date of starting flowering and the percentage of mature pods at harvest. Flowering time was assessed as the date (in days after sowing) of appearance of at least one flower on at least 50% plants of each plot (F 50%). The maturity percentage of pods at harvest (Mat %) was determined on a 200 g sample of dried pods randomly taken from each plot and then hand-shelled. It was estimated based on visual classification of colour of the internal pericarp of the hull from opened pods (Williams and Drexler, 1981).

Relative water content (RWC) and leaf area index (LAI) were recorded around midday, weekly from the beginning of stress application until two to three days before harvest. Measurements were made during the last five weeks of growth. RWC was determined by gravimetric method using ten 0.5 cm-diameter leaf disk samples sampled from the third leaf, counting from the top of the main shoot, of three randomly selected plants in each given plot. The fresh weight of the disks was obtained by weighing immediately after they were punched out with

a 0.1 mg precision balance. They were then rehydrated for 4 h in distilled water the dark at room temperature, $28 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$, and then reweighed to obtain the turgid weight. The dry weight was determined after oven drying for 24 h at 85°C . RWC values were calculated using the following formula:

$$\text{RWC} = (\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / (\text{turgid weight} - \text{dry weight})$$

LAI was computed as the ratio of leaf area to ground area using a leaf area meter (LAI-2000, LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Above and below canopy measurements were made on nine plants in each given plot sampled three times.

Chlorophyll fluorescence was quantified using a portable Plant Efficiency Analyser type MK2 (PEA, Hansatech Instruments Ltd, UK). The measurements were realised at 56, 63 and 70 DAS on BC73 lines in 2001. In 2002, fluorescence was quantified weekly on both series of lines from 5 days after the application of the stress. Leaves were adapted to darkness for 30-45 minutes by attaching light exclusion clips to the surface on three topmost full-blown leaves *in situ* taken on plants randomly chosen in each plot. The fluorescence responses were induced by exposure to saturated white light with a photon flux density of about $10\,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Two chlorophyll fluorescence parameters were determined: the ratio of variable to maximal fluorescence in dark-adapted state (F_v/F_m) traducing the maximal photochemical yield of photosystem II (PSII) and a derived index from the minimal fluorescence (F_o), the Structure Function Index (SFI, Strasser and Strasser, 1995).

2. 5. *Experimental design and statistical analyses*

The experimental designs of four experiments were in split-plot with three replications in 2001 and four in 2002. Watering treatment at two levels, well-watered and end-of-cycle water deficit constituted the main plots (secondary factor for analysis of variance) and the lines constituted the sub-plots (main factor for analysis of variance). Each plot consisted in 5 lines of 6.15 m long of which the three central lines were used as given plot for yield and flowering observations (9.2 m^2).

The extent of the genotypic variation for each measured trait was evaluated by its ability to statistically discriminate among closely related genotypes under varying watering conditions. Data for each trait were processed for analysis of variance (ANOVA), means comparisons and regression analysis using the SAS/STAT software (version 6.22). Genotypic means were compared using Student-Newman-Keuls (SNK) test for single effects or Duncan's multiple range tests in the case of significant interaction genotype x treatment, at the 0.05 probability level. The relationships between measured traits and pod yields and between drought response indices and pod yields were determined using simple linear regression analysis at the $P < 0.05$.

3. Results

3. 1. *Yield components and stress response indices*

Both series of lines yielded more in 2002 than in 2001 under both conditions. Higher yields in 2002 were principally due to the larger amount of irrigation and also by better distribution of rain in 2002 compared to 2001 (Table 1). Differences between treatments were more accentuated in 2002 than in 2001 but amount of rainfall was higher and its distribution was better in 2002 than in 2001 (Table 1). Weak water deficit occurs at the beginning of cycle in 2002 but limited water supply before flowering is considered as favourable to pod and haulms production on groundnut (Nageswara Rao, 1985, 1988). The end-of-cycle water deficit significantly decreased pod yields in 2001 and in 2002 on both series of lines but had no effect on HIs (Table 2). Concerning individual lines performances, increased pod-yield and HI under stress were observed for all selected BC55 lines compared to their parental line, 55-437 excluding 55-314 (for pod yield and HI) and 55-15a (for pod yield), which were eliminated in 2002 (Table 2, above). All BC73 lines performed better than the recurrent parent on the average of yield and/or HI results except 73-43 (Table 2, below).

Drought stress-responses indices, SSI and STI, did not rank the lines in the same order (Table 3). Values given by both indices were negatively correlated between them, with r values of -0.36 ($P < 0.05$) and -0.47 ($P < 0.05$) in 2001 for BC55 and BC73 lines respectively, and of -0.12 (not

significant) and -0.77 ($P < 0.001$) in 2002 for BC55 and BC73 lines, respectively. The comparison of STI means allowed a statistical differentiation for both seasons and series of lines whereas SSI did not. Statistical differences on STI appeared more clearly in 2002 when the water regimes was highly differentiated especially for Chico, male parent and precocity donor, which shows poor drought adaptation despite its precocity. The parental recurrent line 55-437 was classified as or among the more susceptible lines, significantly on STI in 2002 along with 55-15a and 55-314 (Table 3, above). The drought susceptibility of the recurrent parent 73-30 comparing to its progenies was even more obvious (Table 3, below).

3. 2. *Earliness*

Except for the line 55-26, times to start flowering (F 50%) were generally significantly shortened for other breeding lines compared to the recurrent female parent 55-437 (Table 4). Flowering earliness transfer was not so successful for the BC73 lines, which were, in the main, similar to 73-30 on this trait except for 73-43 and 73-44. This was observed both years (Table 4). Similar differences between genotypes were observed for maturity percentages. Well-watered conditions generally significantly increased the level of maturity of genotypes but variations between years, water regimes and genotypes were high on this trait (Table 4). Under well-watered conditions, the maturity percentages obtained in 2002 were inferior to those in 2001 on both series of lines; it therefore seems that ample water resources at end-of-cycle (case of 2002) did not favour high maturity percentages.

3. 3. *Water status and light interception*

For BC55 lines, RWC was reduced by the water deficit from 70 DAS in 2001 (Fig. 1A), and seven days sooner (63 DAS) in 2002 (Fig. 1B). Considering that the rainfall distribution favoured superior soil water storage before the stress application in 2001 (Table 1), we can conclude that this parameter seems very sensitive to water availability. No genotypic effect, however, was observed on BC55 lines either in 2001 and 2002 (Fig. 1A and B). For BC73 lines, highly significant genotypic effects were observed in 2001 on RWC responses (Fig. 1, C) and a

genotype by treatment interaction at 55 DAS, largely due to 73-30, was significant in 2002 (Fig. 1D). The water treatment effect was not significant in 2001, maybe masked by high genotypic effect considered as main factor in the split-plot design (results not shown). The genotypic effect showed that RWC of 73-43 and 73-44 lines (Fig. 1C) and of 73-44 and Chico (Fig. 1D) decreased more rapidly under water shortage than that of other lines.

Water treatment effect on LAI of BC55 lines occurred from 63 DAS in 2001, but there were no genotypic differences (Fig. 2A). In 2002, the water treatment effect appeared from 70 DAS onwards, and thus some days after RWC was affected (Fig. 1B). Genotypic effect showed decreased LAI for Chico, 55-36 and GC8-35 from 70 DAS (Fig. 2B). On BC73 lines, there was no significant treatment effect in 2001 and genotypic effect discriminated the same lines than for RWC, 73-43 and 73-44 (Fig. 2C), at the same time (beginning of the stress period). In 2002, water treatment and genotypic effects were significant very early, from 55 DAS. From this date, Chico and 73-44 presented consistently the lowest LAI even under watered conditions (Fig. 2D) as for their RWC. In conclusion, water treatment effects and genotypic responses on RWC and LAI were often comparable but the genotypic discrimination using these traits was generally weak or absent. So their value as selection criteria largely depends on the water regime and genetic background of compared lines.

3. 4. Photosynthesis efficiency

Among the variables given by the Equipment used, F_v/F_m and SFI presented the highest variation according to water treatment and lines. In 2001, the measurements were only made on the BC73 lines. In 2001, the water treatment had no significant effect for this trait, as for all other traits except pod yield. However, significantly higher SFI values were observed for the line 73-9-11 than for other lines while the lowest values were observed for 73-43 and 73-44 lines throughout the measurement period (result not shown). SFI, although repeatedly correlated with F_v/F_m (r between 0.89 and 0.94), gave better genotypic discrimination than F_v/F_m . In 2002, on the contrary to 2001, the water treatment effect occurred early, less than one week after stress application, for both series of lines. A significant genotypic effect appeared at the end of stress period for both

experiments (Fig. 3). On BC55 lines, F_v/F_m and SFI values of the precocity donor, Chico, were the weakest under both conditions at 77 DAS (Fig. 3A). On BC73 lines, no genotypic effect was observed on F_v/F_m at any date but a significant water treatment and genotypic effects were observed since 55 DAS for SFI. The significant interaction genotype x treatment ($P < 0.01$) observed at 69 DAS on SFI showed that this parameter was more stable for the line 73-9-11 than for the other lines (Fig. 3B). These results were confirmed at the end of cycle where SFI value of 73-9-11 was significantly higher than those of 73-44 and Chico (Fig. 3C). In summary, data obtained on these fluorescence parameters showed strong sensitivity to drought and good genotypic discrimination particularly in the case of SFI. High photochemical efficiency was showed on 73-9-11 compared to other BC73 lines whereas the BC55 lines seemed very similar on this parameter.

3. 5. *Yield or yield-related traits correlations*

In 2001, Maturity showed positive significant correlation with yield in both experiments (Table 5A). It was the only significant correlation established on BC55 lines (fluorescence parameters were not measured). On BC73 lines, by contrast, two measurements dates of RWC, one of LAI, and all fluorimetric measurements realised (F_v/F_m and SFI) were correlated to yield (Table 5B). For RWC, LAI and fluorimetric measurements significant negative correlations with yield under stress were found (Table 5B and C). Most of the negative correlations on RWC, F_v/F_m and SFI established in 2001 on BC73 lines under drought (Table 5B) were also significant in 2002 but on BC55 lines (Table 5C) instead of BC73 lines where there were positive or not significant (Table 5D).

Negatives correlations between traits measured under well-watered conditions and yields under stress (Y_s) were found for SFI 56DAS ($P > 0.01$) and SFI 70DAS ($P > 0.05$) in 2001 for BC73 lines (Table 6). These negative correlations were also observed for RWC ($P < 0.01$) and SFI 70DAS ($P < 0.001$) in 2002 on BC55 lines. Stress response indices were correlated differentially according to crop season and lines: for example if some traits were correlated with SSI for BC73 lines in

2001, no trait was correlated with this index in 2002 for BC55 lines or when some traits were correlated with STI in 2002 for BC55 lines, no correlation was found on BC73 lines the same year (Table 6).

Yields observed under drought were not correlated with yields under well-watered conditions but yields obtained in 2001 were correlated with yields of 2002 for both series of lines (Table 7). On the other hand, yield reductions traduced by SSI were correlated positively with yields under well-watered and negatively with yields under stress whereas STI, which integrates yield reduction and yield potential, showed high correlations with yields under both treatments (Table 7).

4. Discussion

4.1. Association of precocity traits and high yield

The earliness of flowering and high pod maturity at harvest are the primary attributes to consider for improving groundnut under end-of-season water deficit because only the first flowers emitted produced mature pods when the crop season is brief (Khalifaoui, 1990a; Wright and Nageswara Rao, 1994). The BC55 breeding lines being superior to the female parent for both traits in 2002, these traits appeared to be efficiently transferred. The precocity transfer was less efficient for the BC73 breeding lines probably due to the genetic background of the female line because the methodology of transfer by selection was the same. High susceptibility of maturity of pod at harvest to end-of-cycle drought (Chapman et al., 1993; Khalifaoui, 1990b) was observed and this trait was correlated with yield in 2001 before reducing the variability of lines by removing two of them in 2002.

HI of all lines were high and stable under drought conditions, particularly for the BC55 lines. This observation shows that these lines possess a good ability of reallocation of assimilates to the seed under water-limited conditions (Turner et al., 2001). Yield and yield component measurements confirmed that the reduction of cycle duration is not the only one factor that explains yield performances under stress since the earliest line, Chico, showed, as the two 90-d

cycle parents, among the poorest values for yield under stress and stress responses indices. These results show that the selection initially practised for both precocity and high yield under water stress, have been efficient for improving yield and precocity together.

4. 2. Responses on physiological parameters

RWC is considered as a more useful integrator of plant water balance than leaf water potential (Sinclair and Ludlow, 1985; Wright and Nageswara Rao, 1994). Moreover our previous results have shown that it was more stable and water sensitive than water potential on groundnut (Clavel et al., in press). It was therefore chosen instead of leaf water potential. Significant decreases on RWC seemed in close accordance with soil water availability which was related to rain distribution before the application of water deficit. Moreover, an interaction genotype by treatment was observed on the BC73 lines that showed that the parental line, 73-30, conserved high RWC under stress longer than the other lines. Consequently RWC can be used to monitor differential plant responses to water supply. LAI gave results similar to RWC in terms of the timing of factors effects and variation between lines. The only difference observed was for the BC55 lines in 2002 where three lines were discriminated by LAI and none by RWC. Genotypic discrimination for RWC and LAI occurred rarely and it at different periods of the stress according to experiments. However both variables were not substitutable because the only situation where they were correlated between them was on BC73 lines in 2002, when genotypic differences were significant on both parameters (Fig. 1D and 2D). Fluorescence parameters, F_v/F_m and SFI, followed comparable patterns to RWC and LAI for treatment effect but, contrary to the preceding traits, presented significant variability among lines. Chlorophyll fluorescence gives an indirect measurement of the efficiency of photochemistry processes involved in photosynthesis. The energy dissipated by fluorescence is inversely proportional to the conversion in chemical energy for photosynthetic carbon assimilation (Maxwell and Johnson, 2000). The fluorescence emitted is then closely related to the efficiency of photochemical apparatus, essentially the photosystem II (PSII), that control the photosynthetic activity. Water deficit increases the sensitivity in the photosynthetic apparatus indirectly through stomatal regulation and consecutive reduction of CO₂

uptake (Ludlow and Muchow, 1990), but also by direct damage of PSII (Glynn and Colin, 2002; Colom and Vazzana, 2003).

4. 3. Associations of traits with yield

Giving the indeterminate flowering of groundnut it is not surprising that genotypes had plasticity for many traits according to variation in water regime especially under field conditions. An important difficulty for groundnut breeding is then to distinguish between developmental plasticity, observed for example for earliness components, and adaptive responses as those observed for RWC and LAI, which values were differentially correlated with yield. When contrasted materials are compared the relationship high RWC = high yield is habitually observed (Nautiyal et al., 1995). The negative correlations between RWC and yield under stress established for both series of lines (Table 5) could have been observed thanks to the genetically proximity of compared lines. This observation supports the hypothesis that a strategy of drought avoidance by early stomatal closure (favouring high water status and photosynthetic capacity) can be associated with poor yield potential on groundnut (Gautreau, 1977; Annerose, 1988; Clavel et al., 2004; Clavel et al., in press).

Traits that correlates with yield measured under stress and yield measured in the absence of stress were assumed to be constitutive (independent of the effects of the stress) whereas traits that correlate with yield only when measured under stress were assumed to be adaptive (reflecting the responses of genotypes to stress) (Fussel, 1991). Regarding data from table 5, the majority of trait-responses studied in 2001 and 2002 would be adaptive except, maybe, the fluorimetric parameters. Correlations between traits measured under well-watered conditions and yields under stress can also be used to identify traits that confer constitutively drought tolerance (Dingkuhn, personal communication). As correlations were found for BC73 in 2001 and for BC55 in 2002 on SFI and RWC (Table 6), this confirmed that photochemical efficiency is probably constitutive. Moreover, the SFI values showed great genetic variation (Fig. 3) and they were early and regularly correlated with yield (Table 5) indicating that the integrity of PSII is likely a key character in the

drought adaptation of groundnut. As PSII centre is situated on chloroplast cell membranes, decreases in membranes tolerance and restricted CO₂ availability under drought stress could possibly lead to increased susceptibility to photodamage (Colom and Vazzana, 2003). Observations that drought tolerant plants at the cellular level are able to keep their stomata open under severe water deficits (stomatal closure at low RWC) was documented in different studies on diverse plant species (Costa França et al., 2000; Bajji et al., 2002; Dhanda and Sethi, 2002) including groundnut (Clavel et al., in press). The measurement of chlorophyll fluorescence *in situ* is then a useful tool to evaluate the tolerance of the photosynthetic apparatus to environmental stresses (Rizza et al., 2001; Maxwell and Johnson, 2000). However, opposite yield correlations with some RWC, LAI and fluorimetric measurements were observed: negative correlations in 2001 under stress for BC73 lines and in 2002 for BC55 but not significant or positive for other situations (Table 5). A possible explanation of the negative correlations between physiological measurements and yields under stress is that under particular conditions, plants with weak stomatal conductance (thus with high RWC and weak CO₂ uptake) may have high photoinhibition but high yield under stress. It is not clear therefore if the value for SFI must be high or low to favour high yield under stress and what conditions allows expressing the largest genotypic variability and highest correlation with yield. From this complex pattern of correlations it can be deduced that constitutive and adaptive traits probably influence interactively the phenotypic responses making it difficult to establish generally valid physiological selection criteria. The main reason for this is that plants, and especially a drought adapted species as groundnut, possess several drought adaptive strategies depending on their genetic background and environmental pressure. Nevertheless, it is likely that cell-level tolerance mechanisms (Wright and Nageswara Rao, 1994; Nautiyal et al., 1995; Clavel et al., in press) and tolerance of photosynthetic apparatus are important constitutive component of drought adaptation in groundnut and need to be taken into account in variety selection.

5. Conclusion

The study demonstrated that genetic variation and correlation of physiological traits with genotypic performances in the field can be established among genotypes having high similarities. In addition, the different agronomical significance of the two drought response indices used (SSI and STI) showed that it is very critical for progress in classical breeding using physiological criteria to interpret these indices suitably in order to characterise properly the variety drought resistance in the field.

Genotypic statistical differences for RWC and LAI were rarely observed and could be therefore difficult to use as selection criteria if the water control is not very precise and/or if variety differences are weak. As opposite genotypic responses were obtained whatever lines and treatment on some of the fluorescence parameters, in particular the Structure-Function Index values that traduce the status of photochemical apparatus. The technique of chlorophyll fluorescence, as it is rapid, sensitive and non-destructive, could therefore become a useful method for determining variations in tolerance of the photosynthetic apparatus in breeding for resistance to drought. Nevertheless, the role and value of the fluorimetric responses for maintaining yield under drought needs to be clarify due to difference existing in groundnut drought adaptation strategies.

Improvement of drought adaptation in the cultivated groundnut species is therefore possible by using some of the proposed criteria in association with yield-based studies in the field. For a selection trait to be potentially relevant for breeding, the basic requirements would be (i) that this trait was chosen on the basis of existing variability detected on appropriate genetic materials (ii) that the performances of material in the field was suitably traduced in terms of drought tolerance and drought susceptibility in the targeted area and (iii) that this trait was correlated with yield performance in the field.

Acknowledgments

This paper is based on the experience gained in Senegal with the financial support of European Economic Community (EEC) and conducted by the Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) and the Centre de Cooperation International en Recherche Agronomique pour le

Développement (CIRAD). We would like to thank all the research scientists and technicians, who have contributed to this program. Special thanks go to Dr Michael Dingkuhn for his assistance in the preparation of this manuscript.

References

- Annerose, D.J.M. 1988. Physiological criteria for improving groundnut adaptation to drought. *Oléagineux* 43, 217-221.
- Annerose, D.J.M., M. Diagne. 1990. Characterization of agricultural drought in semi-arid zones. I Description of simple assessment model applied to cultivated groundnut in Senegal. *Oléagineux* 45, 547-557.
- Annerose, D.J.M. 1991. Characterisation of agricultural drought in semi-arid zones. II. Assessment of agricultural drought forms in Senegal by simulation of the crops water balance. *Oleagineux* 46, 61-67.
- Bajji, M., Kinet, J.M., Stanley, L., 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 36, 61-70.
- Chapman, S.C., Ludlow, M.M., Blamey, F.P.C., Fisher, K.S., 1993. Effect of drought during early reproductive development of growth of cultivars of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). II Biomass production, pod development and yield. *Field Crops Res.* 32, 211-225.
- Clavel, D., Annerose, D.J., 1997. Breeding groundnut for drought adaptation in Senegal. *International Arachis Newsletter* 17, 33-35.
- Clavel, D., Sarr, B., Marone, E., Ortiz, R., 2004. Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions. *Agronomie* 24, 1-8.
- Clavel, D., Drame, N.K., Macauley, H.R., Braconnier, S., Laffray, D., (in press). Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. *Environ. Exp Bot.*

- Colom, M., Vazzana, C., 2003. Photosynthesis and PSII fonctionnality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass. *Environ. Exp. Bot.* 49, 135-144.
- Costa França, M.G., Pham Thi, A.T., Pimentel, C., Pereyra Rossiello R.O., Zuily-Fodil Y., Laffray, D., 2000. Differences in growth and water relation among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induces drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 43, 227-337.
- Dhanda, S., Sethi, G., 2002. Tolerance to drought stress among selected Indian wheat cultivars. *J. Agric. Res. (Camb.)* 139, 319-326.
- Fernandez, G.C.J. 1992. Selection criteria for assessing stress tolerance, in: *Adaptation of Food Crops Temperature and Water Stress, Proceedings of an International Symposium, Taïwan*, pp. 257-269
- Fisher, R.A., Maurer, R., 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I grain yield response. *Aust. J. Agric. Res.* 29, 897-912.
- Fukai, S., Cooper, M., 1995. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Res.* 40, 67-86.
- Fukai, S., Pantuwan, G., Jongdee, B., Cooper M., 1999. Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Res.* 64, 61-74.
- Fussell, L.K., Bidinger, F.R., Bieler, P., 1991. Crop physiology and breeding for drought tolerance: research and development. *Field Crops Res.* 27, 183-199.
- Gautreau, J., 1977. Levels of intervariety leaf potentials and adaptation of groundnut to drought in Senegal. *Oléagineux* 32, 323-332.
- Glynn, C.P., Colin N., 2002. Identification of drought tolerant woody perennial using chlorophyll fluorescence. *J. of Arboriculture* 28, 215-223.
- Jackson, P., Robertson, M., Cooper, M., Hammer, G., 1996. The role of physiological understanding in plant breeding from a breeding perspective. *Field Crop Res.* 49, 11-37.
- Khalfaoui, J.L.B., 1990a. Genetic adaptation to drought of cultivated species and consequences on plant breeding. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 137, 125-137.

- Khalfaoui, J.L.B., 1990b. Etude des composantes de la précocité chez l'arachide. *Oléagineux* 45, 81-87.
- Khalfaoui, J.L.B., 1990. Heredity of extreme precocity in the case of a cross between two Spanish groundnut varieties. *Oléagineux* 45, 419-436.
- Khalfaoui, J.L.B., 1991. Approche de l'amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse. Cas de l'arachide au Sénégal, In: Aupelf-Uref (Ed.), *Amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, Paris, pp. 51-63.
- Lazar, M., Salisbury, C., Worrall, W., 1995. Variation in drought susceptibility among closely related wheat lines. *Field Crops Res.* 41, 147-153.
- Ludlow, M.M., Muchow, R., 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water limited environments. *Adv. Agron.* 43, 107-153.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- Nageswara Rao, R.C., Sardar Singh, Sikavumar, M.K.V., Srivastava, K.L., Williams, J.H., 1985. Effect of water deficit at different growth phases of peanut. I. Yield responses. *Agron. J.* 77, 782-786.
- Nageswara Rao, R.C., Williams, J.H., Sikavumar, M.K.V., Wadia, K.D.R., 1988. Effect of water deficit at different growth phases of peanut. II. Response to drought during preflowering phase. *Agron. J.* 80, 431-438.
- Nautiyal, P.C., Ravindra, V., Joshi, J.C., 1995. Gas exchange and leaf water relations in two peanut cultivars of different drought tolerance. *Biologica Plantarum* 37, 371-374.
- Ndunguru, B.J., Ntare, B.R., Williams, T.H., Greenberg, D.C., 1995. Assessment of groundnut cultivars for end-of-season drought tolerance in Sahelian environment. *J. Agric. Res. (Camb.)* 125, 79-85.
- Ntare, B.R., Williams, J.H., Dougbedji, F., 2001. Evaluation of groundnut genotypes for eat tolerance under field conditions in Sahelian environment using a simple physiological model for yield. *J. Agric. Sci.* 136, 81-88.

- Reddy, T.Y., 2003. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: A review. *Acta Agronomica Hungarica* 51, 205-227.
- Richards, R.A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul.* 20, 157-166.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A., Cattivelli L., 2001. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate cold acclimation and freezing tolerance of winter spring oat. *Plant Breeding* 120, 389-396.
- Rosales-Serna, R., Kohashi-Shibata, J., Acosta-Gallegos, J.A., Trejo-Lopez, C., Ortiz-Cereceres, J., Kelly James, D., 2004. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field Crops Res.* 85, 203-211.
- Sadras, V.O., Milroy, S.P., 1996. Soil water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchanges: a review. *Field Crops Res.* 47, 253-266.
- Sikavumar, M.V.K., 1988. Predicting rainy season potential from the onset on rain in southern Sahelian and Sudanian climatic zones of West Africa. *Agric. For. Meteorol.* 42, 295-305.
- Sikavumar, M.V.K., 1991. Drought spells and drought frequencies in West Africa. *Research ICRISAT, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (Ed.), Information Bulletin 13, Patancheru.*
- Sinclair, T.R., Ludlow, M.M., 1985. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled plant water potential. *Aust. J. Plant Physiol.* 12, 213-217.
- Strasser, B.J., Strasser, R.J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test, In: Kluwer Academic Publisher (Ed.), *Photosynthesis: from light to biosphere*, Dordrecht, pp. 977-980.
- Subbarao, G.V., Johansen, C., Slinkard, A.E., Nageswara Rao, R.C., Saxena, N.P, Chauhan, Y.S., 1995. Strategies for improving drought resistance in grain legume. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 469-523.
- Turner, N.C., Wright, G.C., Siddique, K.H.M., 2001. Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Adv. Agron.* 71, 193- 231.

- Williams, J.H., Drexler, J.S., 1981. A nondestructive method for determining peanut pod maturity. *Peanut Sci.* 8, 134-141.
- Williams, J.H., Boote, K.J., 1995. Physiology and modelling predicting the "unpredictable legume", In: Pattee, H.E., Stalker, H.T (Eds), *Advances in Peanut Science*, Stillwater OK, pp. 301-353.
- Wright, G.C., Hubick, K., Farquhar, G.D., 1991. Physiological analysis of peanut cultivar response to timing duration of drought stress. *Aust. J. Agric. Res.* 42, 453-470.
- Wright, G.C., R.C. Nageswara Rao., 1994. Groundnut water relations, In: Smartt, J. (Ed.). *The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Chapman & Hall, London. pp. 281-335.

