

CRD00310

Commission des Communautés Européennes/DG XII

Contrat n° TS3-CT93-0215

**“Physiologie de l'adaptation à la sécheresse
et création variétale pour les régions sèches”**

**Rapport annuel
Janvier - Décembre 1994**

Préparé et édité par D.J.M. Annerose, coordonnateur du projet

CERA

AD713

Table des matières

Présentation du projet.....	1
Introduction	1
Organisation	1
Les recherches	2
Coopération et relations.....	3
Rapports d'activités	4
CERAAS..	4
Université Paris 7.....	21
Université Libre de Bruxelles	73
Estação Agronomica Nacional.....	97
Institut du Sahel.....	113
Annexes.	117
Appui au montage CERAAS	118
Mission en Sierra Leone	130

introduction

A travers ses effets sur la production agricole la sécheresse a des conséquences importantes sur la baisse du niveau alimentaire, économique et de santé des pays en développement (PED). Parmi les initiatives en cours pour répondre à ce problème, ce projet a pour objectif général de contribuer à l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées. Ses objectifs spécifiques sont, à travers une approche pluridisciplinaire du problème d'améliorer les connaissances sur la physiologie de l'adaptation à la sécheresse des plantes et de proposer des outils permettant d'améliorer l'efficacité des programmes de sélection et de création variétale.

Plusieurs résultats obtenus à l'issue de la première phase permettent d'illustrer cette approche pour les PED.

- La compréhension des mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse au niveau de la plante, de l'organe et au niveau moléculaire a progressé chez les plantes vivrières cultivées dans les PED.
- La mise en évidence de la diversité des formes d'adaptation à la sécheresse des principales espèces vivrières a été effectuée ou a débuté.
- Les idéotypes d'adaptation pour une forme de sécheresse donnée ont été définis pour les espèces les plus étudiées.
- Les programmes de sélection et de création variétale exploitant ces critères ont débuté dans les pays les plus avancés.
- Les premières variétés améliorées issues de ces programmes ont été obtenues et sont en cours de vulgarisation.
- L'organisation des recherches a permis de constituer autour de ce projet une importante communauté scientifique (plus de 100 chercheurs, 21 pays, 15 espèces) travaillant de manière conjointe et coordonnée.

Organisation du projet

Le laboratoire de biochimie et de physiologie de l'adaptation végétale (LBPAV) de l'Université Paris 7 conduit des recherches sur les aspects cellulaires et moléculaires de la tolérance à la sécheresse.

Le laboratoire de physiologie végétale (LPV) de l'Université libre de Bruxelles étudie les effets de la sécheresse sur l'organisation et le fonctionnement de la photosynthèse.

Le Département de physiologie végétale (DPV) de l'Estação Agronómica Nacional d'Oeiras (Portugal) étudie les mécanismes biophysiques de l'adaptation à la sécheresse.

Le Centre d'étude régional pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse (CERAAS, Sénégal) coordonne ce projet. Les recherches au CERAAS portent sur les aspects agronomiques, physiologiques et sur la génétique de l'adaptation à la sécheresse. Ce laboratoire accueille les chercheurs institutions partenaires (SNRA¹

¹Systèmes nationaux de recherches agronomiques.

et pays européens) pour des séjours de recherche ou de formation dans ces domaines,

Dans ce projet, l'arachide (*arachis hypogea* L.) et le niébé (*vigna unguiculata* L.) sont les deux: plantes communes sur lesquelles les partenaires conduisent leurs recherches. Les autres espèces sont étudiées par les équipes de recherches des SNRA en partenariat avec le CERAAS

Recherches

Le **CERAAS** a débuté ses recherches dans ce projet plusieurs mois après les autres partenaires. Le transfert de son alimentation financière par l'université Paris 7 retarde considérablement sa mise à disposition effective. Cette période a été mise à profit afin de renforcer, avec l'appui de l'INSAH, le cadre et les mécanismes institutionnels de ce projet (voir annexes).

Durant cette courte période le CERAAS a organisé des séjours de recherche et de formation pour neuf (9) chercheurs ou étudiants de fin de cycle. Les études ont portés sur 7 espèces dans le cadre d'expérimentations conduites au champ et en conditions contrôlées.

Les recherches sur l'arachide ont permis de préciser les limites des mécanismes d'adaptation de cette espèce par une meilleure description des relations entre l'état hydrique du sol dans la zone racinaire et celui des feuilles et ses conséquences sur le maintien de l'état hydrique de la plante, de ses échanges gazeux et de sa productivité. Les résultats de cette étude ont permis d'améliorer les modèles de simulation du bilan hydrique et de la productivité développés pour cette espèce

Les travaux sur l'adaptation à la sécheresse du cotonnier ont permis de mener une étude sous irrigation différentielle des interactions variétés x sécheresse de 15 géotypes. Elles permettront d'identifier 6 variétés présentant des réponses différenciées pour la poursuite des études physiologiques.

Les autres recherches concernent des études agro-physiologiques préliminaires sur le sorgho et le pachyrhizus.

Les recherches sur le niébé ont permis d'évaluer les effets d'un stress hydrique post-floral sur la production de deux variétés, semencière ou fourragère.

Les premiers résultats sur la dynamique de l'enracinement de *gliciridia sepium* et de *cassia siamea* ont été obtenus afin de déterminer leur aptitude à l'association avec le maïs dans des systèmes de cultures en couloir.

Le CERAAS a poursuivi ses travaux pour la mise au point de tests appliqués à la sélection de matériel adapté à la sécheresse sur la base de critères physiologiques, L'automatisation de plusieurs dispositifs est en cours et devrait aboutir à la mise à disposition des premiers prototypes durant le prochain semestre.

Les résultats obtenus en 1994 au **LBPAV** (France) montrent notamment :

- une augmentation des activités galactolipasiques avec le déficit hydrique d'autant plus importante que le cultivar est sensible;
- le rôle protecteur et stabilisateur que pourraient assurer les xanthophylles, notamment la zéaxanthine, pour les lipides membranaires des thylacoïdes.

Les travaux sur la biologie moléculaire de la LAH ont permis de réaliser la banque ADNc d'ARN de *Vigna unguiculata* et d'effectuer le microséquençage d'une de ses sous-unités.

A ce stade, les résultats obtenus par le LBPAV sont déjà particulièrement importants pour le projet. Ils permettent en effet aux chercheurs associés