Table 1. Rainfall (mm) and irrigation supply (mm) at Bambey (Senegal) in 2001 and 2002: sowing dates were around 5 September, water deficit were applied from 50 days after sowing (DAS) around 25 October and harvest was made at 80 DAS

Period	2001			2002		
	Rainfall	Irrigation		Rainfall	Irrigation	
		Watered	Stressed		Watered	Stressed
September ¹	228.4	15		115.4	45	45
October	37.4	60	60	38.0	110	110
Total at 50DAS			340.8			308.4
From 50DAS	11.0	105	20		235	60
Totals	276.8	180	80	153.4	390	215
Total water supply ²		456.8	356.8		543.4	368.4

¹ From sowing date

² Including rainfall and irrigation: -28% and -47% were the differences in water supply between stressed and watered treatments in 2001 and 2002, respectively.

Table 2. Pod yields and harvest index (HI) on BC55 lines (above) and on BC73 lines (below) compared to parental lines according to water treatment in 2001 and 2002

Genotype	2001				2002			
	Pod yield		HI		Pod yield		HI	
	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed
55-128	1398a	1274ab	0.55ab	0.51ab	3249a	2712b	0.41ab	0.43a
55-15a	1244ab	1047b	0.54ab	0.52ab	–	–	–	–
55-26	1351ab	1090b	0.44b	0.45b	3485a	2819b	0.38b	0.40b
55-314	1276ab	856b	0.49b	0.42b	–	–	–	–
55-315	1368a	1082b	0.59a	0.46ab	3340a	2613b	0.42ab	0.42ab
55-319	1525a	1182b	0.61a	0.52ab	3392a	2520b	0.39bc	0.39bc
55-36	1437a	1380a	0.64a	0.53ab	3259a	2588b	0.43a	0.42a
GC8-35	1448a	1301a	0.61a	0.55ab	3201a	2908ab	0.40b	0.41ab
55-437 ♀	1315ab	935b	0.52ab	0.40b	3200a	2624b	0.37b	0.39b
Chico ♂	1348ab	1062b	0.57ab	0.52ab	2564b	1956c	0.43a	0.42a
Genotype (G)	***		***		***		***	
Treatment (T)	***		n.s.		**		n.s.	
G x T	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

Genotype	2001				2002			
	Pod yield		HI		Pod yield		HI	
	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed
73-28-1	1269a	1105ab	0.43ab	0.46ab	3347a	2089bc	0.38ab	0.40ab
73-43	1164ab	1099ab	0.42ab	0.52ab	–	–	–	–
73-44	1305a	1057ab	0.59a	0.62a	3314a	1809c	0.44a	0.38b
73-9-11	1214a	1101ab	0.39b	0.35b	3348a	2242bc	0.38ab	0.36ab
73-30 ♀	937b	693b	0.39b	0.34b	2958b	1927c	0.36b	0.33b
Chico ♂	1280ab	1069ab	0.55ab	0.60a	2852b	1282c	0.43a	0.45a
Genotype (G)	***		***		***		***	
Treatment (T)	*		n.s.		***		n.s.	
G x T	n.s.		*		n.s.		n.s.	

Letters compare genotypes: means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test. Genotype, treatment and G x T effects are declared n.s. if non significant and *, **, *** if significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively.

Table 3. Yield-based drought responses indices, SSI and STI, on BC55 lines (above) and on BC73 lines (below) compared to parental lines in 2001 and 2002

Genotype	2001			2002	
	Indices ¹	SSI (rank)	STI (rank)	SSI (rank)	STI (rank)
55-128		0.49 (2)	0.95ab (4)	0.64 (2)	0.86a (3)
55-15a		0.87 (4)	0.69c (8)	–	–
55-26		1.06 (5)	0.78b (6)	0.97 (4)	0.95a (1)
55-314		1.80 (10)	0.58c (10)	–	–
55-315		1.15 (6)	0.79b (5)	1.11 (6)	0.85a (4)
55-319		1.23 (8)	0.96ab (3)	1.32 (7)	0.83a (5)
55-36		0.22 (1)	1.06a (1)	1.04 (5)	0.82a (6)
GC8-35		0.56 (3)	1.00ab (2)	0.47 (1)	0.91a (2)
55-437 ♀		1.58 (9)	0.65c (9)	0.89 (3)	0.81a (7)
Chico ♂		1.16 (7)	0.76b (7)	1.53 (8)	0.55b (8)
Genotype (G)		n.s.	***	n.s.	***

Genotype	2001			2002	
	Indices ¹	SSI (rank)	STI (rank)	SSI (rank)	STI (rank)
73-28-1		0.89 (3)	1.14a (1)	1.11(5)	0.62abc (3)
73-43		0.38 (1)	1.04a (5)	–	–
73-44		1.31 (5)	1.12a (2)	0.91(3)	0.72ab (2)
73-9-11		0.63 (2)	1.09a (4)	0.80 (1)	0.77a (1)
73-30 ♀		1.79 (6)	0.53b (6)	0.86 (2)	0.60abc (4)
Chico ♂		1.13 (4)	1.11a (3)	1.03 (4)	0.49c (5)
Genotype (G)		n.s.	***	n.s.	*

¹ Drought-response indices: SSI (stress susceptibility index according to Fisher and Maurer, 1978) and STI (stress tolerance index according to Fernandez, 1992).

Means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test, n.s. is non significant and *, **, *** are significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively

Table 4. Flowering earliness (F 50%) in days after sowing and maturity percentage of pods at harvest (Mat %) on BC55 lines and on BC73 lines (below) compared to parental lines according to water treatment in 2001 and 2002

Genotype	2001				2002			
	F 50%		Mat %		F 50%		Mat %	
	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed
55-128	24.3b	24.3b	74.4a	69.0ab	23.3cd	23.0d	62.5ab	62.9ab
55-15a	24.3b	24.0b	70.7ab	61.6bcd	—	—	—	—
55-26	24.7ab	24.3b	62.8abc	60.2bcd	24.5ab	24.3ab	49.6bc	47.8bcd
55-314	24.0b	24.0b	64.1abc	48.9e	—	—	—	—
55-315	24.0b	24.0b	67.5abc	47.4e	23.3cd	23.8bcd	56.3abc	40.2de
55-319	24.0b	24.0b	70.7ab	60.0bcd	23.5cd	23.8bcd	42.2cde	40.9de
55-36	24.0b	24.0b	71.5ab	65.7abc	24.0bc	24.0bc	58.2abc	52.6abc
GC8-35	24.0b	24.0b	73.1ab	62.7abc	23.5cd	23.0cd	62.5ab	57.2abc
55-437 ♀	24.7ab	26.0a	60.4abc	45.2e	25.0a	24.3ab	38.0e	36.9e
Chico ♂	23.0c	23.0c	77.1a	72.5ab	22.8d	23.3cd	74.3a	62.0ab
Genotype (G)	***		***		***		***	
Treatment	n.s.		***		n.s.		*	
G x T	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

Genotype	2001				2002			
	F 50%		Mat %		F 50%		Mat %	
	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed	Watered	Stressed
73-28-1	25.3a	25.0a	62.5b	59.6b	24.5ab	24.5ab	47.4bcd	38.1cde
73-43	24.3b	23.7bc	71.2a	69.5a	—	—	—	—
73-44	24.0b	23.0c	70.1a	70.3a	22.0c	22.3c	69.1a	52.3bc
73-9-11	25.3a	25.3a	60.5b	52.5bc	24.8ab	25.0a	41.9cde	29.3de
73-30 ♀	26.0a	25.3a	48.3c	47.9c	25.3a	25.0a	26.9e	26.2e
Chico ♂	24.7b	23.3b	72.5a	74.1a	23.0bc	24.5ab	75.4a	50.9bcd
Genotype (G)	***		***		***		***	
Treatment (T)	n.s.		n.s.		n.s.		*	
G x T	n.s.		n.s.		n.s.		*	

Letters compare genotypes: means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according SNK test. Genotype, treatment and G x T effects are declared n.s. if non significant and *, **, *** if significant at the 0.05, 0.01, 0.001 probability levels

Table 5A and 5B. Correlations coefficient (r) for regressions between traits and pod yield on BC55 (A) and BC73 lines (B) under watered, stressed and across conditions (all plots) in 2001

Traits ¹	A) BC55 lines			B) BC73lines		
	Correlation (r)			Correlation (r)		
	Watered	Stressed	All plots	Watered	Stressed	All plots
Maturity	n.s.	0.64***	0.53**	0.54*	0.67***	0.60**
Shelling	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.59**	n.s.
RWC 48DAS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.54*	-0.49*
RWC 76DAS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.58**	n.s.
LAI 48DAS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.62**	n.s.
<i>Fv/Fm</i> 56DAS	-	-	-	n.s.	-0.59*	n.s.
<i>Fv/Fm</i> 63DAS	-	-	-	0.53*	n.s.	n.s.
<i>Fv/Fm</i> 70DAS	-	-	-	n.s.	-0.45*	n.s.
SFI 56DAS	-	-	-	n.s.	-0.66**	n.s.
SFI 63DAS	-	-	-	n.s.	-0.46*	n.s.
SFI 70DAS	-	-	-	n.s.	-0.51*	n.s.

¹ times (in DAS) of measurements for RWC, LAI and fluorimetry. Fluorimetry was not realised on BC55 lines in 2001.

r values followed by *, **, *** indicate significance of regression at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively

Table 5 C and 5D. Correlations coefficient (r) for regressions between traits and pod yield on BC55 (C) and BC73 lines (D) under watered, stressed and across conditions (all plots) in 2002

Traits ¹	C) BC55 lines			D) BC73 lines		
	Correlation (r)			Correlation (r)		
	Watered	Stressed	All plots	Watered	Stressed	All plots
Maturity	-0.43**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Shelling	0.47**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
RWC 48DAS	n.s.	-0.40*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
RWC 55DAS	n.s.	-0.79***	n.s.	n.s.	0.55**	0.66***
RWC 69 DAS	n.s.	-0.52**	-0.47**	n.s.	0.65***	0.80***
RWC 76 DAS	n.s.	-0.40*	n.s.	n.s.	0.70***	0.88***
LAI 55DAS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.61***	0.45*
LAI 69DAS	n.s.	0.37*	0.50**	n.s.	0.69***	0.62**
LAI 76 DAS	n.s.	0.30*	0.47**	n.s.	n.s.	0.59**
<i>Fv/Fm</i> 69DAS	0.50**	-0.55***	0.37**	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Fv/Fm</i> 6DAS	0.54**	n.s.	0.52***	n.s.	n.s.	n.s.
SFI 55DAS	0.39*	-0.59***	0.41***	n.s.	n.s.	0.44*
SFI 69DAS	0.60***	-0.66***	0.55***	n.s.	n.s.	0.50*
SFI 76DAS	0.58***	-0.47*	0.63***	n.s.	n.s.	0.48*

¹ times (in DAS) of measurements for RWC, LAI and fluorimetry.

r values followed by *, **, *** indicate significance of regression at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively

Table 6. Correlations coefficient (r) for regressions between traits under watered conditions and yields under drought stress (Ys) and and between traits under stressed conditions and drought response indices (SSI and STI) in 2001 and 2002 for both series of lines

		Correlation (r) BC55 lines	Correlation (r) BC73 lines
Traits under watered and Ys			
2001		n.s. for any trait	SFI 56DAS, r = -0.58**
			SFI 70DAS, r = -0.47*
2002		RWC 70 DAS, r = -0.49**	LAI 62 DAS, r = 0.48*
		SFI 70DAS, r = -0.75***	
Traits under stress and Drought-responses indices			
2001			
	SSI	n.s. for any trait	LAI 48DAS, r = 0.60**
			LAI 76DAS, r = 0.46*
	STI	Mat %, r = 0.60**	LAI 48 DAS, r = -0.46*
2002			
	SSI	n.s. for any trait	n.s. for any trait
	STI	RWC 63DAS, r = 0.36*	n.s. for any trait
		RWC 70DAS, r = 0.39*	

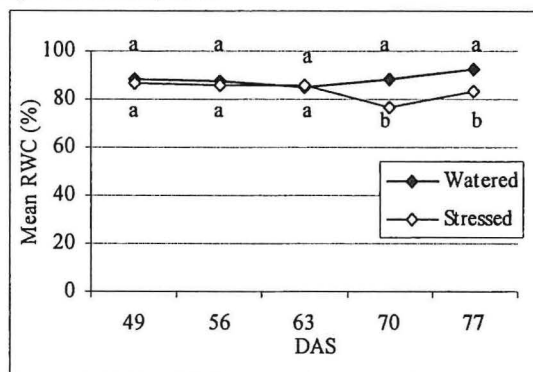
r values followed by *, **, *** indicate significance of regression at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively. Fluorimetry was not realised on BC55 lines in 2001.

Table 7. Correlations coefficient (r) for regressions between pod-yields (Y_i for well-watered and Y_s for stressed conditions) across treatments and crop seasons and between pod-yields and drought responses indices for both series of lines in 2001 and 2002

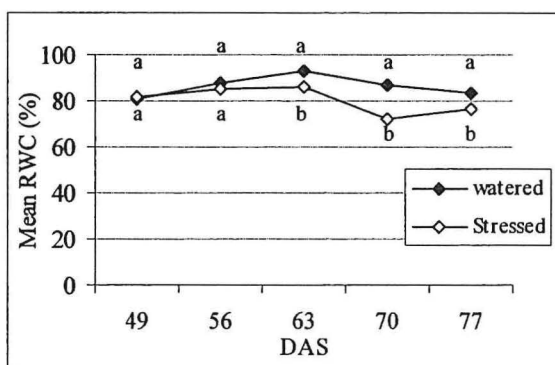
	Correlation (r) BC55 lines	Correlation (r) BC73 lines
Across treatments		
Y_i and Y_s in 2001	n.s.	n.s.
Y_i and Y_s in 2002	n.s.	n.s.
Across crop seasons		
All plots in 2001 and 2002	0.43**	0.50**
Drought-responses indices		
Crop season 2001		
SSI – Y_i	0.38*	0.58**
SSI – Y_s	-0.78***	-0.87***
STI – Y_i	0.86***	0.45*
STI – Y_s	0.72***	0.85***
Crop season 2002		
SSI – Y_i	0.52**	n.s.
SSI – Y_s	-0.58**	-0.93***
STI – Y_i	0.78***	0.58**
STI – Y_s	0.87***	0.95***

r values followed by *, **, *** indicate significance of regression at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels, respectively. Fluorimetry was not realised on BC55 lines in 2001.

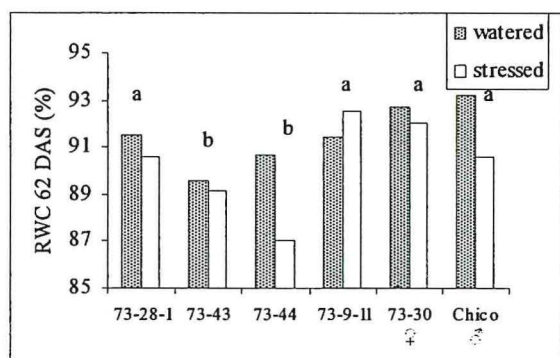
A) BC55 lines, 2001



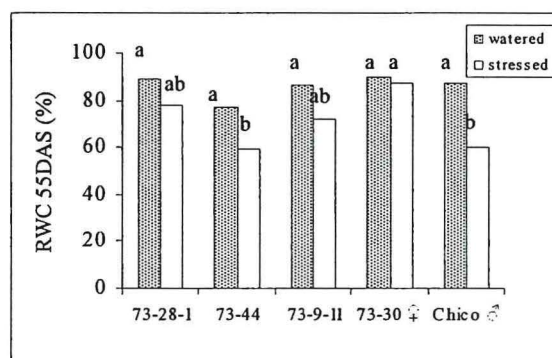
B) BC55 lines, 2002



C) BC73 lines, 2001



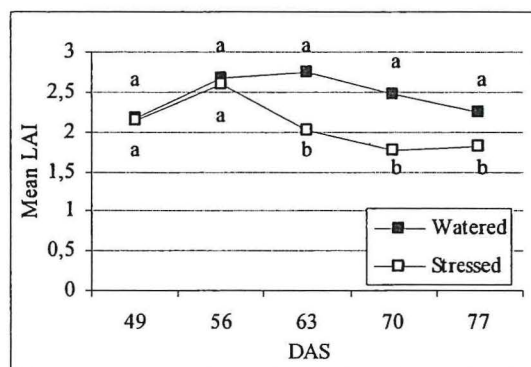
D) BC73 lines, 2002



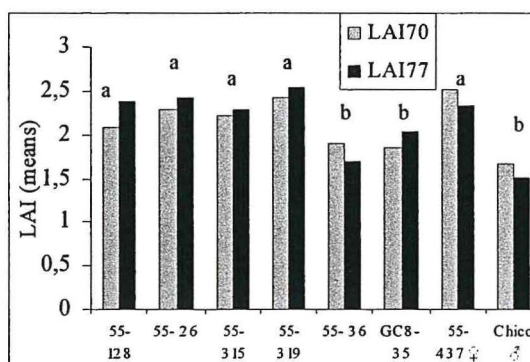
Symbols represent treatment means across genotypes if there was no significant genotypic effect (A and B) and bars represent genotypic means across treatments if there was genotypic effect in the ANOVA for the considered periods (C and D). Genotypic or treatment means represented by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to SNK test.

Fig.1. Relative water content (RWC) of BC55 lines (A and B) and BC73 lines (C and D) in 2001 (left) and 2002 (right)

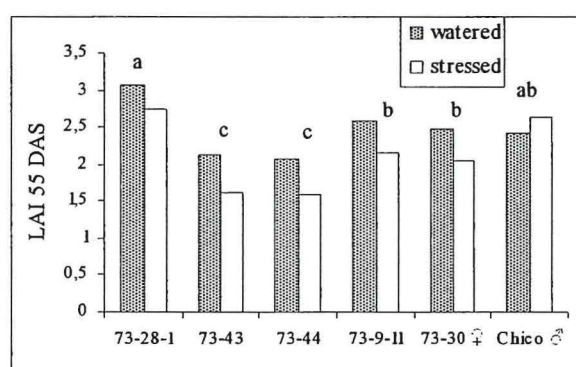
A) BC55 lines, 2001



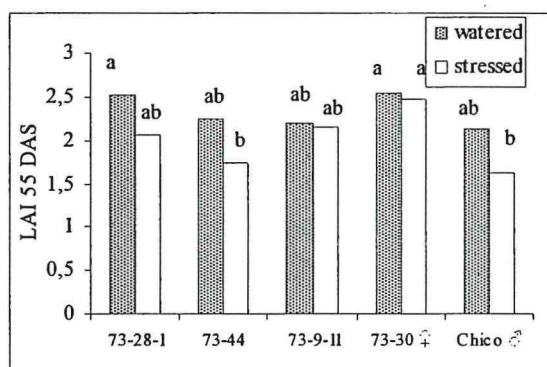
B) BC55 lines, 2002



C) BC73 lines, 2001



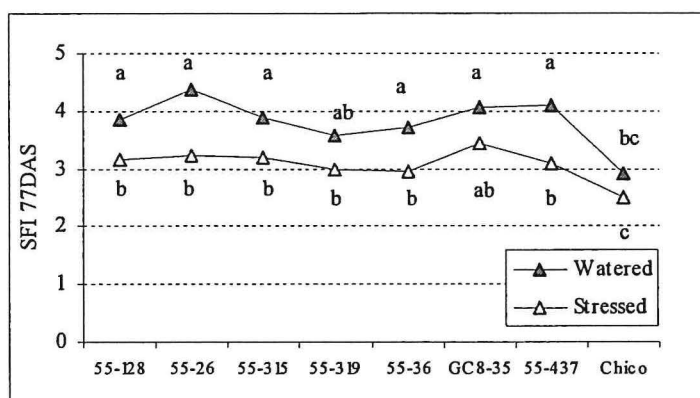
D) BC73 lines, 2002



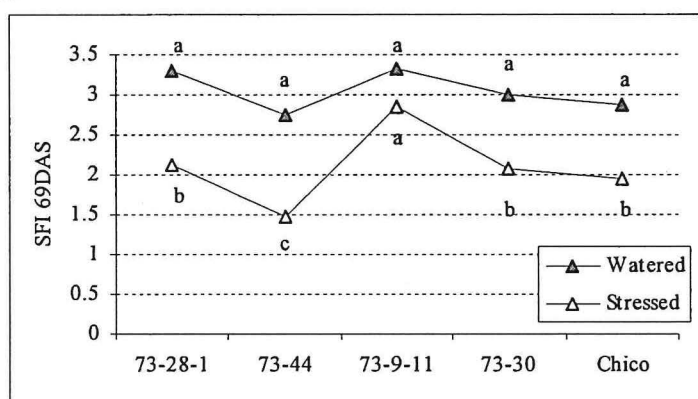
Symbols represent treatment means across genotypes if there was no significant genotypic effect (A) and bars represent genotypic means if there was genotypic effect in the ANOVA for the considered periods (B, C and D). Genotypic or treatment means represented by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to SNK test.

Fig.2. LAI values of BC 55 lines (A and B) and BC73-30 lines (C and D) in 2001 (left) and 2002 (right)

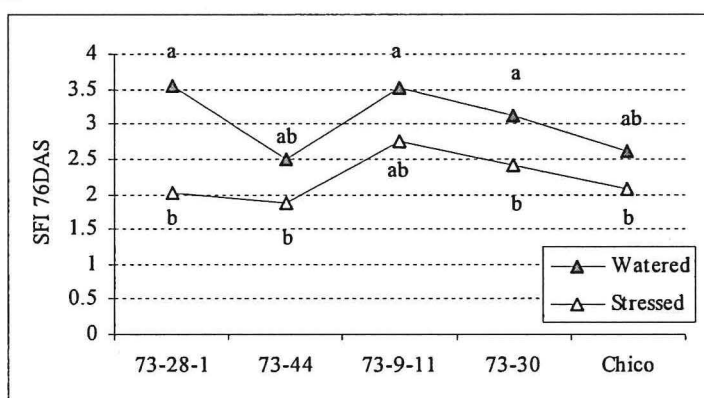
A) BC55 lines, 2002



B) BC73 lines, 2002



C) BC73 lines, 2002



Genotypic means followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to SNK test

Fig. 3. Structure Function Index (SFI) calculated from fluorimetry measurements on BC55 lines at 77 DAS (A) and on BC73 lines at 69 DAS (B) and 76 DAS (C) in 2002.

4.2. Synthèse des résultats

4.2.1. Amélioration des caractères agronomiques

Les rendements obtenus en conditions de bonne alimentation hydrique n'ont pas été corrélés avec ceux qui ont été réalisés en conditions de déficit hydrique. Pour certaines lignées, cependant, la sélection pratiquée a permis de maintenir ou d'améliorer le rendement en conditions de stress et en conditions de bonne alimentation hydrique tout en améliorant la qualité des gousses, notamment la maturité. Le taux de maturité a été le paramètre de qualité le plus sensible au déficit hydrique. Les rendements obtenus ont été stables d'une année sur l'autre avec un coefficient de corrélation voisin de 0,43 ($P < 0,01$) pour les lignées BC55 et de 0,50 ($P < 0,01$) pour les lignées BC73 bien que les conditions d'application du stress hydrique de fin de cycle aient été sensiblement différentes en 2001 et en 2002. L'indice de récolte des lignées a été généralement élevé et stable confirmant leur bonne capacité adaptative pour la réallocation des assimilats vers les grains sous contrainte hydrique.

4.2.2. Indices de réponse au stress

Deux indices de réponse au stress basés sur le rendement en gousses ont été utilisés : STI (Stress Tolerance Index, Fernandez, 1992) et SSI (Stress Susceptibility Index, Fisher et Maurer, 1978). Les classements variétaux donnés par ces indices n'ont pas été les mêmes et STI a permis une discrimination statistique des lignées alors que les différences entre SSI des lignées n'ont jamais été significatives. Par ailleurs les STI ont été positivement corrélés avec les rendements en conditions de déficit et de non déficit alors que ces corrélations ont été plus faibles ou non significatives pour les SSI. L'indice SSI qui traduit une réduction relative de rendement confirme donc qu'il est moins pertinent et moins sélectif que STI, qui intègre la réduction de rendement et le rendement potentiel.

4.2.3. Variabilité des caractères physiologiques

Les discriminations entre variétés permises par les mesures du contenu relatif en eau (CRE) et l'indice foliaire (LAI), n'ont été possibles que dans de rares cas notamment en conditions de fort déficit ou lorsque la variabilité morphologique du matériel comparé était relativement élevée (cas des lignées BC73 par rapport aux lignées BC55). Les corrélations établies entre les différentes séries de mesures de ces paramètres physiologiques (mesurés à différents stades de déficit) et les rendements finaux sous les deux conditions (stress et non stress) ont été soit non significatives soit non stables en fonction des années et de la série de géotypes considérée. En revanche, les résultats obtenus sur les paramètres de fluorescence traduisant l'efficacité de l'appareil photosynthétique en termes de photochimie au niveau du photosystème II (PSII), ont montré une capacité de discrimination intergénotypique plus élevée. Des corrélations significatives ont été établies entre les rendements et certaines mesures de fluorimétrie notamment, le ratio de la fluorescence variable sur la fluorescence maximale (F_v/F_m) et l'indice de vitalité (SFI pour Structure-Fonction Index) pour les deux séries de géotypes et pendant les deux années de test. Ces résultats permettent de conclure que la tolérance du PSII a un rôle essentiel dans l'adaptation à la sécheresse de l'arachide et que ce trait est probablement de nature constitutive. Cependant le sens de la plupart des liaisons établies a varié selon les années et les lignées considérées ce qui rend difficile les explications fonctionnelles d'une portée générale.

4.3. Conclusion

Ces résultats montrent que l'arachide possède des capacités d'adaptation variées en fonction de son fond génétique et de la pression du déficit subit. L'établissement d'une relation répétable entre la variation des caractères physiologiques et la variation du rendement n'a pas été possible pour les CRE et les LAI. En revanche, les nombreuses corrélations significatives obtenues entre les mesures fluorimétriques et les rendements pour les deux séries de matériels permettent d'envisager une utilisation effective de la fluorimétrie en sélection d'autant plus efficace que la mesure n'est pas destructive et peut être réalisée assez rapidement sur de grands effectifs. Cependant la plupart des corrélations établies, y compris celles qui concernent la fluorimétrie, ont changé de sens selon les

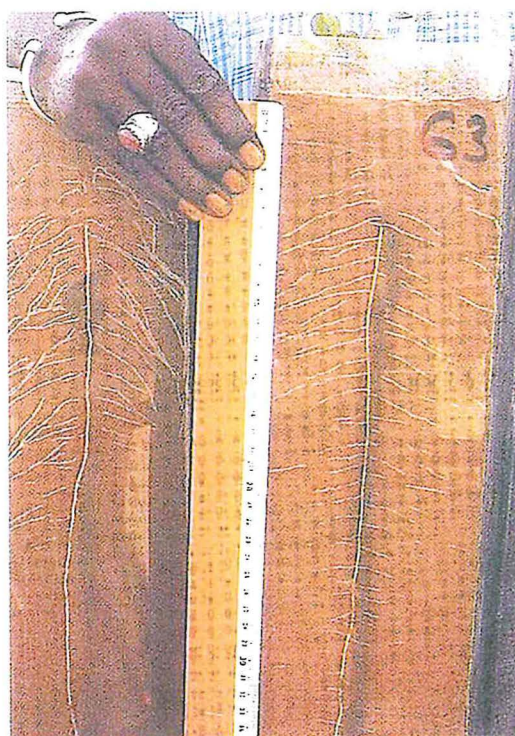
années et les génotypes. Il semble, par conséquent, difficile d'obtenir des critères physiologiques de sélection généralement valides.

Les résultats ont montré que le transfert de précocité, notamment l'amélioration des taux de maturité par rapport à ceux des parents récurrents, avait été très efficace sur la série BC55 et un peu moins sur la série BC73. Par conséquent, ce programme a permis la diffusion dans le circuit du développement agricole et de la production de semences de 6 nouveaux cultivars très précoces (80 jours) dont la production est supérieure ou équivalente à celles des anciens cultivars 55-437 et 73-30 (variétés parentales de 90 jours). Cette sélection par rétro croisement pour la réduction du cycle avec maintien voire l'augmentation du rendement a donc été efficace alors qu'aucun critère physiologique n'a été utilisé. Le matériel végétal sélectionné a été néanmoins utile sur le plan méthodologique notamment pour établir l'intérêt des indices de réponse et de certaines mesures physiologiques pour la sélection. Il pourra également s'avérer intéressant dans le cadre de la recherche de marqueurs moléculaires.

CHAPITRE 5

SELECTION PRECOCE EN CONDITIONS CONTROLEES

Planche V. Mesure de la profondeur du système racinaire de l'arachide en rhizotron (photo Clavel).



5.1. Introduction

L'évaluation au champ de génotypes dont la longueur de cycle est adaptée à la zone ciblée et dont le rendement et la qualité des gousses sont satisfaisants dans ces zones est une nécessité incontournable pour la sélection variétale. Outre le fait que les sélections directes pour le rendement manqueraient d'efficacité en conditions de sécheresse, objection fondée sur le plan théorique, une autre contrainte est que les sélections au champ présentent des coûts financiers et des risques élevés (accident de culture fréquents). Les principales difficultés sont liées aux fluctuations environnementales impossibles à contrôler simultanément comme l'homogénéité des sols, la température, la photopériode et l'alimentation en eau. Cependant, il n'existe toujours pas, à ce jour, de système standardisé pour mesurer la résistance à la sécheresse (Blum, 1999). En zone sahélienne, la mise au point d'un dispositif normalisé en pots sous serre est accentuée par le fait que le schéma pluviométrique le plus fréquent est le déficit hydrique de fin de cycle. Par conséquent la logistique qui devrait être mise en œuvre pour mimer ce déficit, sera lourde et les risques encourus par les plantes tout au long de leur cycle, supérieurs. Or, un test de criblage, pour être vraiment utile au sélectionneur, doit être précoce. Ainsi, l'expérimentation que nous avons réalisée a été limitée dans le temps à 6 semaines : 2 semaines de croissance en conditions hydriques non limitante et 4 semaines pendant lesquelles deux régimes hydriques ont été appliqués. Elle a été réalisée en rhizotrons pour avoir accès aux profondeurs d'enracinement. Les mesures conduites durant les quatre dernières semaines. Elles ont concerné les variations morphologiques (profondeurs racinaires, matières sèches racinaires et aériennes, surface foliaire et efficacité de l'utilisation de l'eau), le statut hydrique de la partie aérienne, sa rapidité de fermeture stomatique et la résistance des membranes cellulaires à la dessiccation.

L'objectif était de caractériser des différences entre quatre génotypes de référence (55-437, Fleur 11, 73-30 et 57-422) s'exprimant précocement afin de mettre au point des tests de criblage précoces en rhizotrons (Planche V). On a cherché à relier les réponses développementales et physiologiques entre elles et à les analyser en fonction des performances des cultivars au champ. Le choix de ces quatre cultivars a tenu compte de leurs comportements agronomiques différenciés des conditions d'alimentation hydrique variées au champ. Un des génotypes, 57-422, présentait un cycle plus long que les 3 autres

mais des études antérieures (Clavel et Annerose, 1997 ; Lauriano *et al.*, 2000) avaient montré que cette variété possédait caractères physiologiques favorables à la résistance. Cette étude a fait l'objet d'un article intitulé "Analysis of early responses to drought associated with field drought adaptation in four Sahelian groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars" par Danièle Clavel, Nani Khady Drame, Harold Roy Macauley, Serge Braconnier et Daniel Laffray, sous presse dans **Environmental and Experimental Botany**.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Environmental
and Experimental
Botany

Environmental and Experimental Botany xxx (2004) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/envexpbot

Analysis of early responses to drought associated with field drought adaptation in four Sahelian groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars

Danièle Clavel^{a,*}, Nani Khady Drame^b, Harold Roy-Macauley^c,
Serge Braconnier^d, Daniel Laffray^e

^a Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), TA70/01,
Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, Cédex 5, France

^b Faculté de Sciences et Technologie, Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire, UMR 137 Biodiversité des sols,
Université Paris 12, 64 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil, Cédex, France

^c Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (ISRA/CERAAS),
CERAAS, BP 3320, Thiès-Escale, Thiès, Senegal

^d IRAD - Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement,
CERAAS, BP 3320, Thiès-Escale, Thiès, Senegal

^e Faculté de Sciences et Technologie, Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire, UMR 137 Biodiversité des sols,
Université Paris 12, 64 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil, Cédex, France

Accepted 20 July 2004

Abstract

Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) is the most important oil and cash crop in the sub-Saharan tropics. Plant adaptation to drought, i.e. cultivars (cvs) that can maintain yield when water is limited, is a complex phenomenon which is not yet fully understood. This study aimed to identify traits expressed at the early stages of the cycle that could reveal cv differences in drought adaptation in the field. The field productivity of four Sahelian groundnut cvs was assessed during three crop seasons in Bambey (Senegal). The same cvs grown in rhizotrons were subjected to early drought stress and to a desiccation test to assess cell membrane tolerance. Between-cv differences were found with respect to pod yield, biomass production, water use efficiency (WUE), stomatal regulation and cell membrane tolerance. Two strategies to cope with water deficit were identified. The first behaviour was characterised by high rapid water loss, late stomatal closure and low cell membrane damage during drought. These traits are all found in the semi-late Virginia cv 57-422 and, to a lesser extent, in the early Spanish cv Fleur 11. For both cvs, biomass production was boosted under favourable conditions in rhizotrons but the semi-late cv had poor pod yield under end-of-season water deficit conditions. The second strategy involved opposite characters, leading to the maintenance of a higher water status, resulting in lower photosynthesis and yield. This characterised the early Spanish cv 73-30, and also, to some extent,

Abbreviations: cv, cultivar; RLA, relative leaf area (cm^{-2}); TDM, total dry mass (g); SLW, specific leaf weight (g cm^{-2}); ADM, above ground dry mass (g plant^{-1}); RDM, root dry mass (g plant^{-1}); DAS, days after sowing

* Corresponding author. Tel.: +33 04 67 61 58 00; fax: +33 04 67 61 56 93.

E-mail address: clavel@cirad.fr (D. Clavel).

the early Spanish cv 55-437. Earliness associated with high WUE, stomatal conductance and cell membrane tolerance, were the main traits of Fleur 11, a cv derived from a Virginia × Spanish cross, which was able to maintain acceptable yield under varying drought patterns in the field. These traits, as they were detectable at an early stage, could therefore be efficiently integrated in groundnut breeding programmes for drought adaptation.

© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Groundnut (*Arachis hypogaea* L.); Cultivars; Sub-Saharan Africa; Responses to early drought; Stomatal regulation; Protoplasmic tolerance; Breeding traits

1. Introduction

Groundnut, *Arachis hypogaea* L., is the most important oilseed and cash crop in the semi-arid tropics (Ntare et al., 2001). Over the last 20 years, a serious decline in rainfall levels has been observed in the Sahel and sub-Saharan regions. In Senegal, one of the most drought prone areas is the groundnut growing area, usually called the 'groundnut basin'. The main focus of the groundnut improvement programme carried out in the central and northern regions of the Senegalese 'groundnut basin' was to create early groundnut varieties that could withstand severe drought spells thanks to their physiological adaptive capacities (Annerose, 1991; Khalfoui, 1991).

Understanding the mechanisms of drought tolerance in leguminous species naturally adapted to drought, such as bean or groundnut, can help to improve their agronomic performance (Subbarao et al., 1995; Cruz de Carvalho et al., 1998; Costa França et al., 2000). Considerable research has been undertaken on the physiological and molecular mechanisms involved in drought adaptation (Bohnert et al., 1995). However, there is still no comprehensive standard system for measuring drought resistance (Blum, 1999), especially because the physiological model approach is not always adequate for selection because of negative correlations between physiological traits involved in drought adaptation (Turner et al., 2001). Breeding groundnut would seem possible by using substitute measurements of water use efficiency in the field (Wright et al., 2002) or using a crop growth model (Subbarao et al., 1995), but these field studies are costly, time-consuming and affected by environment variations. Data on early physiological or growth changes obtained under controlled conditions are more precise than field results, but a simple and direct link between a particular trait and the maintenance of yield under drought has never been

proven. Consequently, plant improvement programmes have not been able to fully exploit existing physiological data (Richards, 1996; Turner et al., 2001). Nevertheless, the use of early physiological variations between genotypes could be of substantial help for plant breeding provided that these changes also reveal behavioural differences in the field.

The aim of this study was to look for variety differences at an early growth stage in groundnut, which could reflect variations in yield performance under drought in the field. This required the following two steps: (i) to characterise early physiological differences among cvs; (ii) to check if these differences are linked to field production under drought stress. This study involved four Sahelian groundnut cultivars (cvs) whose growth parameters and physiological traits were measured in rhizotrons under controlled watering conditions, while yield components were determined under varying drought patterns during three crop seasons.

2. Materials and methods

Two types of experiments were carried out on four cvs: in the field and in rhizotrons.

2.1. Plant material

Four groundnut cultivars selected by the Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) and the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), were used in this study: two commonly cultivated Spanish type drought-tolerant cvs, 55-437 and Fleur 11, with a 90-day cycle (Clavel and N'Doye, 1997), and two formerly released cvs, 57-422, a Virginia type with a 105-day cycle and 73-30, also a Spanish type with an

90-day cycle (Lauriano et al., 1997; Lauriano et al., 1997, 2000).

2.2. Field experiments

Comparative variety trials were conducted during the 1999, 2000 and 2002 rainy seasons at the experimental station of Bambey (14.42 N and 16.28 W), located in the semi-arid zone of the 'groundnut basin' in Senegal. Two seeds pre-treated with Granox (10% Captafol-10% Benomyl-20% Carbofuran) per hole were hand-sown. The seedlings were thinned to one per hole 1 week after sowing, resulting in a density of 133 300 plants/ha. No fertilizer was applied, in compliance with farmers' usual groundnut cropping practices in the Sahel. The crop was treated with pesticides and the field was maintained weed-free throughout the study.

2.3. Water supply and statistical design of the field trials

The trials were sown in mid-July after the first substantial rainfall and conducted during the rainy season without supplementary irrigation except in 2002 when two water treatments were applied. The first treatment was strictly rainfed, with 385 mm total rainfall, and the second was supplemented by irrigation at the end of cycle, for a total water input of 560 mm. Field trials were generally arranged in a randomised complete block design with four replicates, except in 2002 when a split-plot design was used, with cvs as the main factor and water treatment as the secondary factor.

2.4. Productivity measurements in the field

The plot size for the productivity measurements was 12.3 m². The plants were harvested 90 or 105 days after sowing (DAS) depending on the earliness of the cvs. The harvested plants were exposed to ambient temperatures of 30–35 °C so as to allow complete drying of pods and haulms to less than 5% pod moisture. Pod yield was determined as the dry mass of pods, and the harvest index (HI) was calculated as the ratio of the dry weight of pods and haulms.

2.5. Rhizotron experiment

The rhizotron experiment was carried out for 6 weeks (42 days) and conducted at the end of the 1997

dry season at the experimental station of Bambey. The rhizotrons were built with 100 cm high, 15 cm diameter PVC tubes with a plexiglas window. They were filled with sifted sandy soil, called 'dior', obtained from the Bambey station, and then placed at an angle of 30° on a metal chassis, so that the root system adhered tightly to the window and was thus easily measurable. A transparent tarpaulin shelter was installed to protect the experiment from rain. Minimum and maximum recorded air temperatures were 28 and 44 °C, respectively, with a mean temperature of 34 °C. Relative humidity averaged 75%. Seeds were first powdered with 'Granox' and pre-germinated 24 h before sowing. Two seeds per rhizotron were sown and the seedlings were later thinned to one per rhizotron. One litre of NPK fertilizer (6-18-27), at a dose of 0.3 g l⁻¹, was applied for each rhizotron.

2.6. Water supply and statistical design of the rhizotron trials

The initial water supply was calculated to simulate a 25 mm rainfall, which is the average level for the first rain of the crop season in the Sahel (Annerose and Diagne, 1990). This limited quantity of initial water supply allowed us to quickly induce a water deficit while not completely waterlogging the soil column. During the first 2 weeks of growth, the plants were watered regularly (2.5 mm/day) so as to maintain optimum growth conditions. Half of the rhizotrons was subjected to water deficit 14 DAS by withholding irrigation, while the other half was watered as before. The rhizotrons were arranged in a two-factorial design, replicated four times, with the cultivar (cv) and water regime as the two studied factors. The experimental unit consisted of four plants.

2.7. Growth measurements in rhizotrons

Rooting depths were measured at 14, 24 and 35 DAS directly on the transparent side of the rhizotron, and noted as RD14, RD24 and RD35 cm, respectively. At the end of the experiment at 42 DAS, plants were unpotted, the roots washed and the root dry mass (RDM) determined. Individual aboveground dry mass (ADM) was measured after 48 h drying at 80 ± 1.5 °C. The total dry mass (TDM) was the sum of ADM and RDM. Since between-genotype variations in stem biomass are

generally limited (Turner et al., 2001), it was considered that the major genotypic differences in aerial parts with respect to the water regimes was due to leaf number and size. The relative leaf area (RLA) was therefore estimated by the following formula:

$$RLA = \frac{1}{SLW} ADM$$

where, SLW (g cm^{-2}) is the specific leaf weight of the third leaf of each plant, determined at 42 DAS, and ADM, the aboveground dry mass (g plant^{-1}).

Water use efficiency (WUE) was given in g mm^{-1} (El Hafid et al., 1978). It was determined by weighing rhizotrons at the beginning and end of the experiment and was calculated as the amount of TDM produced per unit of water lost by evapotranspiration.

2.8. Water status measurements in rhizotrons

The second pair of leaflets of the third leaf from the top of the main shoot was used to measure the leaf water potential (ψ_1) and relative water content (RWC). These measurements were obtained between 12 and 14 h, and weekly from 14 DAS. ψ_1 was determined with a Scholander pressure chamber (PWSC 3005, Soil Moisture Equipment Corp., CA, USA) and RWC was calculated from gravimetric measurements using the following formula (Catsky, 1960):

$$RWC = \frac{\text{fresh weight} - \text{dry weight}}{\text{turgid weight} - \text{dry weight}}$$

Samples of 10 leaf disks (0.5 cm diameter) were weighed immediately after they were punched out (fresh weight), rehydrated overnight at $5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ (turgid weight), and then oven dried for 24 h at $85 \pm 1.5^\circ\text{C}$ (dry weight).

2.9. Stomatal regulation

Water loss from leaves when submitted to a dehydration treatment was linked to stomatal regulation, which may be variable according to cvs. The time decrease in RWC was monitored on excised leaves using the method of Hygen (1951), modified by Clavel and Annerose (1995). Leaves came from well-watered 28-day old plants grown in rhizotrons. The third leaf from the top of the main shoot was collected and immersed in distilled water for 4 h under natural full light

at room temperature so as to maintain the complete turgor of cells and the stomatal aperture. The leaves were then quickly wiped and weighed to obtain their turgid weight. Eleven successive weighings of each leaf were made under ambient conditions during a dehydration period lasting 115 min. The first eight weighings of fresh leaves were carried out every 3 min, and the last three were conducted every 20 min. Dry weight was determined after oven-drying for 24 h at 85°C . Each timely RWC was calculated using the formula given in the previous section. This procedure was repeated four times for each cv.

2.10. Electrolyte leakage measurements

Electrolyte leakage from leaf tissues in response to desiccation stress has been measured by different authors as a means of assessing membrane stability (Blum and Ebercon, 1981; Vasquez-Tello et al., 1990; Costa França et al., 2000). Desiccation stress was simulated using a polyethylene glycol (PEG) solution applied on 0.8 cm diameter leaf discs punched out of fully expanded leaves from 21 day-old well-watered plants. The discs were rinsed twice in distilled water for 1 h to remove solutes from damaged cells. A first set of 96 discs (24 per replicate and per cv.) were then incubated in distilled water (control discs) and another set was floated in PEG 4000 solution at 400 g/l concentration, with an osmotic potential of -2 MPa (treated discs). After at least 4 h incubation, all discs were rinsed three times in distilled water and floated overnight on distilled water in the dark at room temperature and a first conductivity reading was made. Leaf tissues of control and treated samples were then killed by 1 h autoclaving and a second conductivity reading was made after equilibration at room temperature. The conductivities of discs floating in solution were determined using a conductimeter (PROLABO, CD6-NG, Paris, France). The injury index (%) was measured according to Vasquez-Tello et al. (1990) using the following formula:

$$\text{injury (\%)} = \frac{1 - (1 - T_1/T_2)}{1 - C_1/C_2} \times 100$$

where T_1 and T_2 were the first and second conductivity readings for the PEG treatment and C_1 and C_2 the first and second conductivity readings for the control treatment.

2.11. Statistical analysis

Data were processed using the SAS/STAT software package (Version 6.22) for variance analyses, which were performed according to the statistical design used: randomised complete block or split-plot for field studies, and two-factorial design for the rhizotron experiment. Means were compared using the Student-Norman and Keuls (SNK) test for single effects at the 0.05 probability level. The significance of correlations between traits were determined using regression analysis at the $P = 0.05$ threshold.

3. Results

3.1. Field productivity according to the water regime

Although the rainfalls of 1999, 2000 and 2002 (irrigated treatment) were comparable (total: 498–566 mm), their distributions were different. In 1999, there was a water deficit at the end of the cycle, with only 60 mm for the last month of cultivation compared to 190 and 175 mm for the other two situations (Table 1). In 2002 (rainfed treatment), the total rainfall

recorded was the lowest, totalling 385 mm, including only 55 mm for the last month of cultivation. Pod yield and harvest index (HI) are shown according to rainfall and watering conditions after day 60, corresponding to the pod filling and maturation phase (Table 1). In 2002, when rainfall was supplemented with irrigation (560 mm of rain, including 175 mm for the last month), no significant difference was recorded between cvs. On the contrary, when the water supply was very limited at the end of the cycle (2002-rainfed and 1999), cvs Fleur 11 and 55-437 gave the best yields and HIs, while 57-422 and 73-30 appeared to be the most sensitive to drought. Under mild terminal water stress conditions (2000), Fleur 11 showed the highest yield but the 105-day duration cv 57-422 yielded comparably. For the late cv, however, the end-of-season water deficit had a strong effect on pod yield, with HIs of 0.55 and 0.66 in 2000 and 2002-irrigated, respectively, compared to 0.14 and 0.24 in 1999 and 2002-rainfed, respectively. On average, Fleur 11 gave the highest pod-yields and HIs and 73-30 the poorest.

3.2. Leaf water status

Between 14 and 35 DAS, the three short cycle cvs showed a slow ψ_1 decrease from -0.5 to -2 MPa

Table 1
Pod yield (kg ha^{-1}) and harvest index (HI) for the four groundnut cultivars (cvs) obtained in field conditions at Bambey (Senegal) during three crop seasons while varying the water supply

	Year				Mean
	1999 (rainfed)	2000 (rainfed)	2002 (rainfed)	Irrigated	
Annual rainfall	498	566	385	385	
After 60 DAS	60	190	45	175	
Total (mm)	498	566	385	560	502 $\pm$ 84
cvs					
57-422 (105-day)					
Pod	1362 ab	3080 ab	1510 ab	3897 a	2462 $\pm$ 66
HI	0.14 b	0.55 b	0.24 c	0.66 ab	0.40 $\pm$ 0.25
55-437 (90-day)					
Pod	1776 ab	2657 b	2908 a	3201 ab	2635 $\pm$ 188
HI	0.22 a	0.52 b	0.40 b	0.41 b	0.39 $\pm$ 0.12
73-30 (90-day)					
Pod	1232 ab	2418 b	1927 ab	2958 b	2133 $\pm$ 58
HI	0.13 b	0.62 b	0.33 b	0.36 b	0.36 $\pm$ 0.20
Fleur 11 (90-day)					
Pod	2624 a	3648 a	2899 a	3873 a	3261 $\pm$ 93
HI	0.24 a	0.79 a	0.72 a	0.75 a	0.63 $\pm$ 0.26

For each parameter, means followed by the same letter are not significantly different according to SNK mean comparison test at $P < 0.05$. Mean values across years are followed by a standard error value.

(Fig. 1A). This behaviour corresponds to isohydric species, characterized by early stomatal closure, which prevents leaf dehydration. At the end of the experiment, 1 week later, Fleur 11 and 57-422 reached the same ψ_1 , of about -4 MPa, which was significantly lower than that of 55-437 and 73-30 (Fig. 1A). Conversely, the regular ψ_1 decrease observed on cv 57-422 illustrates the long opened stomata period typical of anisohydric species. The relative water content (RWC) data showed that the drought susceptible cv 73-30 always had higher water contents than the other cvs, particularly until 35 days of applied water deficit (Fig. 1B). In summary, the rapid and regular decrease in water status of 57-422 contrasts with the relative stability of the leaf water status of 73-30, at least until 35 days after stress application.

3.3. Effect of drought on plant growth parameters

Under well-irrigated control conditions, in the rhizotron experiment, cv 57-422 (105-day) and Fleur 11 (90-day) had the highest TDM. In contrast, the poorest growth performances were recorded in cvs 55-437 and 73-30 (Table 2). The ADM and RLA were directly linked since the specific leaf weights did not vary according to varieties and watering conditions (Table 2b). ADM and RDM and RLA were reduced in all cvs under drought. Fleur 11 and 57-422 showed the highest WUE under well-watered conditions and their WUEs did not increase under drought conditions. However, the WUE of Fleur 11 was the highest in all conditions (Table 2). In contrast, the WUE for 55-437 and 73-30 was low under well-watered conditions but significantly

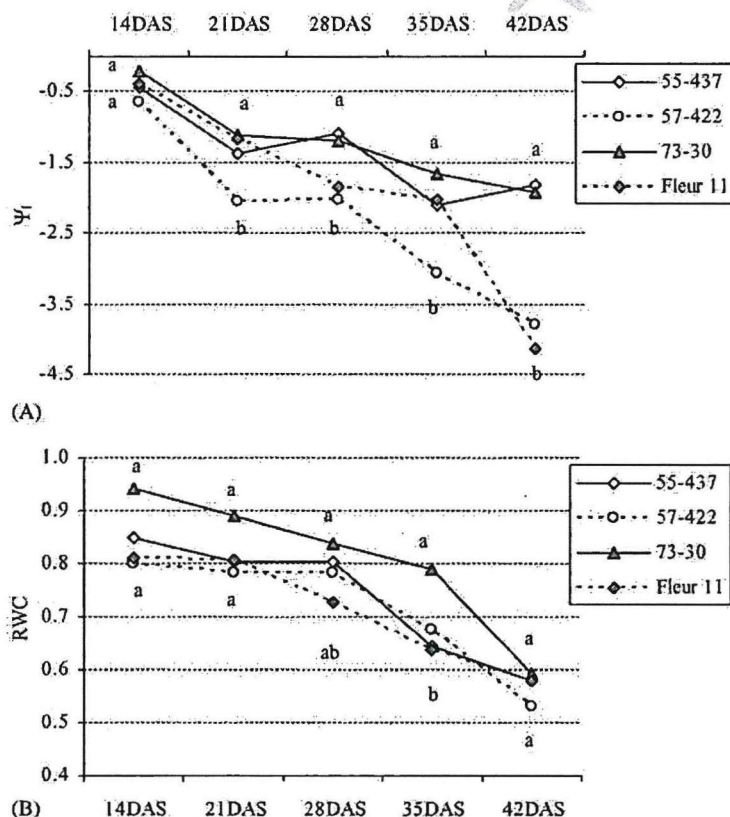


Fig. 1. Change in leaf water potential ψ_1 (A) and RWC (B) with the water stress progress expressed in days after sowing (DAS). Water stress was applied by withholding irrigation at 14 DAS. For each cultivar and each time, means followed by the same letter are not significantly different according to SNK mean comparison test at $P < 0.05$.

Table 2

Growth parameters of four groundnut cultivars grown in rhizotrons under well-irrigated (control) and water stress conditions (drought)

Cycle	cv	ADM (g plant ⁻¹)		RDM (g plant ⁻¹)		TDM (g plant ⁻¹)	
		Control	Drought	Control	Drought	Control	Drought
Aerial dry matter (ADM), root dry matter (RDM) and total dry matter (TDM)							
105-day	57-422	1.662 a	0.591 cd	1.373 ab	0.654 c	3.035 a	1.097 d
90-day	55-437	0.754 c	0.480 d	0.681 c	0.603 c	1.435 c	1.083 d
90-day	73-30	1.119 b	0.558 cd	1.014 b	0.605 c	2.133 b	1.163 d
90-day	Fleur 11	1.357 ab	0.570 cd	1.627 a	0.664 c	2.984 a	1.234 cd
		RLA (cm ²)				WUE (g mm ⁻¹)	
		Control		Drought		Control	Drought
Relative leaf area (RLA) and water use efficiency (WUE)							
105-day	57-422	342.331 a		126.655 cd		0.0115 ab	0.0105 ab
90-day	55-437	164.029 c		100.397 d		0.0054 cd	0.0103 ab
90-day	73-30	208.556 b		130.414 cd		0.0080 c	0.0111 ab
90-day	Fleur 11	305.906 a		124.660 cd		0.0113 ab	0.0118 a
		RD14 (cm)	RD24 (cm)		RD35 (cm)		
		Control	Control	Drought	Control	Drought	
Rooting depth under control conditions at 14 DAS (RD 14) and under both control and water deficit conditions (drought) at 24 (RD 24) and 35 (RD 35) DAS							
105-day	57-422	23.6 b	45.5 b	46.0 b	57.0 a	47.9 b	
90-day	55-437	19.5 c	48.5 ab	45.5 b	52.5 ab	53.2 ab	
90-day	73-30	23.1 b	48.5 ab	49.2 ab	52.2 ab	45.5 b	
90-day	Fleur 11	28.3 a	53.2 a	47.0 b	56.3 a	49.7 b	

For each parameter, means followed by the same letter are not significantly different according to SNK mean comparison test at $P < 0.05$ probability; drought was applied by water shortage 14 days after sowing.

higher under water deficit conditions, as generally observed.

Rooting depth (RD) was measured every 10 days in order to monitor progress of the root front according to watering conditions. Fleur 11 showed the deepest root system whilst 55-437 showed the most superficial root system before water deficit application, as shown by the RD14 results (Table 2). Significant genotypic differences in root length thus existed prior to the application of water stress. Differences between cvs diminished with time under both control and water deficit conditions. Between 24 and 35 DAS, only weak progression of root growth was observed and root elongation was not boosted by drought. These phenomena were attributable to the partial waterlogging of the soil in the rhizotrons. Nevertheless, cv Fleur 11 still had the deepest roots under control conditions. It should also be noted that the rooting depth of 73-30 was slightly increased under drought conditions. However, since there was no difference as re-

gards RDM, this increase probably concerned only thin roots.

3.4. Relationships between water status parameters

RWC and ψ_1 were closely related, as expected: the coefficient of correlation from the logarithmic type regression curve (Fig. 2A) was 0.73 ($P < 0.001$). No direct relationship was found between ψ_1 and any of the other growth parameters (not shown). On the contrary, RWCs at 35 and 42 DAS were closely correlated ($r = 0.64$, $P < 0.001$, and $r = 0.59$, $P < 0.001$, respectively) with TDM (Fig. 2B and C). It is, however, interesting to note that this relationship became negative at 35 DAS ($r = -0.54$, $P < 0.05$, Fig. 2D) or disappeared afterwards (results not shown) when only stressed plants were considered in the regression calculation. This means that although high leaf water status levels allow the plant to grow well, high water status under stressed conditions

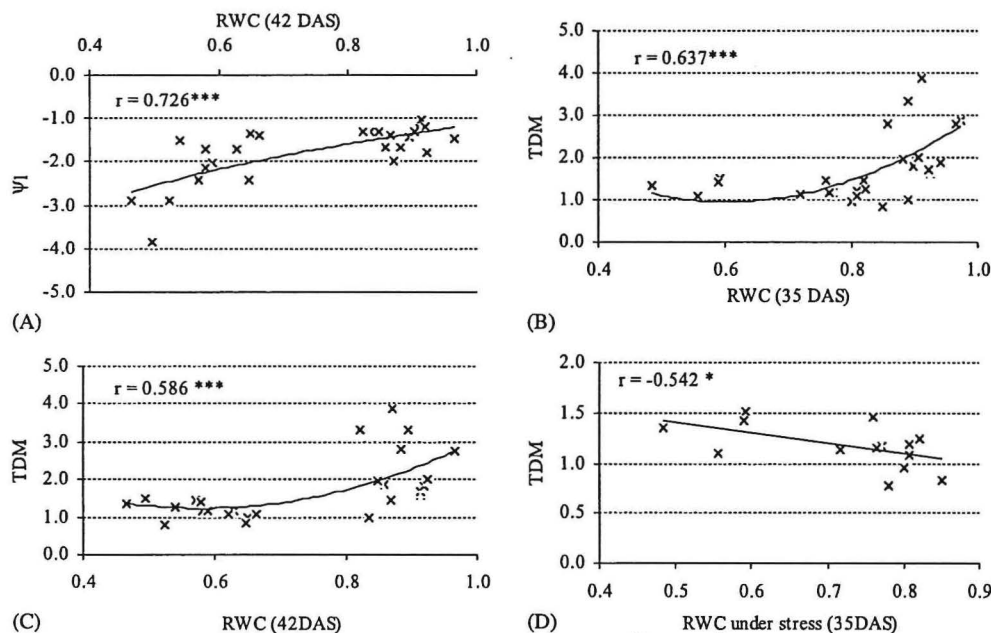


Fig. 2. Relationship between RWC at 42 DAS and ψ_1 (A), RWC at 35DAS and TDM (B), RWC at 42 DAS and TDM (C) under both conditions and regression between RWC at 35 DAS and TDM (D) under water deficit conditions, for the four cultivars. (***) correlation is significant at the $P < 0.001$ level; (*) correlation is significant at the $P < 0.05$ level.

is not necessarily advantageous for biomass production, at least at the young stage.

3.5. Stomatal regulation

RWC was determined using young leaves excised from well-hydrated plants, which were left to dry up progressively under ambient conditions. The curves shown in Fig. 3 were established by calculation of RWCs after determination of leaf weight losses during a drying period of 115 min (11 weighings). The standard curves obtained fitted power regression curves with a determination coefficient higher than 0.95. The inflexion point indicates a rupture, corresponding to the RWC (and time) at which stomatal closure occurred. After this point, only cuticular transpiration was responsible for water loss. The time of stomatal closure was very similar irrespective of the cv, but there were differences between cvs for RWC at stomatal closure. The group of 90-day cvs showed early stomatal closure, which was obtained for RWC ranging between 83 ± 1 and $76 \pm 2\%$ (Fig. 3A–C). In this group, Fleur 11 closed its stomata the lat-

est (Fig. 3C). The second type of stomatal behaviour was represented by the cv 57-422, which showed late stomatal closure when leaf RWC reached $68 \pm 5\%$ (Fig. 3D).

3.6. Cell membrane tolerance

Ion leakage, as a measurement of protoplasmic tolerance, allows evaluation of the ability of cell membranes to maintain their integrity at low water status (Costa França et al., 2000; Bajji et al., 2002). The suitable osmotic potential of the PEG solution was first established at -2 MPa to reveal maximum genotypic differences. The injury index of 73-30 was significantly ($P < 0.05$) higher than the indices obtained for Fleur 11 and 57-422, and that of 55-437 was intermediate (Fig. 4). This data confirms previous results, showing that 57-422 presented higher protoplasmic tolerance than 55-437 and 73-30 (Lauriano et al., 2000; Khalifaoui, Annerose, pers. comm.). Based on these results, the four cultivars could be ranked as follows: Fleur 11 and 57-422 were the most tolerant, 55-437 in an intermediate position and 73-30 was the most susceptible.

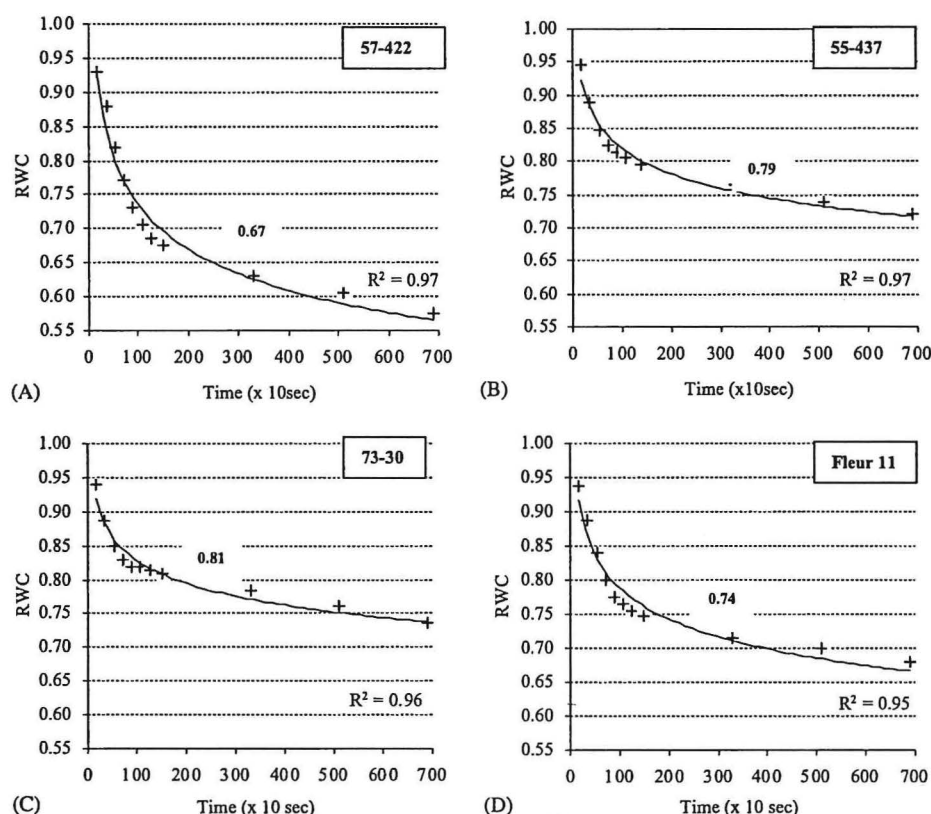


Fig. 3. Standard power regression curves of leaf relative water content (RWC) decreases during 6900 s (115 min) air-drying of excised leaves of the four well-hydrated groundnut cultivars (cvs). The inflexion point defined by the curves indicates the RWC at stomatal closure (RWC_{sc}, indicated in bold in the figures) of each cv. Measurements were realised four times for each cv: means RWC_{sc} were 0.68 ± 0.05 for 57-422, 0.81 ± 0.01 for 55-437, 0.83 ± 0.01 for 73-30 and 0.76 ± 0.02 for Fleur 11.

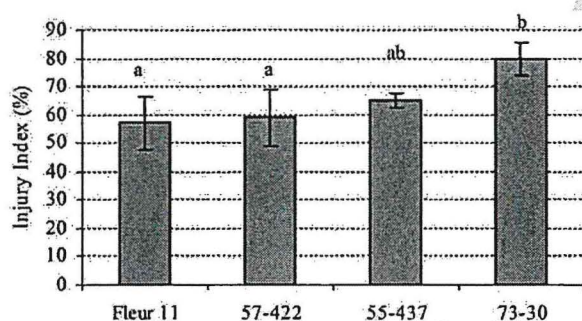


Fig. 4. Mean injury index of four groundnut cultivars subjected to PEG 4000 (osmotic potential: -2 MPa). Histograms represent means of four replicates of 24 leaf discs per cv. For each cultivar, means followed by the same letter are not significantly different according to SNK mean comparison test at $P < 0.05$ and bars represent the standard deviation.

4. Discussion

4.1. Physiological traits favourable to drought resistance in groundnut

Numerous physiological traits have been shown to potentially contribute to yield under stress, but the development of an efficient breeding method for drought resistance in groundnut is still a long-standing objective (Subbarao et al., 1995; Wright et al., 2002). Among these traits, stomatal control of water loss has been recognized as an early response for conditioning the leaf water status of plant in the field, but it severely limits carbon uptake and biomass production (Chaves, 1991; Chaves et al., 2002). Many experiments have shown that stomata close in response to hydraulic and chemical signals produced when soil

moisture decreases (Davies and Zhang, 1991; Chaves et al., 2002). No evidence of involvement of a chemical signal has been demonstrated in groundnut, but a direct link between water status and stomatal closure has been proposed (Bennett et al., 1984). The fact that the cv with the lowest RWC at stomatal closure (57-422) presented a continuous reduction in RWC as the water stress increased whereas that with the highest RWC at stomatal closure (73-30) showed a more constant RWC agrees with this hypothesis. RWC is considered to be a more useful integrator of plant water balance than the leaf water potential (Sinclair and Ludlow, 1985; Wright and Nageswara Rao, 1994). The positive relationship found between RWC and TDM when all plants were considered demonstrated that biomass production is associated to the water status (Bennett et al., 1984; Sinclair and Ludlow, 1986; Wright and Nageswara Rao, 1994). However, in a certain number of cases, comparable TDM were associated with RWC varying substantially, suggesting differences in tolerance mechanisms according to cvs. The observed negative relationship between biomass production and RWC when only stressed plants were considered for regression calculation shows the detrimental effect of early stomatal closure for producing dry matter. This is probably due to the high degree of co-regulation of stomatal conductance and photosynthesis in groundnut (Farquhar, 2001). Since stomata influence the influx of CO₂ into leaves, the reduction in stomatal conductance to conserve water inevitably indicates a lower photosynthetic rate (Ludlow and Muchow, 1990; Medrano et al., 2002). It is thus quite possible that RWCs were negatively correlated with TDM in young groundnut plants subjected to drought.

The rooting depth measurements obtained from plants cultivated in rhizotrons did not reveal any significant differences between cvs during stress because of the contradictory requirements to obtain a rapid response to stress and irrigate rhizotrons at field capacity. These conditions did not allow us to obtain specific information on genotypic differences concerning root length. For future studies on the root system it will be worth repeating this experiment with modified moisture conditions in rhizotrons.

The membrane injury index evaluated by electrolyte leakage measurements could be related to several physiological and biochemical parameters conditioning plant responses under water stress (Blum, 1988;

Dhanda and Sethi, 2002; Bajji et al., 2002). In particular, photosystem II, the main reaction centre of the photochemical efficiency of photosynthesis, which is located on cell membranes, is very sensitive to water stress (Glynn and Colin, 2002). Conversely, restricted CO₂ availability under drought stress could lead to increased susceptibility to photodamage (Baroli and Melis, 1998; Colom and Vazzana, 2003). The hypothesis that drought tolerant plants at the cellular level are often able to keep their stomata open under severe water deficits (low RWC at stomatal closure) was established in a study involving four cvs of another leguminous plant, i.e. *Phaseolus vulgaris* (Costa França et al., 2000). In durum wheat, this index is not only correlated with the growth of seedlings of various cultivars but also with their field performances (Bajji et al., 2002) and the same relationship was observed in wheat (Dhanda and Sethi, 2002). In our study, the ranking obtained for the membrane injury index classified 73-30 as the most susceptible and Fleur 11 and 57-422 as the most resistant. The ranking of the four cvs based on their RWC at stomatal closure was the same as that of membrane injury.

4.2. Groundnut drought adaptation strategies

The first strategy developed by groundnut to cope with drought stress is earliness, which is a key factor under severe end-of-season water deficit conditions. In addition, we observed that Fleur 11 was the high yielding cv and 73-30 the poor yielding one, even though the latter developed avoidance mechanisms. Therefore, groundnut is able to develop at least two strategies to deal with water deficit. The first represented by the 105-day cv 57-422, is characterised by late stomatal closure and regular RWC decrease during drought that reflect a drought tolerant behaviour. This cv had also the highest biomass in well-watered conditions. The second feature is illustrated by 73-30 and 55-437 which can be considered as nearly isohydric, maintaining high RWC by early stomatal closure. These two opposite behaviours can lead to quite similar yields under mild drought, depending on the ability of the crop to store dry matter, which can be mobilised under drought so as to feed the pods. The cv Fleur 11 presents an intermediate behaviour with a high harvest index, water use efficiency and yield, an intermediate stomatal closure and high protoplasmic tolerance. This combina-

tion of traits probably characterizes a broad adaptation under a range of water limited environments (Wright et al., 1998). It can be thought that the cv optimises its biomass production before pod growth, due to its higher WUE, so as to mobilize stored assimilates when the stomata are closed. These results agree with those of Gautreau (1977), who concluded that among varieties with appropriate cycle lengths a high relative transpiration level, generally associated with a low water potential, is often observed in the most productive groundnut varieties under drought. Blum (1988) also stated that if selection were possible using this trait for stressed environments, plants with high transpiration levels should be promoted. The suitability of stomatal regulation as a comparison parameter for photosynthetic capacity was recently demonstrated for C3 plants (Medrano et al., 2002). Associating a high capacity to keep stomata open during stress and cellular membrane tolerance to dehydration thus seems relevant for breeding for drought resistance in groundnut. This objective could be achieved by combining the dry matter production efficiency from the Virginia types, such as 57-422, to the earliness and high WUE under drought of the Spanish type. To corroborate this hypothesis, it should be noted that cv Fleur 11 comes from a single cross combining Virginia and Spanish groundnut types (Mayeux, pers. commun.)

5. Conclusion

The results of this research highlighted the need for using different traits when evaluating drought adaptation of plants. In the case of the four cvs studied, the high productivity of Fleur 11 in the field under both water stress and non-stress conditions was probably associated with its early and efficient biomass production, high WUE and protoplasmic tolerance. All of these attributes could be measured in pots under controlled water supply conditions in a time-period of less than 42 days. Cell membrane tolerance has proven to be an important trait regardless of the type of water stress (Vasquez-Tello et al., 1990; Bajji et al., 2002), and could be associated with other favourable attributes for drought adaptation in groundnut. These results were obtained within the framework of a breeding programme geared mainly towards developing groundnut genotypes with physiological attributes of

drought adaptation and they are now being used to this end. However, as the common drought pattern in the sub-Saharan region is mainly an end-of-season water deficit (Annerose, 1991; Ndunguru et al., 1995), and since the maintenance of acceptable yield under water deficit is the first requirement, the identification of traits associated with yield variation in field conditions remains essential (Clavel et al., 2004).

Acknowledgements

This work was conducted at ISRA (Senegalese Institute of Agricultural Research) with funds from the EEC/DG12/STD for drought adaptation in grain legumes. We would like to thank all the research scientists and technicians who have contributed to this program, particularly in CERAAS (Regional Centre of Studies on the Improvement of Drought Adaptation). Special thanks go to Prof. Y. Zuily-Fodil for advice and critical discussions during the preparation of this manuscript.

References

- Annerose, D.J.M., Diagne, M., 1990. Characterization of agricultural drought in semi-arid zones. I. Description of simple assessment model applied to cultivated groundnut in Senegal. *Oléagineux* 45, 547–557.
- Annerose, D.J.M., 1991. Characterisation of agricultural drought in semi-arid zones. II. Assessment of agricultural drought forms in Senegal by simulation of the crops water balance. *Oléagineux* 46, 61–67.
- Bajji, M., Kinet, J.M., Stanley, L., 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 36, 61–70.
- Baroli, I., Melis, A., 1998. Photoinhibitory damage is modulated by rate of photosynthesis and by photosystem. II. Light harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 205, 288–296.
- Bennett, J.M., Boote, K.J., Hammond, L.C., 1984. Relationship among water potential components, relative water content, and stomatal resistance of field-grown peanut leaves. *Peanut. Sci.* 11, 31–35.
- Blum, A., Ebercon, A., 1981. Cell membrane stability in wheat. *Crop Sci.* 21, 43–47.
- Blum, A., 1988. *Plant breeding for stress environments*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Blum, A., 1999. Toward standard assays of drought resistance in crop plants. In: CIMMYT (Ed.), *Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-*

- limited Environment, CIMMYT Strategic planning Workshop, June 21–25, Mexico, pp. 29–35.
- Bohnert, H., Nelson, D., Richard, G., 1995. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099–1111.
- Catsky, J., 1960. Determination of water deficit in discs cut out from leaf blades. *Biol. Plant* 2, 76–77.
- Chaves, M.M., 1991. Effect of water deficit on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.* 42, 1–16.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth*. *Ann. Bot.* 89, 907–916.
- Clavel, D., Annerose, D.J.M., 1995. Genetic improvement of groundnut adaptation to drought. CTA, Wageningen.
- Clavel, D., N'Doye, O., 1997. La carte variétale de l'arachide au Sénégal. *Agric. Dév.* 14, 41–46.
- Clavel, D., Sarr, B., Marone, E., Ortiz, R., 2004. Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions. *Agronomie* 24, 101–111.
- Colom, M.R., Vazzana, C., 2003. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought susceptible weeping lovegrass plants. *Environ. Exp. Bot.* 49, 135–144.
- Costa França, M.G., Pham Thi, A.T., Pimentel, C., Pereyra Rossiello, R.O., Zuily-Fodil, Y., Laffray, D., 2000. Differences in growth and water relation among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induces drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 43, 227–337.
- Cruz de Carvalho, M.H., Laffray, D., Louguet, P., 1998. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus* and *Vigna* cultivars when submitted to water deficit. *Environ. Exp. Bot.* 40, 197–207.
- Davies, W.J., Zhang, J., 1991. Root signal and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *An. Rev. Plant Physiol.* 42, 55–76.
- Dhanda, S., Sethi, G., 2002. Tolerance to drought stress among selected Indian wheat cultivars. *J. Agric. Res. (Cambridge)* 139, 319–326.
- El Hafid, R., Smith, D., Karrou, M., Samir, K., 1978. Physiological attributes associated with early season drought resistance in spring durum wheat cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 78, 227–237.
- Farquhar, G., 2001. Model of photosynthesis. *Physiology* 125, 42–45.
- Gautreau, J., 1977. Levels of intervariety leaf potentials and adaptation of groundnut to drought in Senegal. *Oléagineux* 32, 323–332.
- Glynn, C.P., Colin, N., 2002. Identification of drought tolerant woody perennial using chlorophyll fluorescence. *J. Arboricult.* 28, 215–223.
- Hygen, G., 1951. Studies in plant transpiration I. *Physiol. Plant.* 157–183.
- Khalfoui, J.L.B., 1991. Determination of potential lengths of the crop growing period in semi-arid regions of Senegal. *Agric. For. Meteorol.* 55, 263–351.
- Lauriano, J.A., Campos, P.S., Ramalhlo, J.C., Lidon, F.C., Guedes, M.E., Do Ceu Matos, M., 1997. Partial decline of *Arachis hypogaea* L. photosynthesis triggered by drought stress. *Photosynthetica* 33, 81–90.
- Lauriano, J.A., Lidon, F.C., Campos, P.S., Carvalho, C.A., Do Ceu Matos, M., 2000. Drought effect on cell membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 32, 7–12.
- Ludlow, M.M., Muchow, R., 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water limited environments. *Adv. Agron.* 43, 107–153.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulias, J., Flexas, J., 2002. Regulation of photosynthesis in response to progressive drought: stomatal conductance as reference parameter. *Ann. Bot.* 89, 895–905.
- Ndunguru, B.J., Ntare, B.R., Williams, T.J.H., Greenberg, D.C., 1995. Assessment of groundnut cultivars for end-of-season drought tolerance in Sahelian environment. *J. Agric. Res. (Cambridge)* 125, 79–85.
- Ntare, B.R., Williams, J.H., Dougbedji, F., 2001. Evaluation of groundnut genotypes for eat tolerance under field conditions in Sahelian environment using a simple physiological model for yield. *J. Agric. Sci.* 136, 81–88.
- Richards, R.A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul.* 20, 57–166.
- Sinclair, T.R., Ludlow, M.M., 1985. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled plant water potential. *Aust. J. Plant Physiol.* 12, 213–217.
- Sinclair, T.R., Ludlow, M.M., 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 329–341.
- Turner, N.C., Wright, G.C., Siddique, K.H.M., 2001. Adaptation of grain legume (pulses) to water-limited environments. *Adv. Agron.* 71, 193–231.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A.T., Vieira da Silva, J.B., 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J. Exp. Bot.* 41, 827–832.
- Wright, G.C., Rao, R.C.N., Basu, M.S., 1998. Selection for water-use efficiency in food legume-Extension phase report. *ACIAR Food Legume Newlett.* 27, 4–6.
- Wright, G.C., Nageswara Rao, R.C., 1994. Groundnut water relation. In: Smartt, J. (Ed.), *The Groundnut Crop*. Chapman & Hall, London, pp. 282–335.
- Wright, G.C., Rachaputi, N.R., Nigam, S.N., Basu, M.S., 2002. More efficient breeding of drought resistant groundnut in India and Australia. *IAN* 22, 20–24.

5.2. Synthèse des résultats

5.2.1. Productivité au champ

La production de gousses a été observée trois saisons de culture dont la dernière, en 2002, sous deux conditions d'alimentation hydrique. Les cultivars Fleur 11 et 55-437 ont présenté les meilleurs résultats en termes de rendement en gousses et d'indice de récolte lorsque le déficit hydrique de fin de cycle était très prononcé alors que 73-30 et 57-422, dont le cycle est trop long, sont apparus sensibles. En revanche en conditions favorables Fleur 11 et 57-422 ont réalisé des performances élevées. En moyenne, Fleur 11 est apparue la plus stable en rendement alors que la variété la moins productive a été 73-30.

5.2.2. Paramètres de croissance

La biomasse totale et les surfaces foliaires ont été réduites par la sécheresse. Les biomasses totales, les surfaces foliaires et l'efficacité de l'utilisation de l'eau (WUE, en termes de biomasse produite par unité d'eau fournie) ont été significativement plus élevées pour Fleur 11 et 57-422 en conditions favorables que pour les deux autres cultivars. Les différences intervariétales ont été très faibles en conditions de déficit hydrique. Cependant les WUE de 55-437 et 73-30, ont été augmentées par le stress alors que les WUE de Fleur 11 et 57-422 sont restées stables. Les profondeurs d'enracinement n'ont pas été différenciées par le dispositif mis en place.

5.2.3. Statut hydrique et relations avec la production de biomasse

Le contenu relatif en eau (CRE) et le potentiel hydrique de 57-422 ont décliné rapidement avec la progression du déficit hydrique alors que celui de 73-30 est resté stable jusqu'à la troisième semaine de suspension d'arrosage (35 jours après semis). Les valeurs obtenues sur ces paramètres par la variété Fleur 11 ont été proches de celles de 57-422.

Des corrélations positives significatives entre la biomasse totale et les CRE ont été observées à partir de la 3^e semaine de stress alors que les corrélations entre la biomasse totale et le potentiel hydrique n'étaient pas significatives. En revanche, lorsque le calcul de la corrélation n'a concerné que les plantes stressées uniquement, ces dernières n'ont pas été

significatives à l'exception d'une seule observée après trois semaines de stress, mais celle-ci était négative ($r = -0,54$, $P < 0,05$).

5.2.4. Régulation stomatique et résistance protoplasmique

Une technique faisant appel au suivi de la perte de poids occasionné par la dessiccation de feuilles détachées ayant été porté à un point d'hydratation maximal, a permis de déterminer le niveau de CRE de chaque cultivar au moment de la fermeture stomatique. La variété 57-422 a montré une régulation stomatique plus faible que celles des autres variétés : la fermeture des stomates de 57-422 est intervenu à un CRE de 68% alors que celle de 73-30, la variété à forte régulation stomatique, est intervenu dès un CRE de 83%.

La méthode utilisant la mesure des efflux d'électrolytes après choc osmotique a permis de différencier statistiquement les variétés en classant Fleur 11 et 57-422 à un niveau de résistance protoplasmique plus élevé que celui de 73-30. La variété 55-437 a été intermédiaire sur ce caractère.

5.3. Conclusion

A travers les réponses précoces en serre de ces quatre variétés de référence, il a été possible d'observer des stratégies d'adaptation différentes. La première est caractérisée par des pertes hydriques rapides sous stress du fait d'une fermeture stomatique tardive et une forte tolérance membranaire. La variété de type Virginia (semi-précoce) 57-422 et, dans une moindre mesure, la variété précoce Fleur 11, possèdent ces caractéristiques. La deuxième stratégie, représenté par le comportement de la variété Spanish 73-30, associe, au contraire, des pertes hydriques lentes du fait d'une fermeture stomatique précoce et une production de biomasse limitée. La relation négative entre la production de biomasse et le CRE observée en rhizotrons en conditions de stress progressif confirme les corrélations mises en évidence au champ (chapitre 3 et 4). La stratégie de 73-30, largement basée sur l'évitement, ne semble pas favoriser de meilleures performances au champ en conditions de stress et limite le potentiel de production en conditions plus favorables. Il faudra donc rechercher un profil physiologique correspondant aux variétés Virginia porté par un phénotype précoce de type Spanish.

La technique des rhizotrons n'a pas permis de différencier les profondeurs d'enracinement car la colonne de terre n'a pas été totalement humectée. Cependant la forte réserve en eau

de l'importante quantité de terre des rhizotrons a permis une lente dessiccation de la plante (sur 4 semaines) à partir de la suspension d'arrosage. Il n'est pas certain que les réponses des plantes auraient été les mêmes dans le cas de l'utilisation des pots de dimension plus réduites.

CHAPITRE 6

EXPRESSION DES GENES (TRANSCRITS) EN REPONSE A LA CONTRAINTE HYDRIQUE

6.1. Introduction

En réponse aux contraintes environnementales, les plantes mettent en place trois grands types de mécanismes : l'esquive (« drought-escape »), l'évitement (« avoidance » ou « dehydration postponement ») et la tolérance (« dehydration-tolerance ») (Levitt, 1980 ; Turner, 1991). Lorsque la contrainte se prolonge, les dispositifs périphériques de protection des cellules ne sont plus efficaces et les mécanismes cellulaires impliqués dans la tolérance sont induits, particulièrement chez les plantes résistantes. La mise en place des mécanismes de tolérance implique des modifications physiologiques et biochimiques qui induisent des modulations du catabolisme et de l'anabolisme *via* plusieurs cascades de signaux cellulaires d'où la production de nouvelles molécules qui modifient ou altèrent le fonctionnement des enzymes (Neill et Burnett, 1999 ; Jain *et al.*, 2001 ;). Cependant les bases moléculaires de la tolérance à la contrainte hydrique sont encore mal connues (Ingram et Bartels, 1996). Les produits des gènes activés par le stress interviennent non seulement dans la tolérance au stress mais aussi dans la régulation de l'expression des gènes (transcrits) et dans la transduction des signaux de la réponse (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002). On considère aujourd'hui que les gènes induits par les principaux stress abiotiques appartiennent à deux groupes principaux : ceux qui protègent contre la déshydratation des cellules dont les plus étudiées sont les LEA (« Late Embryogenesis-Abundant ») et ceux qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes (transcrits) et de la transduction des signaux (Seki *et al.*, 2003). Dans le premier groupe de gènes induits par le stress, on trouve les LEA qui appartiennent à la catégorie des « déhydrines » appelées ainsi car elles sont directement activées par le déficit hydrique. Les LEA sont synthétisées dans les graines en développement quand la disponibilité en eau diminue notamment chez les plantes très résistantes et les plantes de résurrection (Ingram et Bartels, 1996).

Comme la majorité des contraintes abiotiques (à l'exception de la submersion) aboutissent à stress osmotique, la membrane cellulaire, par sa fonction de barrière contre un grand nombre de macro molécules et de molécules à faible poids moléculaire joue un rôle essentiel dans la tolérance cellulaire (Holmberg et Bülow, 1998). Les légumineuses et particulièrement l'arachide présentent une variabilité génétique sur le caractère de la

tolérance membranaire lorsqu'il est évaluée par la méthode des efflux d'électrolytes (Lauriano *et al.*, 2000 ; Clavel *et al.*, 2004) ou par la fluorescence chlorophyllienne (Srinivasan *et al.*, 1996). Ce mécanisme est apparu très efficace chez les légumineuses puisqu'il a été mis en relation avec la performance au champ des génotypes dans différentes études (Vasquez-Tello *et al.*, 1990; Costa França *et al.*, 2000; Bajji *et al.*, 2002; Dhanda et Sethi, 2002) et sur l'arachide (Clavel *et al.*, sous presse). Les travaux réalisés en collaboration avec le laboratoire ecophysiologie moléculaire (LEPM) de l'Université de Paris 12 ont pour but de caractériser les gènes impliqués dans les processus de tolérance des plantes aux contraintes environnementales par une approche de génomique fonctionnelle. Les études sont menées au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire en comparant des plantes sensibles et résistantes dans un schéma expérimental mettant en oeuvre un gradient de stress. Cette stratégie a permis de montrer que les membranes cellulaires sont les cibles privilégiées de la contrainte hydrique (Vasquez-Tello *et al.*, 1990 ; Turner *et al.*, 2001). Plusieurs enzymes participant au catabolisme cellulaire (Roy-Macauley *et al.*, 1992) ont été caractérisées. Les gènes correspondants ont été clonés et leur expression analysée. Ces gènes codent des acylhydrolases comme la phospholipase D (El Maarouf *et al.*, 1999) et des endoprotéases comme la protéinase à acide aspartique (Cruz de Carvalho *et al.*, 2001). Ces études ont conduit à la mise au point de nouveaux outils utiles pour la sélection variétale (sondes d'ADN, anticorps, tests enzymatiques) permettant de cibler des gènes tolérants au niveau cellulaire.

L'objectif du travail était de déterminer l'expression des transcrits de trois gènes, sur l'arachide sous l'action d'une contrainte hydrique croissante. Les profils d'expression des gènes codant pour une phospholipase D, une protéase et une LEA caractérisées sur trois cultivars (cvs) d'arachide caractérisés au plan agronomique et physiologique et au niveau de la tolérance membranaire ont été étudiés. La reverse-transcriptase Chain Reaction (RT-PCR) semi-quantitative a été utilisée afin d'établir une quantification relative des taux de transcrits correspondant à ces gènes sur les trois cultivars d'arachide au cours de la phase de déshydratation et après la réhydratation. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Nani Khady Drame, chercheur en thèse au LEPM de l'Université Paris 12 et fait l'objet de la préparation d'un article.

6.2. Matériel et méthode

Des expériences d'amplification génique par RT-PCR ont été menées dans le but d'étudier les modulations de l'expression des deux nouveaux gènes et d'une déhydrine LEA en réponse à la contrainte hydrique. Trois niveaux de contrainte hydrique ont été définis et appliqués dans le cas des trois cvs du système expérimental. Les expériences visant à établir les cinétiques ont été répétées trois fois à partir du même prélèvement foliaire initial.

6.2.1. Système expérimental

Trois cultivars ont été comparés, Fleur 11, 73-30 et 57-422. Fleur 11 est une Spanish de 90 jours, productive en condition de stress hydrique et aussi en conditions favorables, 73-30 est une Spanish de 90 jours, moins productive que Fleur 11 quelles que soient l'alimentation hydrique et 57-422 est une Virginia de 105 jours possédant certaines caractères physiologique favorables à la résistance à la sécheresse mais ayant un cycle trop long pour une bonne adaptation agronomique.

Les graines désinfectées à l'hypochlorite à 9% pendant 2 minutes et lavées trois fois à l'eau distillée ont été mises en pré-germination puis semées dans des pots de 2 litres dans un phytotron. Les pots étaient remplis d'un mélange 1:1 de tourbe (TKS2® Instant, Forargard France SARL) et vermiculite. Les plantes ont été bien alimentées en eau par arrosage 3 fois par semaine avec de l'eau du robinet. Les conditions du phytotron ont été ajustées à 25°C de température, 70% d'humidité relative et une photopériode de 12h:12h. La densité de flux photonique était comprise entre 400 et 500 $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La sécheresse a été induite par suspension totale d'arrosage après 21 jours de croissance des plantes en conditions d'irrigation optimales.

Les prélèvements ont été réalisés sur des feuilles bien développées à différents stades d'hydratation contrôlés par la mesure du potentiel hydrique foliaire (ψ_{fol}). Les ψ_{fol} ont été mesurés à la presse à membrane (Marsh Instrument Compagny) : immédiatement après section de la feuille, celle-ci a été placée entre deux papiers filtres et une pression manuelle a été exercée jusqu'à apparition de la sève au niveau des pétioles, la pression correspondante est lue au manomètre et traduite MPa. Les niveaux de déficits hydrique étudiés ont été les suivants : $\psi_{\text{fol}} = -0,25 \pm 0,05$ MPa (Témoin), $\psi_{\text{fol}} = -1,5 \pm 0,05$ MPa (S1), $\psi_{\text{fol}} = -2,5 \pm 0,05$ MPa (S2), $\psi_{\text{fol}} = -3,5 \pm 0,05$ MPa (S3). Le niveau réhydraté (R) a été réalisé avec des plantes S3 ré arrosées et récoltées quand le potentiel hydrique a atteint -

0,25 ±0,05 MPa. Les échantillons foliaires ont été plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

6.2.2. Extraction et purification des ARN

250 mg de tissus foliaires frais ont été broyées au mortier dans de l'azote liquide et les ARN totaux ont été extraits (Sambrook *et al.*, 1989) au moyen du kit "Rneasy Midi kit" (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. La concentration en ARN des échantillons élués a été déterminée au spectrophotomètre à λ_{260} nm. Une migration des ARN à voltage constant de 100V sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium ($0,66 \mu\text{g ml}^{-1}$) dans du tampon TAE 0,5x (Mupid, Cosmo Bio co., LTD) a été réalisée. Les ARN ont été visualisés sous UV.

6.2.3. Amplification de l'ADN par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

Les réactions de RT-PCR ont été réalisées avec le kit "One-Step RT-PCR" (Qiagen) dans un thermocycleur (mastercycler gradient, Eppendorf). Les différentes amorces exactes ont été dessinées puis synthétisées par MWG-Biotech AG (Tableau 1). Chaque réaction de RT-PCR a été réalisée avec 25 μl de mélange réactionnel contenant 100 ng d'ARN total, 200 μM de chaque nucléotide triphosphate (dNTP), 1 unité de mélange enzymatique (HotStarTaqTM DNA Polymerase, OmniscriptTM and SensiscriptTM Reverse Transcriptases), 5 μl tampon 5x et 20 pM de chaque amorce. Le thermocycleur a été programmé pour une transcription reverse (50°C, 30 min), une activation de la HotStarTaqTM DNA polymerase et une inactivation des reverse transcriptases (95°C, 15 min), une dénaturation (95°C, 45 sec) suivies par 25 cycles d'amplification consistant chacun en une dénaturation (94°C, 30 sec), une hybridation (T_m° , 30 sec en fonction de la séquence de l'amorce) puis une extension de l'ADN (72°C, X min selon la taille de l'amplicon) puis un cycle d'extension finale (72°C, 10 min).

6.2.4. Semi-quantification des fragments d'ADN.

Après la RT-PCR, les produits ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, colorés au BET et visualisés sous UV. Les bandes amplifiées ont été par densitométrie à l'aide du logiciel « Gene Tools/Gene Snap » (Syngene) qui permet d'évaluer les intensités relatives des bandes.

6.2.5. Clonage des produits de PCR

Les fragments d'ADN amplifiés (amplicons) ont été clonés dans le plasmide « pGEM-T Easy Vector » (A/T system, Promega) et utilisés pour la transformation de cellules compétentes de *Escherichia coli* GT-869 par choc thermique à 37°C. 400 µl de milieu LB (Sambok *et al.*, 1989) ont été ajoutés aux cellules après le choc thermique et l'ensemble incubé à 37°C sous agitation. Les cellules ont été étalées sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB-Agar à 15 g l⁻¹, du substrat Xgal à 40 µg ml⁻¹, de l' IPTG 0,2 mM et de la carbenicilline à 100 µg ml⁻¹. Les boîtes ont été mises à incuber à 37° C pendant une nuit afin d'effectuer la sélection blanc/bleu. Les colonies blanches ont été resuspendues dans 2 ml de milieu LB + carbenicilline (100 µg ml⁻¹) après 12 h de subculture à 37°C sous agitation. L'extraction des plasmides a été réalisé à l'aide d'un "Wizard® Plus SV minipreps DNA Purification System kit" (Promega). La libération de l'insert a été effectuée par digestion de 8 µl d' ADN, élués par 12 unités d'enzyme de restriction EcoR1 (Promega) dans 1 ml de tampon correspondant 10x (Promega). Les plasmides recombinants ont été séquencés par EGS-Cybergène (Paris, France) suivant la méthode des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1997). Les séquences obtenues ont été analysées *in silico* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

6.3. Résultats

6.3.1. Caractéristiques agronomiques et physiologiques des cultivars

Les tableaux 1a et 1b présentent un synthèse des principales caractéristiques agronomiques et physiologiques des trois cultivars comparés d'après Lauriano *et al.*, (2000) et Clavel *et al.*, sous presse).

Tableau 1a. Caractères agronomiques

Nom	Cycle (en jours, au Sénégal)	MSR ¹	MSA ¹	Rapport G/F ² en condition de sécheresse
Fleur 11	90	+++	++	+++
73-30	90	++	++	+
57-422	105	+++	+++	++

+++ = élevé ; ++ = moyen ; + = bas

¹ MSR (masse sèche du système racinaire) ; MSA (masse sèche de la partie aérienne), mesurées en serre, après 6 semaines de croissance dont 4 en suspension d'arrosage

² G/F, rapport gousses sur fanes à la récolte, mesuré au champ

Tableau 1b. Caractères physiologiques

Nom	CRE-pfs ¹	E ²	Pn ²	A _{max} ³	Résistance protoplasmique ⁴
Fleur 11	++	+++	++	?	+++
73-30	+++	+	++	+	+
57-422	+	+++	+	+++	+++

+++ = élevé ; ++ = moyen ; + = bas

¹ CRE au point de fermeture des stomates (pfs), mesuré par pesées successives de feuilles détachées (méthode de Huygens, 1951, modifiée)

² E, et Pn : transpiration et photosynthèse nette mesurées à l'analyseur de gaz LCA3, en serre, après 6 semaines de croissance dont 4 en suspension d'arrosage

³ A_{max}, capacité photosynthétique mesurée par électrode à oxygène sur disques foliaires soumis à une forte irradiation

⁴ résistance protoplasmique (% de dommages membranaires) évaluée par la méthode des efflux d'électrolytes (Vasquez-Tello *et al.*, 1990).

Les cultivars Fleur 11 et 57-422 possèdent des caractères physiologiques favorables à la résistance à la sécheresse chez l'arachide. Leur potentialité de rendement est élevée du fait d'une forte capacité d'assimilation du CO₂ en condition de stress (fermeture tardive des stomates) et une résistance protoplasmique importante. Cependant le cycle de culture du cultivar 57-422 est trop long pour lui permettre d'exprimer son potentiel de rendement dans les conditions de déficit de fin cycle qui prévalent dans le Sahel. Le cultivar 73-30, au contraire, ferme ses stomates rapidement mais son potentiel de production est plus faible ainsi que sa tolérance membranaire (Clavel *et al.*, sous presse).

6.3.2. Séquences partielles des gènes étudiés

L'utilisation de la RT-PCR sur les différentes amorces justes étudiées a permis d'obtenir les séquences partielles des gènes codant pour la phospholipase D (PLD) et la cystéine protéase à partir de l'ARN total du cultivar Fleur 11 au stade S2 ($\psi_{fol} = -2,5 \pm 0,05$ MPa, Tableau 2).

La longueur de la séquence partielle du gène de la PLD est de 557 pb et présente 94% d'homologie avec celle de *Vigna unguiculata* (GenBank U92656), 91% d'homologie avec le précurseur de la PLD1 de *Oryza sativa* (Genbank AB001920) et avec la PLD2 de *Craterostigma plantaginearum* (GenBank AJ133000).

La longueur de la séquence partielle du gène de la cystéine protéase est de 232 pb. Sa séquence présente 83,6% d'homologie avec celle de *Vigna unguiculata* (résultats non publiés), 97% d'homologie avec celle de *Vicia sativa* (GenBank Z30338), 96% d'homologie avec celle de *Vigna mungo* (GenBank AB38598) et de *Phaseolus vulgaris*.

La longueur de la séquence partielle du gène de la LEA est de 261 pb. La séquence présente 97% d'homologie avec celle du soja (GenBank AAB68027.1), 94% d'homologie avec la LEA1 putative de l'arachide (GenBank AAO33587.1) et 95% avec celle de *Vigna radiata*.

6.3.3. Cinétiques des transcrits

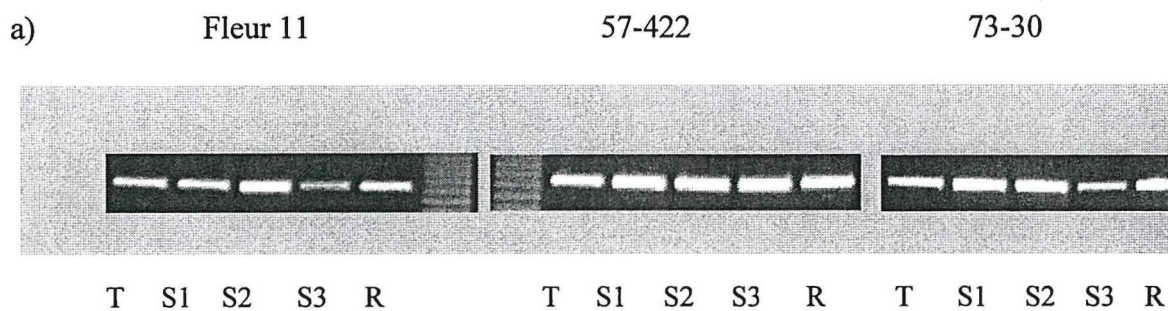
Les quantités de transcrits pour les différents stades sont présentées en pourcentage par rapport au niveau témoin. Les analyses en RT-PCR ont montré que le gène de la PLD était stimulé par la sécheresse sur les trois cultivars (Figure 1a). Les cultivars les plus tolérants, Fleur 11 et 57-422, ont présenté des amplifications maximales au stade S2 alors que le cultivar le plus sensible, 73-30, a atteint le maximum plut tôt en S1. En S3, l'expression des transcrits a été très différente selon les cvs : le niveau des transcrits a décru fortement au stade S3 pour Fleur 11 et 73-30 alors qu'il a continué à augmenter légèrement pour 57-422. Lors de la réhydratation, les taux de transcrits a été accrus de près de 20% pour les trois cvs par rapport aux plantes témoins (Figure 1b).

Le profil d'expression de la cystéine protéase est qualitativement semblable pour les trois cultivars (Figure 2). Les trois cinétiques obtenues forment une cloche plus ou moins aplatie selon le cv. Le maximum a été atteint en S2 mais le pic d'expression en S2 reste limité pour les cultivars résistants (Fleur 11 : + 52% et 57-422 : + 27%) alors que l'amplification est doublée pour le cv sensible, 73-30. La réhydratation a induit un retour à l'expression initiale des transcrits dans les conditions des plantes témoins dans le cas des trois cvs.

Aucun transcrit de LEA n'a été détecté sur les plantes témoins. L'expression de la LEA a été induite par le déficit hydrique dès la S1 pour les trois cultivars, c'est pourquoi les résultats sont donnés en unités arbitraires (U.A) et non en pourcentage des témoins comme dans les cas précédents (Figure 3). L'accumulation des transcrits a eu lieu dès le premier stade de sécheresse, en S1, et une forte stimulation est observée en S2 et S3 pour les cvs résistants, Fleur 11 et 57-422. La stimulation des transcrits de LEA a été plus faible à tous les stades chez le cv sensible sauf lors de la réhydratation où un taux de transcrits très élevé a été observé pour 73-30.

Tableau 1. Séquences des amorces de PLD et de cystéine protéase utilisées pour les réactions RT-PCR

Gènes et accessions	Nom des amorces	Séquences des amorces
PLD Genbank U92656	PLD1 : <i>forward</i> nt 10 à 29	5' CGT CCG CGA ACA CGA ACA CG 3'
	PLD2 : <i>reverse</i> nt 920 à 901	5' AAG GGT GTG AGA GAG ATC CG 3'
Cystéine protéase	Sojade1 : <i>forward</i>	5' CTN CCN RAG RAT TTY GAT TGG 3'
	Sojade 2 : <i>reverse</i>	5' CAT MAA HCC DCC HTY ACA SCC 3'



b)

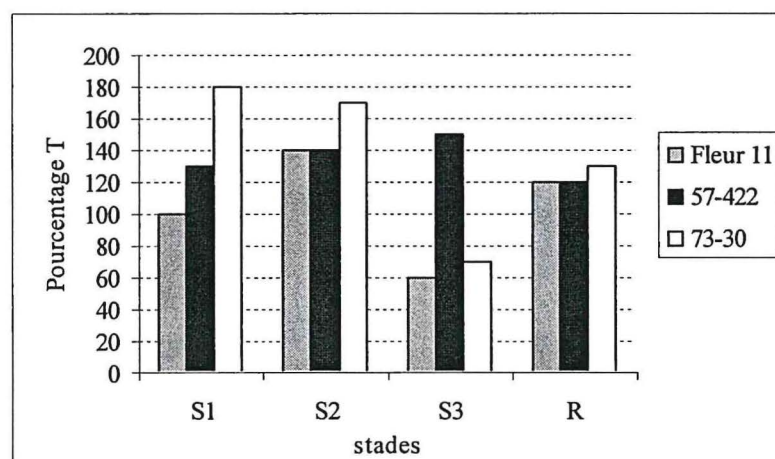


Figure 1. a) Cinétique des transcrits du gène de PLD en fonction de la contrainte hydrique ($\varphi_{fol} = -0,25 \pm 0,05$ Mpa (Témoin), $\varphi_{fol} = -1,5 \pm 0,05$ MPa (S1), $\varphi_{fol} = -2,5 \pm 0,05$ MPa (S2), $\varphi_{fol} = -3,5 \pm 0,05$ MPa (S3) et réhydraté (R) obtenus après réaction RT-PCR (8 μ l/25 μ l)

b) résultats en pourcentage de variation du transcrit par rapport au témoin (T)

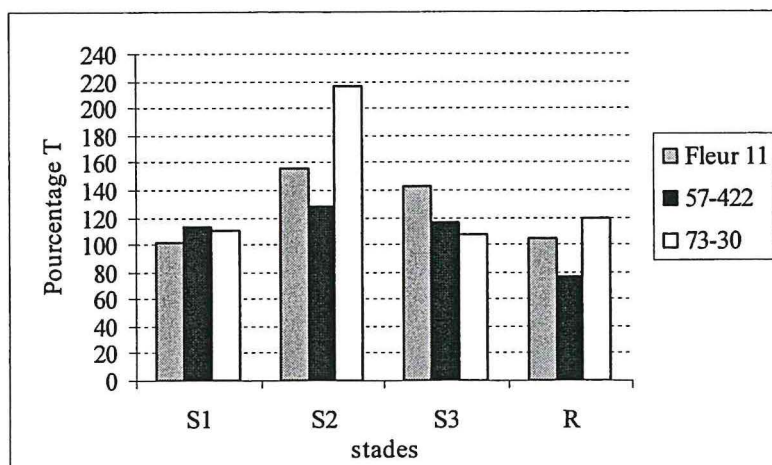


Figure 2. Cinétique des transcrits du gène de la cystéine protéase en fonction de la contrainte hydrique ($\varphi_{fol} = -0,25 \pm 0,05$ MPa (Témoin), $\varphi_{fol} = -1,5 \pm 0,05$ MPa (S1), $\varphi_{fol} = -2,5 \pm 0,05$ MPa (S2), $\varphi_{fol} = -3,5 \pm 0,05$ MPa (S3) et réhydraté (R) obtenus après réaction RT-PCR (8 μ l/25 μ l). Résultats donnés en pourcentage de variation par rapport au témoin (T)

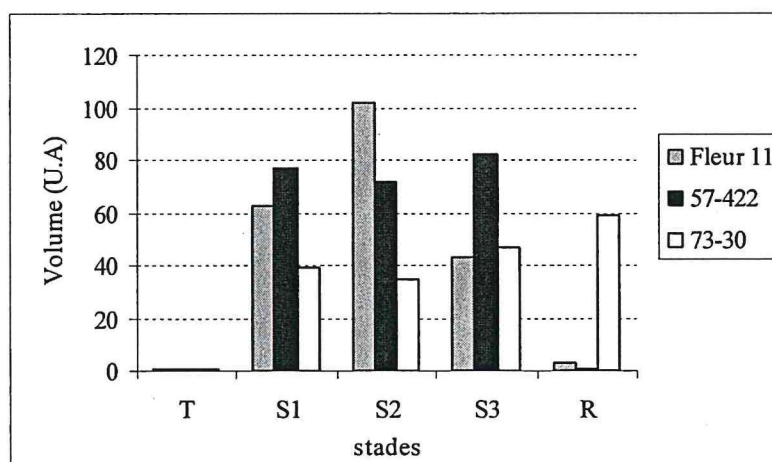


Figure 4. Cinétique des transcrits du gène de LEA en fonction de la contrainte hydrique : ($\varphi_{fol} = -0,25 \pm 0,05$ MPa (Témoin), $\varphi_{fol} = -1,5 \pm 0,05$ MPa (S1), $\varphi_{fol} = -2,5 \pm 0,05$ MPa (S2), $\varphi_{fol} = -3,5 \pm 0,05$ MPa (S3) et réhydraté (R) obtenus après réaction RT-PCR (8 μ l/25 μ l). Résultats donnés en volume de transcrits (U.A, Unités Arbitraires)

6.4. Discussion

La stimulation des transcrits en réponse à la contrainte hydrique a déjà été observée au dans le cas d'autres fabacées en particulier sur le niébé et le haricot (Maarouf *et al.*, 1999 ;Cruz de Carvalho *et al.*, 2001). Ce résultat confirme que le niébé pourrait être considéré comme la légumineuse tropicale modèle pour la biologie moléculaire à l'instar du riz pour les céréales (Ortiz *et al.*, 2002). Cette stimulation au niveau transcriptionnel traduit une activation des ribonucléases en réponse au déficit hydrique aboutissant à un déficit en ARN messagers. Ce déficit est généralement traduit par une diminution des gènes transcrits en conditions de fort déficit comme nous l'avons observé.

La destruction des membranes cellulaires est reflétée en particulier dans leur composition lipidique (Holmberg et Lüdow, 1998). La contrainte hydrique induit une diminution de la teneur en phospholipides et du degré d'insaturation des acides gras, ce qui provoque une augmentation relative des acides gras saturés de type C16:0 et C18:0 et une «rigidification» des membranes cellulaires qui deviennent fragiles. Certaines enzymes impliquées dans la dégradation des phospholipides ont été identifiées. Ainsi les PLD représentent les principales enzymes responsables de la dégradation des phospholipides membranaires (Sahsah *et al.*, 1998). Cette activation de la PLD est réalisée indépendamment de l'ABA (Frank *et al.*, 2000). Notre étude a montré que la contrainte hydrique induit la surexpression d'un gène de PLD et que les génotypes les plus tolérants, notamment Fleur 11, possédaient la capacité de réprimer momentanément l'activation du gène en conditions de stress limité en S1. L'endurcissement de la plante suite à l'induction d'un cycle de sécheresse suivi d'une réhydratation a été traduit au niveau moléculaire par une stimulation des transcrits des gènes à un niveau généralement supérieur à celui du témoin chez les trois cultivars. De telles augmentations d'expression du gène de la PLD avec le stress ont été également montré sur une plante de résurrection, *Craterostigma plantagineum* (Frank *et al.*, 2001) et sur *Arabidopsis thaliana* (Sang et al., 2001). Sur le niébé, une expression fortement stimulée de la PLD a été observée chez le cultivar le plus sensible alors que le cultivar tolérant était plus stable (El Maarouf *et al.*, 1999). Sur l'arachide, une étude récente a montré que l'expression du gène de la PLD était plus précoce chez le cultivar sensible que sur le tolérant lors de l'induction du stress (Guo *et al.*, 2003). Ces résultats confirment que la PLD constitue non seulement un marqueur de réponse au stress mais

aussi un outil moléculaire pour la détection de génotypes possédant une forte tolérance membranaire.

Chez les plantes, les cystéines protéinases ont été mises en évidence notamment dans des suspensions de tabac (Tian *et al.*, 2000) et d'orge (Khortout *et al.*, 2000). Elles sont reconnues comme des enzymes majeures du catabolisme de la majorité des protéines de stockage des graines et rentrent en jeu pour la mobilisation des acides aminés durant la les phases de germination et de sénescence (Viestra, 1993). Chez *Arabidopsis thaliana*, on a observé une accumulation de transcrits de certaines cystéines protéinases en réponse à la contrainte hydrique (Koizumi *et al.*, 1993 ; Williams *et al.*, 1994) et à l'ABA (Forsthoefel *et al.*, 1998). L'accroissement de l'expression du gène a été également observée sur le niébé (Diop *et al.*, sous presse). Nos résultats montrent que le stress induit une faible amplification de l'expression de la cystéine protéase chez les cultivars les plus tolérants. La répression momentanée du gène de la PLD en S1, observée uniquement sur Fleur 11 et 57-422, a également été notée pour la cystéine protéase mais pour les trois cvs. En revanche les transcrits de cystéine protéase ont été fortement amplifiés en S2 chez le cv sensible, 73-30. Il est par conséquent possible que les cvs les plus tolérants possèdent la capacité de différer l'activité des enzymes majeures du catabolisme.

En ce qui concerne le gène de déhydrine (LEA), l'expression du gène a été induite par le stress puisqu'elle n'était pas apparente les plantes témoins, ce qui est en accord avec les résultats obtenus chez d'autres plantes en réponse à la sécheresse (Ingram et Bartels, 1996). L'activation des LEA observée sur les trois cultivars, pourrait représenter les voies de réparation des dommages (Xiong et Zhu, 2002). Fleur 11, le cultivar le plus tolérant en termes de résistance protoplasmique et le mieux adapté à la sécheresse en termes de longueur de cycle (Clavel *et al.*, sous presse) a accumulé les niveaux de transcrits de LEA les plus élevés. Les deux cvs résistants ont paru en décalage d'expression sur la LEA : l'expression plus forte de transcrits a eu lieu en S2 chez Fleur 11 et en S3 chez 57-422 peut être à cause du retard phénologique du cv 57-422 (qui est plus tardif) au moment de la prise d'échantillons. La raison de la forte stimulation de la LEA chez le cv sensible en conditions de réhydratation est inconnue : ce cv possède peut être une forte capacité d'endurcissement. Les réponses obtenues ont donc été plus rapides et intenses chez les cvs tolérants qui semblent être plus aptes à protéger leurs macromolécules *via* la synthèse de LEA. Mais ces hypothèses doivent être confirmées par des expériences répétées.

6.5. Conclusion

Les cinétiques de transcrits des gènes des deux enzymes hydrolytiques testées ont été très clairement reliées au déficit hydrique subit par les plantes. Les résultats montrent que les deux gènes sont stimulés par la sécheresse en particulier chez le cultivar sensible, à faible résistance protoplasmique. Lorsque la sécheresse devient plus intense, l'expression des gènes est plus faible. L'activité des transcrits de PLD semble bien négativement reliée à la tolérance membranaire comme de précédents résultats l'on souligné. La répression de l'activité protéolytique de la cystéine protéase sous la contrainte pourrait permettre de différer les mécanismes de sénescence des tissus. Les trois cultivars d'arachide qui appartiennent à deux groupes botaniques différents, Spanish et Virginia, ont été capables de synthétiser des protéines de type LEA en réponse au stress ce qui confirme la forte capacité de tolérance de cette espèce. Le profil d'expression du gène de LEA diffère beaucoup en fonction des cultivars, il devrait donc être possible d'utiliser ce gène comme marqueur discriminant les variétés.

Ces résultats préliminaires, les premiers de type obtenus sur l'arachide, ont permis une mise en relation des traits relatifs à la tolérance membranaire des cultivars testés et des cinétiques de transcrits sur les gènes-cibles observés. Ils permettent donc d'envisager une utilisation des gènes étudiés comme marqueurs moléculaires de la tolérance au déficit hydrique sur l'arachide. La technique de RT-PCR semi-quantitative permet d'observer des variations de volumes relatifs de transcrits en fonction des variétés et de la sévérité du stress et pourrait devenir un outil moléculaire d'aide au criblage de géniteurs adaptés à la sécheresse pour les programmes de sélection variétale.

.

CHAPITRE 7

CONCLUSION ET PERSPECTIVES : VERS UNE STRATEGIE INTEGREE DE SELECTION

7.1. Bilan des résultats obtenus sur l'arachide

Le contexte de ce travail est une forte demande en cultivars d'arachide améliorés du fait du ralentissement pluviométrique durable observé dans les zones de production au Sénégal. La contrainte climatique étant très forte et la demande sociale urgente, des programmes de création variétale ont été mis en œuvre prioritairement. Des programmes de recherche pluridisciplinaires finalisés ont démarré sur l'arachide à l'Institut Sénégalais de Recherche Agronomique (ISRA) dès le milieu des années quatre-vingt grâce à l'appui financier de l'Union Européenne et des partenaires scientifiques (CIRAD, Université de Paris 7/Paris 12). Ainsi, pour cette thèse, nous avons bénéficié d'un environnement géographique et scientifique très stimulant.

Le principe consistant à sélectionner dès le début avec une forte pression de sélection sous forte contrainte et à vérifier par la suite que les sélections réalisées ne pénalisent pas trop les rendements en conditions de bonne alimentation hydrique, a été mis en œuvre. Cette stratégie a permis de participer au développement agricole en fournissant des cultivars plus productifs que les anciens pour les régions ciblées.

Elargir les bases génétiques des matériels sélectionnés pour prendre en compte les différentes stratégies d'adaptation de l'arachide est apparu également essentiel. Il serait probablement fructueux de poursuivre les croisements entre des arachides de type Virginia et de type Spanish pour rassembler les caractères favorables à la croissance, la production et la tolérance cellulaire souvent présents dans les Virginia (tardives) et ceux de l'évitement généralement portés par des Spanish (précoce).

L'utilisation d'un matériel végétal approprié a permis de montrer qu'il était difficile d'établir pour l'arachide, des critères physiologiques de sélection capables d'améliorer le rendement et valides quelque soit l'origine génétique du matériel végétal. En revanche, ce travail, notamment celui portant sur les lignées isogéniques, a montré qu'une sélection sur les caractères agronomiques uniquement pouvait être efficace. Cette étude a aussi permis de montrer qu'un moyen indirect non destructif et rapide d'évaluer la tolérance au champ pourrait être la mesure de la fluorimétrie in situ, plus facile à mettre en œuvre que la mesure des efflux d'électrolytes que l'on ne peut utiliser qu'en milieu contrôlé.

Nos résultats montrent, qu'une floraison précoce, une conductance stomatique forte et la tolérance des membranes cellulaires sont associées à une tolérance de l'appareil

photosynthétique et garantissent un bon rendement dans des conditions hydriques variées. Il serait utile de confirmer sur l'arachide si les caractères de résistance protoplasmique *ex situ* sont directement liés à la fluorescence chlorophyllienne mesurée *in situ*. Ce résultat conférerait au caractère du maintien de l'intégrité membranaire, un statut de critère de sélection majeur chez l'arachide. Il semble que, sur cette espèce peu étudiée sur le plan moléculaire, l'étude des réponses des transcrits des gènes participant à la tolérance cellulaire à la sécheresse à la dessiccation fournit des cinétiques interprétables en fonction de la résistance protoplasmique des cultivars.

A titre d'illustration, la variété Fleur 11, issue d'une population qui descend d'un croisement Virginia x Spanish (inconnu), introduite de Chine et sélectionnée au Sénégal, semble posséder la combinaison de caractères favorables précédemment décrite. Cependant le travail ne s'arrête pas là car, dans les conditions de fort risque de contamination en aflatoxine que connaissent les pays soudano sahéliens, la sensibilité de ce cultivar à l'aflatoxine, sans doute lié à une maturation trop lente de ses gousses, pose un vrai problème de développement.

7.2. Modèle général : les principes d'une approche intégrée

Depuis Levitt (1980) en passant par Ludlow et Muchow (1990), puis Turner (1997) et Blum (1999), jusqu'aux recherches très récentes d'une plante modèle pour la biologie moléculaire (Maggio *et al.*, 2003), les chercheurs ne sont pas parvenus à mettre au point un système standardisé pour sélectionner des variétés « résistantes » à la sécheresse. Dans ce travail, nous avons donc tenté de mettre en pratique l'intégration pluridisciplinaire que chacun s'accorde aujourd'hui à promouvoir pour améliorer les rendements des cultures en conditions de sécheresse. La mise en œuvre de tels programmes a été largement encouragée par les auteurs les plus qualifiés dans ce domaine depuis environ 10 ans (Blum, 1994 ; Passioura, 1996 ; Turner, 1997 ; Turner *et al.*, 2001). L'abondance des conférences scientifiques internationales visant cet objectif (Interdrought, Montpellier 1995 ; JIRCAS Symposium, Tsukuba, Japon, 2001 ; Journées scientifiques AUF, Marrakech, Maroc, 2002) en témoignent. Des appels d'offre récents (CGIAR/Challenge Programme « Water and Food » et « Generation », 2003, 2004, et d'autres initiatives en cours INCO-DEV-2005, INTERDROUGHT, Rome, 2005) invitant à fédérer les efforts montrent que beaucoup reste à faire pour accroître l'efficacité des recherches.

Le modèle que nous proposons est fondé sur des expérimentations pluridisciplinaires interconnectées. Le principe à la base de ce modèle est l'interdépendance des choix génotypiques et méthodologiques. En effet, si un processus biologique mis en évidence doit nécessairement contribuer à la production finale, il serait vain de vouloir établir des corrélations statistiques directes entre des grandeurs (de la molécule à la plante entière) de natures différentes (Passioura 1996 ; Blum, 1996). Le meilleur moyen d'établir cette liaison méthodologique est de choisir les génotypes et des dispositifs expérimentaux, dès l'origine, avec le souci de l'application pratique (Blum, 1996). En retour, la valeur explicative d'un processus physiologique ou moléculaire dans l'adaptation agronomique sera supérieure si ce lien est établi. Rappelons que le développement rapide de cultivars avec des longueurs de cycle adéquates et de bons rendements dans cet environnement a été placé au centre des préoccupations scientifiques qui ont conduit à cette thèse. Les approfondissements méthodologiques ont été décalés dans le temps et très ciblés sur des objectifs de création variétale. Cette recherche sur les méthodes a été réalisée de façon concomitante et parfois *a posteriori*, avec la création d'un nouveau matériel végétal. Elle a abouti au modèle schématisé dans la figure 1 qui s'articule autour des principes décrits ci-dessous.

7.2.1. Génotypes de référence

La caractérisation et le choix de génotypes de référence constituent, selon nous, une des conditions initiales indispensables à la mise en œuvre d'une stratégie de sélection basée sur la pluridisciplinarité. Nous avons fait le postulat que le développement de méthodes et de marqueurs pour l'aide à la sélection de génotypes physiologiquement adaptés serait d'autant plus efficace que les matériels végétaux étudiés seraient proches de la réalité de la sélection sur le terrain et correctement caractérisés au plan agronomique. L'utilisation des indices de réponse au stress en termes de rendement est un outil important pour caractériser un génotype mais elle doit tenir compte de l'objectif visé. L'indice de Fisher et Maurer (1978) est largement le plus utilisé, mais, nous l'avons montré, son emploi favorisera une réduction du rendement potentiel en conditions favorables. D'autres raisons liées à l'avancée des connaissances justifient l'emploi de génotypes de référence. La première est que les modèles combinant une simulation du développement et prenant en compte les interactions génotype x milieu ne sont pas disponibles. Ces modèles, s'ils étaient mis en œuvre, devraient être très spécifiques. Spécifiques de la plante, pour l'arachide un modèle

de simulation de la croissance devrait tenir compte de ses grandes adaptabilité et plasticité phénotypiques, et spécifiques de la contrainte hydrique. Dans le cas très particulier de la contrainte hydrique, les interactions génotype x milieu sont à la fois à rechercher sur le plan micro environnemental (il faut qu'un caractère soit sensible à la sécheresse pour le sélectionner) et à éviter lorsqu'on veut disposer de nouveaux cultivars à large adaptabilité. Les génotypes de référence pourront pallier à l'absence de ces modèles mais aussi alimenter en données ces modèles dans le futur. La deuxième raison qui oblige à utiliser de tels génotypes tient à la nature de la pluridisciplinarité. Elle peut être résumée par la nécessité d'accroître les références communes afin d'augmenter le taux d'utilisation des résultats acquis par les autres disciplines dans les programmes de sélection. Bientôt pour l'arachide, à l'instar d'autres espèces plus étudiées, il sera important d'augmenter ce taux d'utilisation pour valoriser au mieux les biotechnologies.

7.2.2. Variabilité génétique et critères de sélection

Une condition vitale pour la réussite d'un programme de sélection tient à l'étude et à la prise en compte de la variabilité génétique des caractères d'adaptation. Pour les plantes autogames dont, à l'instar de l'arachide, la sélection n'a pas favorisé l'enrichissement génétique, il est essentiel de construire un programme de sélection permettant de disposer d'une réserve de gènes, potentiellement sélectionnables. C'est ce qui a été fait au Sénégal grâce à l'obtention d'une population par sélection récurrente. De telles populations pourront être sélectionnées ou en enrichies. D'autres populations, comme les populations de back-cross, sont plus immédiatement utilisables. Quoiqu'il en soit, au démarrage d'un programme, un bilan précis du matériel génétique doit être réalisé de manière à fournir aux autres disciplines (physiologie ou biologie moléculaire par exemple) le matériel végétal le mieux à même de montrer une variation permettant de comprendre les stratégies d'adaptation mises en oeuvre par les végétaux.

La physiologie classique dispose, en effet, d'un grand nombre de caractères « potentiels » à proposer aux améliorateurs. Le choix de ces caractères par les sélectionneurs résulte souvent d'un compromis entre le nombre de génotypes à comparer et le temps que prend la mesure : s'il y a beaucoup de génotypes les critères de sélection ne pourront pas être nombreux si les génotypes sont en faible nombre, on pourra augmenter la quantité de critères. Ce compromis est nécessaire alors qu'aucun type de compromis n'est possible sur la variabilité génétique, condition *sine qua non* de la réussite d'un programme de sélection.

Il en est (ou en sera) de même avec les caractères moléculaires. Comme au début d'un programme de sélection la variabilité est relativement large et les génotypes à comparer très nombreux, de grandes parcelles d'évaluation agronomique en champ dans un milieu assez contraignant seront nécessaires. Du fait de contraintes en disponibilité en semences en début de sélection, cette variabilité peut être observée dans une condition unique d'alimentation hydrique si celle-ci est représentative.

Des expérimentations au champ de ce type permettront de réduire le nombre de génotypes et de choisir (ou de créer) des séries de référence. Il est très probable que des critères physiologiques de sélection corrélés avec le rendement et généralement valides sur tout type de matériel quelque soit son origine génétique, n'existent pas dans la majorité des espèces comme nous l'avons montré sur l'arachide (voir chapitre 3). On ne pourra donc prendre en compte un critère physiologique que si sa « valeur » en sélection a été vérifiée auparavant dans des séries de référence réduites (lignées de même précocité ou isogéniques par exemple), représentatives du matériel à améliorer. Il faudra également déterminer la période où ces mesures sont les plus discriminantes à l'intérieur de la gamme de précocité recherchée.

7.2.3. Liaisons entre caractères physiologiques et rendement

La production au champ est généralement le critère majeur des sélectionneurs quelque soit le type de contrainte. Pour être utiles au sélectionneur, les marqueurs physiologiques ou moléculaires de la résistance doivent être reliés au rendement, c'est-à-dire à réponse des génotypes en termes de production dans l'environnement ciblé. Le fait que les sélections pour le seul rendement en conditions de déficit hydrique aient montré leurs limites a été affirmé mainte fois, souvent pour des raisons théoriques, mais rarement démontré. En effet on conçoit bien que le rendement soit peu héritable et que certains caractères constitutifs le soient davantage. Cependant pour démontrer que les sélections directes pour le rendement en conditions de sécheresse ont peu d'efficacité il faudrait pouvoir les comparer avec celles qui ont été réalisées en utilisant d'autres critères. Or des études comparant des génotypes créés avec l'aide de mesures physiologiques et d'autres génotypes créés « classiquement » ont rarement, à notre connaissance, été publiées. Il semble, au contraire, qu'en Australie, sur arachide, ces deux types de génotypes réalisent des performances comparables (Dowkiv, communication personnelle). Nos propres résultats ont montré que les sélections directes pour le rendement, par exemple les lignées précoces isogéniques, étaient au

contraire de bonne qualité et, par ailleurs, utiles pour comprendre les mécanismes de la réponse d'une espèce.

La réduction de la variance environnementale par des dispositifs appropriés est nécessaire pour évaluer le rendement et ses composantes mais aussi les autres caractères adaptatifs. Les dispositifs au champ doivent, par ailleurs, permettre de réaliser des analyses comparatives intégrant des conditions de déficit et de non déficit afin de préciser le choix des caractères à utiliser. Si des corrélations stables sont établies entre certains caractères et le rendement quel que soit le niveau de contrainte hydrique, il est probable que l'on ait à faire à des caractères constitutifs. Ces derniers sont très utiles car ils sont plus facilement détectables du fait de leur faible variation, au moins en valeur relative, en fonction de l'environnement. Cependant il faudra définir si un caractère constitutif est toujours favorable. L'arachide a fourni l'exemple de relations fortes mais de sens variables entre rendement et paramètres de fluorescence. Ces dispositifs en double condition environnementale, plus exigeants en matériel végétal, seront mis en place après que la variabilité des caractères a été établie dans une condition unique de stress.

7.2.4. Dispositifs en milieu contrôlé

S'il est indispensable de collecter des données de champs (champs expérimentaux et champ paysans), il est également essentiel de disposer de données acquises en conditions d'alimentation en eau contrôlée au champ et en serre. Plus on se rapproche du milieu réel de production plus le contrôle de l'environnement est difficile mais, si on s'en éloigne trop les liaisons avec la production au champ deviennent hasardeuses. Or, nous avons vu que les différences variétales existant au plan des caractères physiologiques doivent être reliées aux rendements pour être utilisables en sélection au champ. La mise au point des dispositifs en milieu contrôlé en serre voire en phytotrons doit donc être développée parallèlement aux tests du matériel génétique au champ. Ces dispositifs devront tenir compte de la variabilité génétique dès leur conception. Le choix du système expérimental pourra être basé sur la réponse de géotypes dont l'origine génétique est différente mais le niveau d'adaptation agronomique globalement comparable ou au moins objectivement mesurable. Les conditions d'application de la contrainte hydrique conditionnent très souvent les réponses physiologiques. On devra donc les faire varier afin de définir des critères de sélection correspondant à des variations physiologiques robustes, c'est à dire

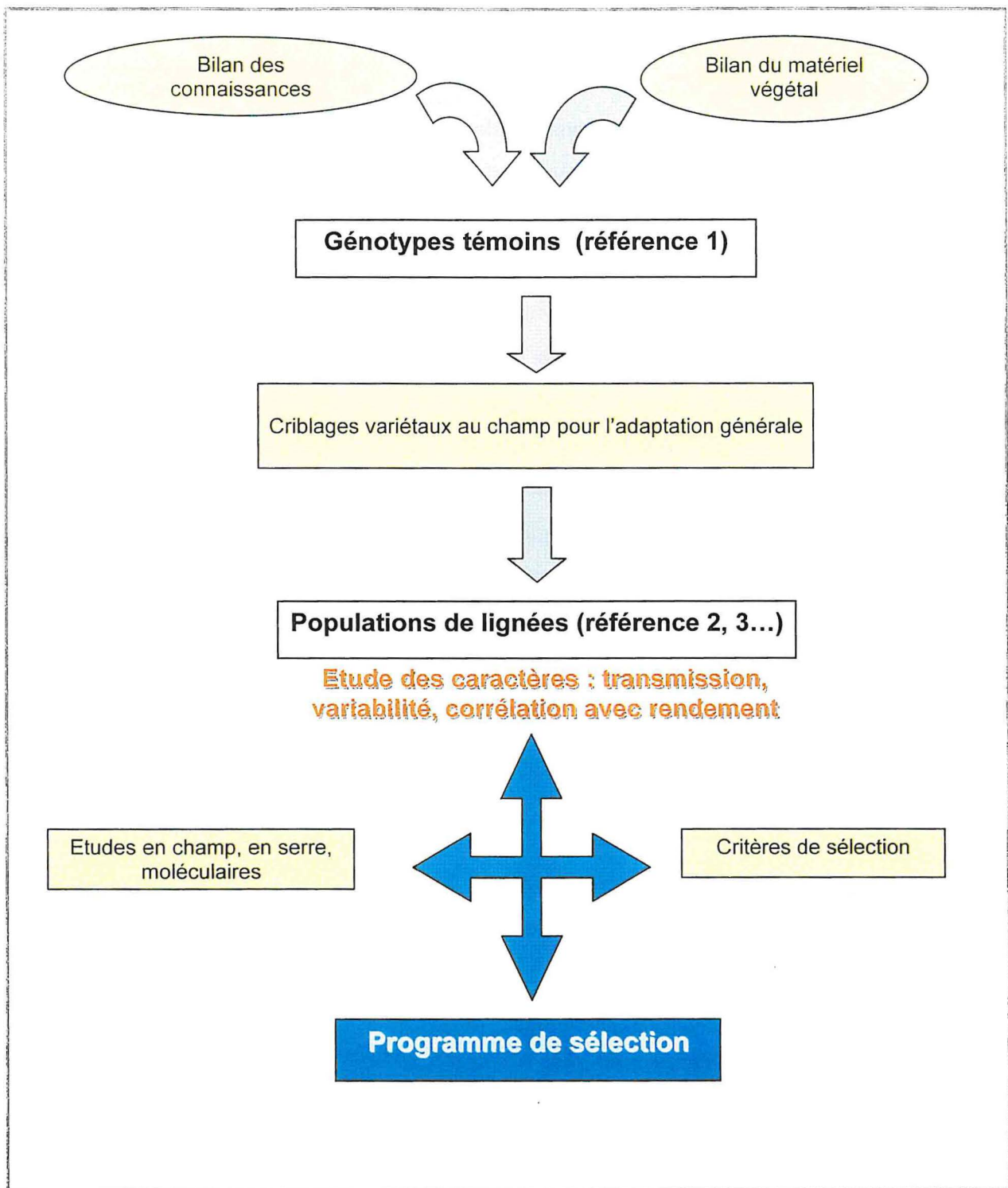


Figure 1. Modèle intégré pour la sélection de variétés « résistantes » à la sécheresse

reproductibles et détectables à la fois en milieu contrôlé et au champ. Le système expérimental capable de les mettre en évidence devra être le plus simple possible afin de pouvoir « cribler » un grand nombre de génotypes.

7.2.5. Marqueurs moléculaires

L'intégration des connaissances « du gène à la plante » présente des difficultés accrues par l'hyperspécialisation et le fait que les analyses moléculaires sont en général réalisées *ex situ*. L'identification de marqueurs biochimiques et moléculaires de la résistance à la sécheresse devrait permettre de disposer de critères utiles pour la sélection variétale *via* l'identification de géniteurs potentiellement performants. Ceci est possible à condition de disposer d'un critère de sélection physiologique incontestable permettant de cibler les gènes de réponse majeurs. Il est important que le système expérimental utilisé en génomique fonctionnelle soit étroitement connecté aux études physiologiques et agronomiques afin d'interpréter les réponses des gènes transcrits et de valider ces gènes en tant que marqueur de résistance ou de sensibilité. Cette recommandation semble évidente mais sa mise en oeuvre pose de nombreux problèmes de représentativité pour le transfert des connaissances. Un travail à l'échelle moléculaire nécessite des systèmes expérimentaux très standardisés et répétables alors qu'une plante en champ dispose de toute une série de conditions lui permettant d'exprimer phénotypiquement sa plasticité laquelle est un atout pour l'adaptation à la sécheresse. Nous préconisons donc une approche progressive et ciblée sur un caractère identifié comme important. Les changements moléculaires pourront alors être discutés sur la base d'un comportement de la plante en milieu contrôlé lequel est lui-même interprété en fonction de données de champs.

Pour conclure, le modèle proposé dans le cadre de ce travail (Figure 1) doit être considéré comme évolutif, à l'instar de toute proposition scientifique, mais aussi par définition. Dans le domaine de la sécheresse, seule une approche de ce type est capable s'enrichir de résultats expérimentaux tirés de disciplines connexes. Notre expérience a montré, en effet, que dans le champ d'étude de l'adaptation à la sécheresse, la nature du végétal (ses gènes), son histoire (cycles de sécheresse et de réhydratation) et son environnement agronomique conditionnent son phénotype. On doit par conséquent, interpréter les réponses du matériel végétal au champ en serre ou sur le plan moléculaire en tentant de prendre en compte l'effet de ces trois facteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Annerose, D.J.M., 1988. Critères physiologiques pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide. *Oléagineux*, 43, 217-221.
- Annerose, D.J.M., 1990. Recherches sur les mécanismes d'adaptation à la sécheresse. Application au cas de l'arachide cultivée au Sénégal. Thèse de doctorat en Sciences, Université de Paris 7, 282 pp.
- Annerose, D.J.M., 1991. Characterisation of agricultural drought in semi-arid zones. II. Assessment of agricultural drought forms in Senegal by simulation of the crops water balance. *Oleagineux*, 46, 61-67.
- Annerose, D.J.M., et Diagne, M., 1990. Characterization of agricultural drought in semi-arid zones. I Description of simple assessment model applied to cultivated groundnut in Senegal. *Oléagineux*, 45, 547-557.
- Bajji, M., Kinet, J.M., et Stanley, L., 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance in durum wheat. *Plant Growth Regul.*, 36, 61-70.
- Baker, F.W.G., 1989. Conclusions. *In: Drought Resistance in Cereals*, Baker, F.W.G. (Ed.), ICSU Press, Paris, pp.213-220.
- Baradat, P., 1976. Use of juvenile-mature relationships in individual selection including information from relatives. *In: Proceeding of IUFRO Meeting on Advanced Generation Breeding*, IUFRO (Ed.), Bordeaux, pp.121-138.
- Baradat, P., et Labbé, T., 1995. OPEP. Un logiciel intégré pour l'amélioration des plantes pérennes. *In: Traitement statistique des essais de sélection*, CIRAD (Ed.), Montpellier, pp. 303-330.
- Baradat, P., Labbé, T., et Bouvet, J., 1995. Conception d'index pour la sélection réciproque récurrente. Aspects génétiques, statistiques et informatiques. *In: Traitement statistique des essais de sélection. Stratégies d'amélioration des plantes pérennes*, CIRAD (Ed.), Montpellier, pp.101-150.
- Baroli, I., et Melis, A., 1998. Photoinhibitory damage is modulated by rate of photosynthesis and by photosystem II light harvesting chlorophyll antenna size. *Planta*, 288-296.
- Barrett, A., 1986. The classes of proteolytic enzymes. *In: Plant Proteolytic Enzymes*, Dalling, M. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp.12-14.
- Belhassen, E., This, D., et Monneveux, P., 1995. L'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. *Cahiers Agricultures*, 4, 251-261.
- Bennett, J.M., Boote, K.J., et Hammond, L.C., 1984. Relationship among water potential components, relative water content, and stomatal resistance of field-grown peanut leaves. *Peanut Sci.*, 11, 31-35.
- Bertioli, D.J., Leal-Bertioli, S.C.M., Lion, M.B., Santos, V.L., Pappas Jr, G., Cannon, S.B., et Guimares, P., 2003. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol. Gen. Genomics*, 270, 34-45.
- Bhagwat, A.S., Krishna, T.G., Jawali, N., et Mitra, R.K., 2001. Cloning and characterization of ribosomal RNA gene repeat unit from groundnut. *Plant cell Reports*, 20, 193-197.
- Bianchi-Hall, C.M., Keys, R.D., et Stalker, H.T., 1994. A note of use of seed protein markers for identification of aflatoxin resistance in peanut. *Peanut Sci.*, 21, 159-161.
- Bidinger, F.R., et Witcombe, J., 1989. Evaluation of specific drought avoidance trait as selection criteria for improvement of drought resistance. *In: Drought Resistance in Cereals*, Baker, F.W.G. (Ed.), ICSU Press, Paris, pp. 213-220.
- Blankenship, P.D., Cole, R.H., Sanders, T.H., et Hill, R.A., 1989. Effect of geocarposphere temperature on preharvest colonization of drought stressed peanuts by *Aspergillus flavus* and subsequent aflatoxin contamination. *Mycopathologia*, 85, 89-74.
- Blum, A. 1988. Plant breeding for stress environments. CRC Press (Ed.) Boca Raton.
- Blum, A., 1994. Stress tolerance in plants: What are we looking for? *In: Biochemical and Cellular Mechanisms of stress Tolerance in Plants*, Cherry, J.H. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 315-324.
- Blum, A., 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant growth Regul.*, 20, 135-148.
- Blum, A., 1999. Toward standard assays of drought resistance in crop plants. *In: Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-Limited Environment.*, CIMMYT (Ed.), CIMMYT Strategic Planning Workshop, Mexico, pp. 29-35.
- Blum, A., et Ebercom, A., 1981. Cell membrane stability as a mesure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.*, 21, 43-47.

- Bohnert, H., Nelson, D., et Richard, G., 1995. Adaptation to environmental stresses. *The Plant Cell*, 7, 1099-1111.
- Boote, K.J., 1982. Growth stages of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Sci.*, 9, 35-40.
- Boyer, J.S., 1996. Advances in drought tolerance in plants. *Adv. Agron.*, 57, 187-211.
- Brar, G., Cohen, B.A., Vick, C.L., et Johnson, G.W., 1994. Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivar utilizing ACCELL technology. *Plant J.*, 5, 745-753.
- Bray, E., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.*, 2, 48-54.
- Brown, R.L., Chen, Z.Y., Cleveland, T.E., et Russin, J.S., 1999. Advances in the development of host plant resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 89, 113-117.
- Brown, W., et Ryan, C., 1984. Isolation and characterization of a wound-induced trypsin inhibitor for alfalfa leaves. *Biochemistry*, 23, 3418-3422.
- Bunting, A.H., 1955. A classification of cultivated groundnuts. *Empire Journal of Experimental Agriculture*, 23, 158-170.
- Burow, G.B., Gardner, H.W., et Keller, N.P., 2000. A peanut lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonisation. *Plant Mol. Biol.*, 42, 689-701.
- Calvo, A.M., Hinze, L.L., Gardner, H.W., et Keller, N.P., 1999. Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acid on development of *Aspergillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3668-3673.
- Caron, H., et Granés, D., 1993. L'arachide. Agriculture spéciale. In: L'arachide. Agriculture spéciale, CERDI (Ed.), Paris, pp. 87-108.
- Catsky, J., 1960. Determination of water deficit in discs cut out from leaf blades. *Biologica plantarum*, 2, 76-77.
- Ceccarelli, S., et Grando, S., 1996. Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regul.*, 2, 149-155.
- Chapman, S.C., Ludlow, M.M., Blamey, F.P.C., et Fisher, K.S., 1993. Effect of drought during early reproductive development of growth of cultivars of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). II Biomass production, pod development and yield. *Field Crops Res.*, 32, 211-225.
- Chaves, M.M., 1991. Effect of water deficit on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, 42, 1-16.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T., et Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth. An. Bot.*, 89, 907-916.
- Cheng, R.L., Jarret, R.L., Li, C.X., et Demski, J.W., 1997. Expression and inheritance of foreign genes in transgenic peanut plants generated by using *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant cell Reports*, 541-544.
- Choi, K., Burow, M.D., Church, G., Paterson, A.D., Simpson, C.E., et Starr, J.L., 1999. Genetics and mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut germplasm. *J. Nematology*, 31, 283-290.
- Church, G., Simpson, C.E., Burow, M.D., Paterson, A.D., et Starr, J.L., 2000. Use of RFLP markers for identification of individuals for resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. *Nematology*, 5, 575-580.
- Clavel, D., 1998. Study of the relationships between certain indicators of preharvest aflatoxin resistance in groundnut varieties with different levels of drought resistance. *International Arachis Newsletter*, 18, 37-38.
- Clavel, D., 2002a. Molecular strategy for groundnut preharvest Aflatoxin elimination: recent advances and future prospects. In: Seventh ICRISAT Regional Groundnut Meeting for Western and Central Africa, ICRISAT (Ed.), Cotonou, 6-8 December 2000, pp. 57-59.
- Clavel, D., 2002b. Biotechnologies et arachide. *OCL*, 9, 206-211.
- Clavel, D., et Annerose, D.J.M., 1995. Genetic improvement of groundnut adaptation to drought. In: Research Projects, Summaries of the Final Reports STD2, UE-DG12, Risopoulos, S. (Ed.), CTA, Wageningen, pp.33-35.
- Clavel, D., et Annerose, D.J., 1997. Breeding groundnut for drought adaptation in Senegal. *International Arachis Newsletter*, 17, 33-35.
- Clavel, D., et N'Doye, O., 1997. La carte variétale de l'arachide au Sénégal. *Agriculture et Développement*, 14, 41-46.

- Clavel, D., et Gautreau, J., 2001. Groundnut. In: Tropical Plant Breeding, Cirad et Science Publishers Inc (Ed.), Plymouth, pp.246-266.
- Clavel, D., Sarr, B., Marone, E., et Ortiz, R., 2004. Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions. *Agronomie*, 24, 1-8.
- Clavel, D., Drame, N.K., Macauley, H.R., Braconnier, S., et Laffray, D., sous presse. Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. *Environ. Exp. Bot.*
- Cleveland, T.E., Cary, J.W., Brown, R., et al., 1997. Use of biotechnology to eliminate aflatoxin in preharvest crops. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinski University*, 5, 75-90.
- Colom, M., et Vazzana, C., 2003. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass. *Environ. Exp. Bot.*, 49, 135-144.
- Costa França, M.G., Pham Thi, A.T., Pimentel, C., Pereyra Rossiello, R.O., Zuily-Fodil, Y., et Laffray, D., 2000. Differences in growth and water relation among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induces drought stress. *Environ. Exp. Bot.*, 43, 227-337.
- Craufurd, P.Q., Wheeler, T.R., Ellis, R.H., et Summerfield, R.J., 2000. Escape and tolerance to high temperature at flowering in groundnut. *J Agric. Res. (Camb.)*, 135, 371-378.
- Cruz de Carvalho, M.H., D'arcy-Lameta, A., Roy-Macauley, H., Gareil, M., El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., et Pham Thi, A.T., 2001. Aspartic proteinase in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS letter*, 492, 342-246.
- Cuero, R., G, et Godson, O.O., 1995. *Aspergillus flavus* induced chitosanase in germinating corn and peanut seeds: *A. flavus* for growth dominance over associated fungi and concomitant aflatoxin production. *Food Additives and Contaminants*, 12, 479-483.
- Dagnélie, D., 1989. The method of Papadakis in agricultural experimentation. An overview. *Revue Générale d'Agronomie*, 7, 298-362.
- Daie, J., 1988. Mechanisms of drought induced alterations in assimilate partitioning and transport in crops. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 7, 117-137.
- Davies, W.J., et Zhang, J., 1991. Root signal and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Rev. of Plant Physiol.*, 42, 55-76.
- Davies, W.J., Tardieu, F., et Trejo, C., 1994. How do chemical signals work in plant that grow in drying soil? *Plant Physiol.*, 104, 309-314.
- De Padua, V.L.M., Pestana, M.C., Margis-Pinheiro, M., et De Oliveira, D.E., 2000. Electroporation of intact embryonic leaflet of peanut: gene transfer and stimulation of regeneration capacity. *In Vitro Cell Dev Bio. Plant*, 36, 374-378.
- Dhanda, S., et Sethi, G., 2002. Tolerance to drought stress among selected Indian wheat cultivars. *J. Agric. Res. (Camb.)*, 139, 319-326.
- Dhéry, M., Ogier, J., et Ducarne, E.G., 1987. L'arachide, une spéculation intéressante pour les périmètres irrigués de la zone soudano-sahélienne. *Oléagineux*, 42, 119-122.
- Diop, N.N., Kidric, M., Repellin, A., Gareil, M., D'arcy Lameta, A., Pham Thi, A.T., et Zuily-Fodil, Y., sous presse. A multicystatin easy induced by drought stress in Cowpea (*Vigna unguiculana* L. Walp) leaves. *FEBS letter*.
- Dos Santos, V., Gimenes, M., Valls, J., et Lopez, C., 2003. Genetic variation within and among species of five sections of the genus *Arachis* L. (Leguminosae) using RAPDs. *Gen. Res. Crop Evol.*, 50, 841-848.
- Duncan, W.G., McCloud, D.E., McGraw, R.L., et Boote, K.J., 1978. Physiological aspects of peanut yield improvement. *Crop Sci.*, 18, 1015-1020.
- Dwivedi, S.L., Gurtu, S., Chandra, S., Upadhyaya, H.D., et Nigam, S.N., 2003. AFLP diversity among selected rosette resistant groundnut germplasm. *International Arachis Newsletter*, 00.
- El Hafid, R., Smith, D., Karrou, M., et Samir, K., 1998. Physiological attributes associated with early-season drought resistance in spring durum wheat cultivars. *Can. J. Plant Sci.*, 78, 227-237.

- El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., D'arcy-Lameta, A., et Pham Thi, A.T., 1999. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp differing in their drought tolerance. *Plant Mol. Biol.*, 39, 1257-1265.
- El Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., D'arcy-Lameta, A., et Pham Thi, A.T., 2001. Cloning and expression under drought of cDNAs coding for two PI-PLCS in cowpeas leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, 39, 167-172.
- Estelle, M., 2001. Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opin. Plant Biol.*, 4, 254-260.
- Fajardo, J., E., Waniska, R., D., Cuero, R., G., et Petit, R., E., 1994. Effect of chitosan and *Aspergillus flavus* on isozymes related to phenolic synthesis and protein profiles in peanut seeds. *Food Biotechnology*, 8, 213-228.
- Farquhar, G., 2001. Model of photosynthesis. *Physiology*, 125, 42-45.
- Farquhar, G., et Richard, R., 1984. Isotopic composition in plant carbon correlates with water-use efficiency in wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.*, 11, 539-552.
- Ferguson, M.E., Burow, M.D., Schulze, S.R., Bramel, P.J., Paterson, A.H., Kresovich, S., et Mitchell, S., 2004. Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 1064-1070.
- Fernandez, G.C.J., 1992. Selection criteria for assessing stress tolerance. *In: Adaptation of Food Crops Temperature and Water Stress, Proceedings of an International Symposium, Taiwan*, pp. 257-269.
- Ferrari-Iliou, R., El Maarouf, H., Pham Thi, A.T., D'arcy Lameta, A., Gareil, M., et Zuily-Fodil, Y., 1996. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a Cowpea ascorbate peroxidase and gene expression under drought. *C. R. Soc. Biol.*, 190, 666.
- Fisher, R., 1981. Optimizing the use of the water and nitrogen through breeding of crops. *Plant Soil*, 58, 249-278.
- Fisher, R.A., et Maurer, R., 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I grain yield response. *Aust. J. Agric. Res.*, 29, 897-912.
- Flaherty, J.E., Weaver, M.A., Payne, G.A., et Woloshuk, C.P., 1995. A Glucuronidase reporter gene construct for monitoring aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 482-486.
- Flower, D., et Ludlow, M.M., 1987. Variations among accessions of pigeonpea (*Cajanus cajan*) in osmotic adjustment and dehydration tolerance of leaves. *Field Crops Res.*, 17, 229-243.
- Foolad, M.R., Subbiah, P., Kramer, C., Hargrave, G., et Lin, G.Y., 2003. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Euphytica*, 130, 199-206.
- Forthoefel, N., Cushman, M., Ostrem, J., et Cushman, J., 1998. Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators. *Plant Sci.*, 136, 195-206.
- Foulkes, M.J., Sylvester-Bradley, R., Worland, A.J., et Snape, J.W., 2004. Effects of a photoperiod-response gene Ppd-D1 on yield potential and drought resistance in UK winter wheat. *Euphytica*, 135, 63-73.
- Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salimini, F., et Bartels, D., 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell*, 12, 111-123.
- Frova, C., Krajewski, P., di Fonzo, N., Villa, M., et Sari-Gorla, M., 1999. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I Yield component. *Theor. Appl. Genet.*, 99, 280-288.
- Fukai, S., et Cooper, M., 1995. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Res.*, 40, 67-86.
- Fukai, S., Pantuwan, G., Jongdee, B., et Cooper, M., 1999. Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Res.*, 64, 61-74.
- Fussell, L.K., Bidinger, F.R., et Bieler, P., 1991. Crop physiology and breeding for drought tolerance: research and development. *Field Crops Res.*, 27, 183-199.
- Gaddour, K., Vicente-Carbojosa, J., Lara, P., Isabel-Lamonedá, I., Diaz, I., et Carbonero, P., 2001. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*lcy*) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Mol. Biol.*, 45, 599-608.
- Gaff, D., 1980. Protoplasmic tolerance in extreme water stress. *In: Adaptation of Plants to Water and High Temperature*, Turner, N.C., et Kramer, P.J. (Eds.), New York, pp. 207-230

- Gallais, A., 1995. La sélection assistée par marqueurs. *In*: Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?, Aupelf-Uref (Ed.), John Libbey Eurotext, Paris, pp. 387-397.
- Gallardo, M., Turner, N.C., et Ludvig, C., 1994. Water relations, gas exchange and abscissic acid content in *Lupinus cosentinii* leaves in response to drying different proportions of the root system. *J. Exp. Bot.*, 45, 909-818.
- Gan, S., et Amasino, R., 1997. Making sense in senescence. molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.*, 113, 313-319.
- Garretsen, F., et Keuls, M., 1977. A general method for the analysis of genetic variation in complete and incomplete dialleles and North Carolina 2 designs. Part I. Procedures and general formulas for the random model. *Euphytica*, 26, 537-551.
- Gautreau, J., 1977. Levels of intervariety leaf potentials and adaptation of groundnut to drought in Senegal. *Oléagineux*, 32, 323-332.
- Gillier, P., et Silvestre, P. 1969. L'arachide. Maisonneuve et Larose (Ed.). Paris.
- Glynn, C.P., et Colin, N., 2002. Identification of drought tolerant woody perennial using chlorophyll fluorescence. *J. Arboriculture*, 28, 215-223.
- Greenberg, D.C., Williams, J.H., et Ndunguru, B.J., 1992. Differences in yield determining processes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in varied drought environments. *Ann. Appl. Biol.*, 120, 557-566.
- Gregory, W.C., et Gregory, M.P., 1976. Groundnuts. *In*: Evolution of Crop Plants, Simmonds, N.W. (Ed.), Longman, Londres, pp. 151-154.
- Gregory, W.C., Krapovickas, A., et Gregory, M.P., 1980. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. *In*: Advances in Legume Sciences, Summerfield, R.J. et Bunting, A.H. (Ed.), Royal Botanical Gardens, Kew, pp. 469-481.
- Grieshammer, U., et Wynne, J.C., 1990. Isozyme variability in mature seed of U.S. peanut cultivars and collections. *Peanut Sci.*, 72-75.
- Griffing, B., 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallele crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9, 463-493.
- Grudkowska, M., Wisniewski, K., et Zagdanska, B., 2002. Cysteine endoproteinases activity as an indicator of wheat resistance to frost and drought. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin*, 4555.
- Guo, B., Yu, J., Holbrook, C., Lee, R., et Lynch, R., 2004. Application of differential display RT-PCR and EST/microarray technologies to the analysis of gene expression in response to drought stress and elimination of aflatoxin contamination in corn and peanut. *J. Toxicology Toxin Reviews*, 22, 287-312.
- Gupta, N.K., Sunita Gupta, et Arvind Kumar, 2001. Effect of water stress on physiological attributes and their relationship with growth and yield of wheat cultivars at different stages. *J. Agron. Crop Sci.*, 186, 55-62.
- Hall, A., J., Richard, G., Condon, A., Wright, G.C., et Faquhar, G., 1993. Carbon isotope discrimination and plant breeding. *Plant Breeding Rev.*, 12, 81-113.
- Halward, T., et Wynne, J.C., 1991. Genetation means analysis for productivity in two diverse peanut crosses. *Theor. Appl. Genet.*, 82, 784-792.
- Halward, T.M., Stalker, H.T., et Kockert, G.D., 1993. Development of RFLP map in diploid peanut species. *Theor. Appl. Genet.*, 87, 379-384.
- He, G., 2003. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, 3, 0-0.
- He, G., et Prakash, C.S., 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 97, 134-149.
- Henderson, C.R., 1977. Prediction of future records. *In*: Proc. Intern. Conf. on Quantitative Genetics, 16-21 August 1976, Press, T.I.S.U. pp. 615-638.
- Herselman, L., 2003. Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica*, 133, 319-327.
- Hird, H., 2003. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *European Food Research and Technology*, 217, 265-268.

- Holbrook, C.C., Wilson, D., Matheron, M.E., et Anderson, W.F., 2000a. *Aspergillus flavus* colonization and Aflatoxin contamination in peanut genotypes with resistance to other fungal pathogens. *Plant disease*, 81, 1429-1431.
- Holbrook, C.C., Matheron, M.E., Wilson, D., Anderson, W.F., Will, M.E., et Norden, A.J., 1994. Development of a large-scale field system for screening peanut for resistance to pre-harvest Aflatoxin contamination. *Peanut Sci.*, 21, 20-22.
- Holbrook, C.C., Kvien, C.K., Rucker, K.S., Wilson, D.M., Rucker, K.S., Kvien, C.S., Hook, J.E., et Matheron, M.E., 2000b. Preharvest aflatoxin contamination in drought-tolerant and drought-intolerant peanut genotypes. *Peanut Sci.*, 27, 45-48.
- Holmberg, N., et Bülow, L., 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci.*, 3, 61-66.
- Hopkins, M.S., Casa, A.M., Wang, T., Mitchell, S.E., Dean, R.E., Kockert, G.D., et Kresowich, S., 1999. Discovery and characterization of polymorphic Simple Sequence Repeats (SSRs) in Peanut. *Crop Sci.*, 39, 1243-1247.
- Hygen, G., 1951. Studies in plant transpiration I. *Physiologica Plantarum*, 157-183.
- Ingram, J., et Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 47, 377-403.
- Isleib, T.G., Wynne, J.C., et Nigam, S.N., 1994. Groundnut Breeding. *In: The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Smartt, J. (Ed.), Chapman & Hall, London, pp. 553-617.
- Jackson, P., Robertson, M., Cooper, M., et Hammer, G., 1996. The role of physiological understanding in plant breeding from a breeding perspective. *Field Crop Res.*, 49, 11-37.
- Jacob, T., Ritchie, S., Assman, S., et Gilroy, S., Abscissic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 9, 12192-12197.
- Jain, K.J., Basha, S.M., et Holbrook, C.C., 2001. Identification of drought responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *EJB, Electronic journal of biotechnology*, 9 pp.
- Jung, S., Powell, G., Moore, K., et Abbott, A., 2000a. The high oleate in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases. *Mol. Gen. Genet.*, 796-805.
- Jung, S., Powell, G., Moore, K., et Abbott, A., 2000b. The high oleate in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). II. Molecular basis and genetic of the trait. *Mol. Gen. Genet.*, 263, 806-811.
- Ketring, D., 1984. Root diversity among peanut genotypes. *Crop Sci.*, 24, 229-232.
- Ketring, D., 1986. Physiological response of groundnut to temperature and water deficits -Breeding implications. *In: Agrometeorology of Groundnut*, Sikavumar, M.V.K. et Virmani, S.M. (Ed.), International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, pp. 135-143.
- Khalifaoui, J.L., 1985. Conduite de l'amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse en fonction des mécanismes physiologiques. *Oleagineux*, 40, 329-334.
- Khalifaoui, J.L., et Halward, M., 1993. Screening peanut cultivar in the field for root growth: a test by herbicide injection in the soil. *Field Crops Res.*, 32, 173-179.
- Khalifaoui, J.L.B., 1990a. Genetic adaptation to drought of cultivated species and consequences on plant breeding. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 137, 125-137.
- Khalifaoui, J.L.B., 1990b. Etude des composantes de la précocité chez l'arachide. *Oleagineux*, 45, 81-87.
- Khalifaoui, J.L.B., 1990c. Hérité de la précocité extrême dans le cas d'un croisement entre deux variétés d'arachide Spanish. *Oleagineux*, 45, 419-436.
- Khalifaoui, J.L.B., 1991a. Determination of potential lengths of the crop growing period in semi-arid regions of Senegal. *Agric. For. Meteorol.*, 55, 351-263.
- Khalifaoui, J.L.B., 1991b. Approche de l'amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse. Cas de l'arachide au Sénégal. *In: Amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*, Aupelf-Uref (Ed.), Paris, pp.51-63.
- Klueva, N.Y., Zhang, J., et Nguyen, H.T., 1998. Molecular strategies for managing environmental stress. *In: Crop Productivity and Sustainability: Shaping the Future*, Proceeding of 2nd International Crop Science Congress, Copra, V.L., Singh, R.B. et Varma, P.J. (Ed.), Oxford et IBH, New Delhi, pp.501-524.
- Knight, H., 2000. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.*, 195, 269-325.

- Kochert, G., 1994. RFLP analysis of introgression in peanut. *In: Plant Genome Congress, (Ed.)*, San Diego, 24-27 janvier, pp.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H., et Shinozaki, K., 1993. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 129, 175-182.
- Korthout, H., Bericki, G., Bruin, W., van Dujin, B., et Wang, M., 2000. The presence and sub-cellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS letter*, 475, 139-144.
- Kramer, P., 1980. Drought, stress, and the origin of adaptations. *In: Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress*, Turner, N.C. et Kramer, P.J. (Ed.), Academic Press, New York, pp. 7-20.
- Krapovickas, A., 1969. The origin, variability and spread of the groundnut (*Arachis hypogaea*). *In: The Domestication and Exploitation of Plant and Animals*, Ucko, R.J. et Dimbleby, C.W. (Ed.), Duckworth, London, pp. 427-440.
- Krapovickas, A., et Rigoni, V.A., 1957. Nuevas especies de *Arachis* vinculados al problema del origen de *Arachis hypogaea* L. *Revista de Investigaciones Agrícolas*, 197-228.
- Kumar, G., et Knowles, N., 1993. Age of potato seed-tuber inflorescences protein synthesis during sprouting. *Physiol. Plant.*, 89, 89-99.
- Lauriano, J.A., Lidon, F.C., Campos, P.S., C.A., C., et Do Ceu Matos, M., 2000. Drought effect on cell membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica*, 32, 712.
- Lauriano, J.A., Campos, P.S., Ramalhlo, J.C., Lidon, F.C., Guedes, M.E., et Do Ceu Matos, M., 1997. Partial decline of *Arachis hypogaea* L. photosynthesis triggered by drought stress. *Photosynthetica*, 33, 81-90.
- Lazar, M., Salisbury, C., et Worrall, W., 1995. Variation in drought susceptibility among closely related wheat lines. *Field Crop Res.*, 41, 147-153.
- Lebart, L., Morineau, A., et Fénelon, J.P. 1979. *Traitement des données statistiques*. Dunod (Ed.).
- Leport, L., Turner, N.C., French, R., Bar, M., Duda, R., Davies, S., Tennant, D., et Siddique, K.H.M., 1999. Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment. *Eur. J. Agron.*, 11, 279-291.
- Levitt J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol.I. Water, radiation, salt and others stresses. Academic Press, New-York, pp. 395-434.
- Leuck, D.B., et Hammons, R.O., 1965. Further evaluation of the role of bees in natural cross pollination of peanut. *Agron. J.*, 57-94.
- Li, L., Li, C.X., Lee, G., et Howe, G., 2002. Distinct roles for jasmonate synthesis and action of systemic wound responses of tomato. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99, 6416-6421.
- Liao, B., Lei, Y., Wang, S., Li, D., Jiang, H., Ren, X., Liao, B.S., Lei, Y., Wang, S.Y., Li, D., Jiang, H.F., et Ren, X.P., 2003. Aflatoxin resistance in bacterial wilt resistant groundnut germplasm. *International Arachis Newsletter*, 0-0.
- Lilley, J., Ludlow, M.M., McCouch, S., et O'Toole, J., 1996. Location QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J. Exp. Bot.*, 47, 1427-1436.
- Liu, X., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K., 1998. Two transcription factors DREB1 et DREB2, with EREB/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.
- Long-Xi, Y., Djebrouni, M., Chamberland, H., Lafontaine, J., et Tabaeizadeh, S., 1998. Chitinase: differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild and cultivated tomatoes. *J. Plant Physiol.*, 153, 745-753.
- Lopez Cesar, G., 2003. Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Sci.*, 43, 577-582.
- Lopez, Y., Nadaf, H., Smith, O.D., et Connell, J.P., 2000. Isolation and characterization of the 12 fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines. *Theor. Appl. Genet.*, 101, 1131-1138.
- Ludlow, M.M., 1980. Adaptive significance of stomatal responses to water stress. *In: Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*, Turner, N.C. et Kramer, P.J. (Ed.), Wiley, New York, pp. 123-128.

- Ludlow, M.M., et Muchow, R., 1990. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water limited environments. *Adv. Agron.*, 43, 107-153.
- Luo, L.M., 2003. Application of EST technology in functional genomics of *Arachis hypogaea*. *Phytopathology*, 93, S55.
- Mackill, D.J., Nguyen, H.T., et Jingxiang Zhang, 1999. Use of molecular markers in plant improvement programs for rainfed rice. *Field Crops Res.*, 64, 177-185.
- Madhusudhan, K.V., Giridarakumar, S., Ranganayakulu, G.S., Reddy, P.C., et Sudhakar, C., 2002. Effect of water stress on some physiological responses in two groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with contrasting drought tolerance. *J. Plant Biology*, 29, 199-202.
- Maggio, A., Joly, R.J., Hasegawa, P.M., et Bressan, R.A., 2003. Can the quest for drought tolerant crops avoid Arabidopsis any longer? *J. Crop Production*, 7, 99-129.
- Marone, A., et Annerose, D.J.M., 1995. Effect of late drought on water relation and production of field grown peanut. *In: Proceedings Interdrought 95*, 31 août-02 septembre 1995, INRA (Ed.), Montpellier, 52 (section VII).
- Martilla, S., Jones, N., et Mikkonen, A., 1995. Differential linalization in two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiol. Plant.*, 81, 798-801.
- Martins, L., 1997. Activation of multiple interleukin -1- β converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272, 7421-7430.
- Matos, A.R., D'arcy-Lameta, A., França, M., Pêtres, S., Edelman, L., Kader, J.C., Zuily-Fodil, Y., et Pham Thi, A.T., 2001. A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid hydrolase. *FEBS letter*, 491, 188-192.
- Matus, A., Slinkard, A., et Van Kessel, C., 1995. Carbon isotope discrimination and indirect selection for seed yield in lentil. *Crop Sci.*, 35, 679-684.
- Maxwell, K., et Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51, 659-668.
- Medrano, H., Escalona, J., Bota, J., Gulias, J., et Flexas, J., 2002. Regulation of photosynthesis in response to progressive drought: stomatal conductance as reference parameter. *An. Bot.*, 89, 895-905.
- Mehan, V.K., 1992. Management of aflatoxin contamination of groundnut. *Journal of Oilseed Research*, 9, 276-285.
- Mehan, V.K., Nageswara Rao, R.C., Mc Donald, D., et Williams, J.H., 1988. Management of drought stress to improve field screening of peanut for resistance to *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 78, 659-663.
- Mehan, V.K., Ramakrishna, N., Nageswara Rao, R.C., et Mc Donald, D., 1995. Preharvest Aflatoxin contamination of groundnuts subjected to terminal drought stress in post rainy season. *Mycotoxin Research*, 11, 103-109.
- Mia, M., Yamanchi, A., et Kono, Y., 1996. Root system structure of six food legume species: inter- and intraspecific variations. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 65, 131-140.
- Misra, J.B., 1997. Update on transformation of groundnut and potential genes for enhancement of quality. *International Arachis Newsletter*, 17, 18.
- Mitsuhashi, W., et Oaks, A., 1994. Development of endopeptidases activity in maize (*Zea mays* L.) endosperm. *Plant Physiol.*, 104, 401-407.
- Monneveux, P., et Depigny-This, D., 1995. Intégration des approches physiologiques génétiques et moléculaires pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez les céréales. *In: Quel avenir pour l'amélioration des plantes?*, Aupelf-Uref (Ed.), Paris, pp. 149-163.
- Monteverde-Penso, E., Wynne, J.C., Isleib, T.G., et Mozingo, R.W., 1987. A comprehensive breeding procedure utilizing recurrent selection for peanut. *Peanut Sci.*, 14, 1-3.
- Moore, K.M., et Knauff, D.A., 1989. The inheritance of high oleic acid in peanut. *J. Hered.*, 80, 252-253.
- Morgan, J., et Condon, A., 1986. Water use, grain yield and osmoregulation in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 523-532.
- Mortreuil, J., et Ndoye, O., 1993. Une nouvelle variété d'arachide pour l'Afrique : Fleur 11. *Oléagineux*, 46, 99-102.
- Murashige, T., et Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologica Plantarum*, 15, 473-497.

- Nageswara Rao, R., Williams, J.H., Wadia, K.D.R., Hubick, K., et Farquhar, G.D., 1993. Crop growth, water use efficiency and carbon isotope discrimination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes under end-of-season water deficit. *Ann. Appl. Biol.*, 122, 357-367.
- Nageswara Rao, R.C., Williams, J.H., et Murari Singh, J.H., 1989. Genotypic sensitivity to drought and yield potential of peanut. *Agron. J.*, 81, 887-893.
- Nageswara Rao, R.C., Williams, J.H., Sikavumar, M.K.V., et Wadia, K.D.R., 1988. Effect of water deficit at different growth phases of peanut. II. Response to drought during preflowering phase. *Agron. J.*, 80, 431-438.
- Nageswara Rao, R.C., Sardar Singh, Sikavumar, M.K.V., Srivastava, K.L., et Williams, J.H., 1985. Effect of water deficit at different growth phases of peanut. I. Yield responses. *Agron. J.*, 77, 782-786.
- Nascimento, L.C., 2003. Transformation of peanut with the tomato spotted wilt virus non-structural gene from the S RNA. *Phytopathology*, 93, S64-S65.
- Nautiyal, P.C., Ravindra, V., et Joshi, J.C., 1995. Gas exchange and leaf water relations in two peanut cultivars of different drought tolerance. *Biologica Plantarum*, 37, 371-374.
- Nautiyal, P.C., Ravindra, V., Vasantha, S., et Joshi, J.C., 1991. Moisture stress and subsequent seed viability. *Oleagineux*, 46, 153-158.
- Ndunguru, B.J., Ntare, B.R., Williams, T.H., et Greenberg, D.C., 1995. Assessment of groundnut cultivars for end-of-season drought tolerance in Sahelian environment. *J. Agric. Res. (Camb.)*, 125, 79-85.
- Nei, M., 1960. Studies on the application of Biometrical Genetics to plant breeding. *In: Memoirs of the College of Agriculture of Kyoto University*, vol 32, (Ed.), Kyoto, pp. 100.
- Neill, S.J. et Burnett, E.C., 1999. Regulation of gene expression during water deficit stress. *Plant Growth Regulation*, 29, 23-33.
- Nobile Paula, M., Gimenes Marcos, A., Valls Jose Francisco, M., et Lopes Catalina, R., 2004. Genetic variation within and among species of genus *Arachis*, section *Rhizomatosae*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 299-307.
- Ntare, B.R., 1999. Early generation testing for yield and physiological component in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 107, 141-147.
- Ntare, B.R., Williams, J.H., et Dougbedji, F., 2001. Evaluation of groundnut genotypes for eat tolerance under field conditions in Sahelian environment using a simple physiological model for yield. *J. Agric. Sci.*, 136, 81-88.
- Okogbenin, E., Ekanayake, I.J., et Porto M, C.M., 2003. Genotypic variability in adaptation responses of selected clones of cassava to drought stress in the Sudan savanna zone of Nigeria. *J. Agron. Crop Science*, 189, 376-389.
- Ortiz, R., Ekanayake, I., Mahalakshmi, V., Kamara, A., Menkir, A., Nigam, S., Singh, B., et Saxena, N., 2002. Development of drought-resistant and water-stress tolerant crops through traditional breeding. *In: Proceedings of the 8th JIRCAS International Symposium. Water for Sustainable Agriculture in Developing Regions: More Crop for Every Scarce Drop*, JIRCAS (Ed.), Tsukuba, pp.11-21.
- Ozias-Atkins, P., Schnall, J.A., Anderson, F., Singsit, C., Clemente, T.E., Adang, M.J., et Weissinger, A., 1993. Regeneration of transgenic peanut plants from stably transformed embryogenic callus. *Plant Sci.*, 93, 185-194.
- Papadakis, J., 1937. Méthode statistique pour les expériences au champ. *Bulletin scientifique d'amélioration des plantes de Thessalonique*, 23, 30.
- Papadakis, J., 1940. Comparaison de différentes méthodes d'expérimentation phytotechnique. *Revue Générale d'Agronomie*, 7, 298-362.
- Passioura, J.B., 1977. Grain yield, harvest index and water use of wheat. *J. Aust. Agric. Sci.*, 43, 117-120.
- Passioura, J.B., 1982. Water in the soil-plant-atmosphere continuum. *Encycl. Plant Physiol.*, New Series, 12B, 5-33.
- Passioura, J.B., 1994. The yield of crops in relation to drought. *In: Physiology and Determination of Crop Yield*, Boote, K.J., et al. (Ed.), Crop Science Society of America, Madison, WI, pp. 343-359.
- Passioura, J.B., 1996. Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regul.*, 20, 79-83.
- Percival, G., et Sheriffs, C., 2002. Identification of drought-tolerant woody perennials using chlorophyll fluorescence. *J. Arboriculture*, 28, 215-223.

- Pham Thi, A.T., Vieira da Silva, J.B., et Mazliak, P., 1990. The role of membrane lipids in plant resistance to water stress. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 137, 199-114.
- Pillai, M., Yanagihara, S., et Akiyama, T., 2001. Molecular cloning and characterization of salt responsive genes in rice (*Oryza sativa*). *J. Plant Physiol.*, 158, 1189-1194.
- Qiang, C., 2003. Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. *Plant and Soil*, 255, 605-617.
- Quarrie, S., Pekic, S., Lazic-Pekic, S., Ivanosevic, V., et Vasic, G., 1995. ABA and drought tolerance in maize : Future prospects. *In: Maize Breeding Production and Utilization: 50 years of Maize Research Institute, Zemin Polje, Maize Research Institute et Videnovic, Z. (Ed.)*, Belgrade, pp. 121-137.
- Ravikumar, R.L., Patil, B.S., et Salimath, P.M., 2003. Drought tolerance in sorghum by pollen selection using osmotic stress. *Euphytica*, 133, 371-376.
- Reddy, T.Y., 2003. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: A review. *Acta Agronomica Hungarica*, 51, 205-227.
- Ribaut, J.M., Hoisington, D.A., Deutsch, J.A., Jiang, C., et Gonzales de Leon, D., 1996. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I Flowering parameter and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 905-914.
- Richards, R., Lopez-Castaneda, C., Gomez-Mcpherson, H., et Condon, A., 1993. Improving the efficiency of water use by plant breeding and molecular biology. *Irrig. Sci.*, 14, 93-104.
- Richards, R.A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul.*, 20, 157-166.
- Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A., et Cattivelli, L., 2001. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate cold acclimation and freezing tolerance of winter spring oat. *Plant Breeding*, 120, 389-396.
- Rohini, V.K., et Sankara Rao, K., 2001. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci.*, 160, 889-898.
- Rosales-Serna, R., Kohashi-Shibata, J., Acosta-Gallegos, J.A., Trejo-Lopez, C., Ortiz-Cereceres, J., et Kelly James, D., 2004. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field Crops Research*, 85, 203-211.
- Roy-Macauley, H., Zuily-Fodil, Y., Kidric, M., Pham Thi, A.T., et Vieira Da Silva, J.B., 1992. Effect of water stress on proteolytic activities of cell compartments of *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiologica Plantarum*, 85, 90-96.
- Ruivenkamp, G., et Richards, P., 1994. Drought tolerance as a social process. *In: Biotechnology and Development Monitor, CTA (Ed.)*, Wageningen, pp.
- Ryan, C., et Moura, D., 2002. Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 6519-6520.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.S., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Sadras, V.O., et Milroy, S.P., 1996. Soil water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchanges: a review. *Field Crops Res.*, 47, 253-266.
- Sahsah, Y., Campos, P., Gareil, M., Zuily-Fodil, Y., et Pham Thi, A.T., 1998. Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiologica Plantarum*, 104, 557-586.
- Saporta, G. 1990. *Probabilités, analyse des données et statistiques*. Technip (Ed.) Paris.
- Schilling, R. 1996. *L'arachide*. Maisonneuve et Larose-CTA (Ed.) Paris.
- Searle S.R., 1987. *Linear models for unbalanced data*. Wiley (Ed.) New York.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K., 2003. Molecular response to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opin. Plant Biol.*, 14, 194-199.
- Selote Devarshi, S., Bharti, S., et Khanna-Chopra, R., 2004. Drought acclimation reduces O₂ accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, 724-729.

- Shackel, K., et Hall, A.E., 1983. Comparison of water relations and osmotic adjustment in sorghum and cowpea under field conditions. *Aust. J. Plant Physiol.*, 10, 423-435.
- Sharma, K.K., et Anjaiah, V., 2000. An efficient method for production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. *Plant Sci.*, 159, 7-19.
- Shinozaki, K., et Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Molecular response to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opin. Plant Biol.*, 3, 217-223.
- Sikavumar, M.V.K., 1988. Predicting rainy season potential from the onset on rain in southern Sahelian and Sudanian climatic zones of West Africa. *Agric. For. Meteorol.*, 42, 295-305.
- Sikavumar, M.V.K., 1991. Drought spells and drought frequencies in West Africa. *Research Information Bulletin 13*. ICRISAT, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (Ed.) Patancheru.
- Sinclair, T.R., et Ludlow, M.M., 1985. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled plant water potential. *Aust. J. Plant Physiol.*, 12, 213-217.
- Sinclair, T.R., et Ludlow, M.M., 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Austr. J. Plant Physiol.*, 13, 329-341.
- Sinclair, T.R., et Lecoeur, J., 1996. Field pea transpiration and leaf growth in response to soil water deficit. *Crop Sci.*, 36, 331-335.
- Singh, A., Smartt, J., Simpson, C.E., et Raina, S.N., 1998. Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Gen. Res. Crop Eval.*, 45, 119-126.
- Singh, A.K., et Simpson, C.E., 1994. Biosystematics and genetic resources. *In: The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Smartt, J. (Ed.), Chapman & Hall, London, pp. 96-137.
- Singsit, C., Adang, M.J., Lynch, R.E., et al., 1997. Expression of *Bacillus thuringiensis* cryIA(C) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk Borer. *Trangen Res.*, 169-176.
- Srinivasan, A., Takedu, H., et Senboku, T., 1996. Heat tolerance in food legumes as evaluated by cell membrane thermostability and chlorophyll fluorescence technique. *Euphytica*, 88, 3545.
- Stalker, H.T., 1997. Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Res.*, 53, 205-217.
- Strange, R.N., et Subba Rao, P.V., 1994. The phytoalexin response of groundnut and its role in disease resistance. *Oléagineux*, 49, 227-233.
- Strasser, B.J., et Strasser, R.J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions : the JIP test. *In: Photosynthesis : from light to biosphere*, Publisher., K.A. (Ed.), Dordrecht, pp. 977-980.
- Stuber, C.W., Polacco, M., et Lyn Senior, M., 1999. Synergy of empirical breeding, marker assisted selection and genomics to increase crop yield potential. *Crop Sci.*, 39, 1571-1583.
- Subbarao, G.V., Johansen, C., Slinkard, A.E., Nageswara Rao, R.C., Saxena, N.P., et Chauhan, Y.S., 1995. Strategies for improving drought resistance in grain legume. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14, 469-523.
- Subramanian, V., Gurtu, S., Nageswara Rao, et Nigam, S.N., 2001. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome*, 43, 656-660.
- Swamy, B.P.M., Upadhyaya, H.D., Goudar, P.V.K., Kullaiswamy, B.Y., et Sube Singh, 2003. Phenotypic variation for agronomic characteristics in a groundnut core collection for Asia. *Field Crops Res.*, 84, 359-371.
- Tallury, P.S.R., Stalker, H.T., Pattee, H.E., et Reece, P., 1992. In Vitro culture of *Arachis hypogaea* Peg Tips. *Peanut Sci.*, 19, 78-82.
- Tehryung, K., Chowdhury, M.K.U., et Wetzstein, H.Y., 1999. A quantitative and histological comparison of GUS expression with different promoter constructs used in microprojectile bombardment of peanut tissue. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 35, 51-56.
- Thomashow, M., 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 605-617.
- Thoquet, P., Gherardi, M., Jouyret, P., Kerezi, A., An, J., Prosperi, J., Carreau, V., et 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.
- Tian, R., Zhang, G., Yan, C., et Dai, Y., 2000. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS letter*, 474, 11-15.
- Turner, N.C., 1982. The role of shoot characteristics in drought resistance in crop plants. *In: Drought Resistance in Crop Plants with Emphasis on Rice*, Institute, I.R.R.I (Ed.), Los Banos, pp. 115-134.
- Turner, N.C., 1986a. Crop water deficit : a decade of progress. *Adv. Agron.*, 39, 1-51.
- Turner, N.C., 1986b. Adaptation to water deficit : a changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 175-190.
- Turner, N.C., 1997. Further progress in crop water relations. *Adv. Agron.*, 58, 293-338.
- Turner, N.C., 2000. Drought resistance: A comparison of two frameworks. *In: Management of Agricultural Drought : Agronomic and Genetic Options*, Saxena, N.P., *et al.* (Ed.), Oxford and IBH, New Delhi, pp. 10.
- Turner, N.C., et Jones, M.M., 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. *In: Adaptation of Plants to Water and High temperatures Stress*, Turner, N.C. et Kramer, P.J. (Ed.), Wiley, New York, 87-103 pp.
- Turner, N.C., Wright, G.C., et Siddique, K.H.M., 2001. Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Adv. Agron.*, 71, 193-231.
- Upadhyaya, H.D., 2003. Phenotypic diversity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) core collection assessed by morphological and agronomical evaluations. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50, 539-550.
- Upadhyaya, H.D., Ortiz, R., Bramel, P., et Sube Singh, 2003. Development of a groundnut core collection using taxonomical, geographical and morphological descriptors. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 139-148.
- Van Buijtenen, J.P., 1992. Fundamental Genetic Principles. *In: Handbook of Quantitative Forest Genetic*, Fins, L., Friedman, T. et Brotschol, V. (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 403.
- Viestra, R.D., 1993. Protein degradation in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 44, 385-410.
- Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A.T., et Vieira da Silva, J.B., 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J. Exp. Bot.*, 41, 827-832.
- Wang, W., Vinocur, B., et Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1-14.
- Watnabe, H., Abe, K., Emori, Y., Hosoooyama, H., et Arai, S., 1991. Molecular cloning and induced gibberellin expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (Orizains). *J. Biol. Chem.*, 16897-16902.
- Williams, J.H., 1992. Concepts for the application of crop physiological models to crop breeding. *In: Groundnut - A Global Perspective: Proceedings of an International Workshop ICRISAT Center*, Nigam, S.N. (Ed.), ICRISAT, Patancheru, pp.345-352.
- Williams, J.H., et Drexler, J.S., 1981. A nondestructive method for determining peanut pod maturity. *Peanut Sci.*, 8, 134-141.
- Williams, J.H., et Boote, K.J., 1995. Physiology and modelling predicting the "unpredictable legume". *In: Advances in peanut science*, Pattee, H. et Stalker, H.E. (Ed.), Stillwater OK, pp. 301-353.
- Williams, J., Bulman, M., Huttly, A., Phillips, A., et Neill S., 1994. Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* encoding a potential thiol protease whose expression is induced independently by wilting and abscissic acid. *Plant Mol. Biol.*, 25, 250-270.
- Withe, J.W., 1993. Implications of carbon isotope discrimination studies for breeding common bean under water deficits. *In: Stable Isotope and Plant Carbon-Water relations*, Ehleringer, J.R., Farquhar, G.D. et Hall, A.E. (Eds.), Academic Press, San Diego, CA, pp. 387-398.
- Wright, G.C., 1994. Water-use efficiency - its importance in drought resistance in groundnut and other food legumes. *In: Selection for Water-Use Efficiency in Grain-Legumes*, Wright, G.C. et Rao, R.C.N. (Ed.), ACIAR, Canberra, 46-51 pp.
- Wright, G.C., et Nageswara Rao, R.C., 1994. Groundnut water relations. *In: The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*, Smartt, J. (Ed.), Chapman & Hall, London, pp. 281-335.

- Wright, G.C., Hubick, K., et Farquhar, G.D., 1991. Physiological analysis of peanut cultivar response to timing duration of drought stress. *Aust. J. Agric. Res.*, 42, 453-470.
- Wright, G.C., Rao, R.C.N., et Basu, M.S., 1998. Selection for water-use efficiency in food legume-Extension phase report. *ACIAR Food Legume Newlett.*, 27, 4-6.
- Wright, G.C., Rachaputi, N., Nigam, S.N., et Basu, M.S., 2002. More efficient breeding of drought resistant groundnut in India and Australia. *In: Proceedings of the 8th JIRCAS International Symposium, Water for Sustainable Agriculture in Developing Regions: More Crop for Every Scarce Drop*, JIRCAS (Ed.), Tsukuba, pp.
- Xiong, L., et Zhu, J., 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.*, 25, 131-139.
- Xu, H., Annis, S., Linz, J., et Trail, F., 2000. Infection and colonization of peanut pods by *Aspergillus parasiticus* and the expression of the aflatoxin biosynthesis gene, nor-1, in infected hyphae. *Physiol Mol. Plant Pathology*, 185-196.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Kasuga, M., Liu, Q., Nakashima, K., Sakuma, Y., Abe, H., Shinwari, Z., Seki, M., et Shinozaki, K., 2002. Development of drought-resistant and water stress-tolerant crops through biotechnology. *In: Proceedings of the 8th JIRCAS International Symposium; Water for Sustainable Agriculture in Developing Regions: More Crop for Every Scarce Drop*, JIRCAS (Ed.), Tsukuba, pp. 23-34.
- Yamamoto, Y., Conkling, M., et Sussex, I., 1995. An *Arabidopsis* cDNA related to animal phospholipid-specific phospholipase genes. *Plant Physiol.*, 107, 1029-1030.
- Yang, H., Ozias-Akins, P., Culbreath, A.K., Gorbet, D.W., Weeks, J.R., Mandal, B., et Pappu, H.R., 2004. Field evaluation of Tomato spotted wilt virus resistance in transgenic peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease*, 88, 259-264.

Résumé

La sécheresse est une contrainte multiforme s'exprimant à différents niveaux d'organisation du végétal. Ce travail vise une intégration des connaissances réalisée sur la base d'expérimentations conduites au Sénégal dans le cadre d'un programme de sélection pour l'augmentation du rendement de l'arachide en zone sèche. Le premier chapitre analyse un plan de croisement en demi-diallèle réalisé sur une population en cours d'amélioration par sélection récurrente sur la base de caractères d'adaptation à la sécheresse. Un calcul d'index de sélection, réalisé au moyen du logiciel de génétique quantitative DIOGENE, a permis d'estimer les espérances de gains génétiques relatives aux cinq principaux caractères agronomiques en fonction de la pression de sélection. Dans le deuxième chapitre, la variabilité de caractères phénologiques, agronomiques et physiologiques, a été étudiée sur une gamme réduite de cinq nouvelles variétés précoces. La période de mesure la plus favorable à la détection des différences variétales a été précisée pour ces caractères. Les indices de réponse au déficit hydrique en termes de rendement et les coefficients de partitions de matière sèche des nouvelles variétés ont été supérieurs à ceux du témoin. Le troisième chapitre approfondit cette étude de variabilité en la ciblant sur du nouveau matériel génétique à variabilité génétique étroite constitué par deux séries de lignées quasi-isogéniques. L'étude a montré qu'une variabilité génétique s'exprimait sur certains caractères malgré le fort niveau d'appareillage de ces lignées. Certaines corrélations statistiques entre caractères physiologiques, notamment les paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, et rendements en gousses ont été significatives mais non stables en fonction des années et du traitement hydrique. Ces résultats indiquent que les stratégies d'adaptation de l'arachide au champ sont différentes selon l'intensité du déficit hydrique et l'origine génétique des lignées. Une étude physiologique réalisée sur quatre cultivars (cv) en conditions de déficit hydrique précoce en serre a mis en évidence les stratégies d'adaptation observées au champ. La première stratégie fait appel à une fermeture tardive des stomates accompagnée d'une résistance protoplasmique forte et la deuxième permet le maintien d'un statut hydrique élevé durant le stress. Cette dernière stratégie paraît moins efficace que la première en terme de productivité au champ chez l'arachide. Ce travail a été poursuivi à l'échelle moléculaire sur les mêmes cvs. Les cinétiques de l'expression des gènes (transcrits), obtenus par RT-PCR en conditions de déficit hydrique croissant, ont montré que la sécheresse induit une stimulation d'une phospholipase D et d'une cystéine protéase chez le cv le plus sensible alors que le gène de LEA est plus stimulé chez le résistant. Ces expérimentations interconnectées conduites aux différentes échelles d'organisation de la plante ont permis de proposer un modèle méthodologique général et de créer des cvs améliorés répondant à la demande sociale.

Mots clefs : arachide, adaptation à la sécheresse, sélection, intégration des connaissances

Abstract

Drought is a multiform constraint which is expressed at different plant organisation levels. The present project was aimed at integrating knowledge generated by experiments carried out in Senegal within the framework of a breeding programme geared towards improving groundnut yield under drought conditions. The first chapter analyses a half-diallel cross performed on an original population under recurrent selection for drought adaptation. The selection indices, calculated using the DIOGENE software, were used to estimate genetic gains relative to the main agronomic characters according to selection pressure. In the second chapter, the genetic variability of phenological, agronomic and physiological characters was studied on five new early varieties. The measurement periods during which varietal differences are best detected were established for these characters. The yield-based drought response indices and the dry matter partitioning coefficients were higher for the new varieties compared to the check. The third chapter covers this variability analysis in greater depth by focusing on new genetic material consisting in two series of quasi-isogenic lines. Genetic variability was revealed in these lines as well as correlations between yield and physiological parameters, i.e. mainly fluorescence parameters, despite the closeness between lines. However, these correlations were not stable across lines and environments, showing that groundnut has different drought adaptation strategies. The fourth study was conducted with four varieties to physiologically analyse drought adaptation strategies observed in the field. The first strategy was characterised by late stomatal closure and high protoplasmic tolerance during drought, the second maintained a water status but seemed less efficient than the first with respect to groundnut field productivity under all conditions. This work was pursued with the same cultivars at the molecular level. The gene transcript kinetics under drought, obtained using RT-PCR, showed that Phospholipase D and Cysteine protease gene expressions were stimulated by stress in the most susceptible cultivars, whereas their was higher LEA gene expression in the resistant one. These interconnected experiments conducted at different plant organisation levels led to the development of a general methodological model and of new improved genotypes to meet the social demand.

Keywords: groundnut, drought adaptation, breeding, integration of knowledge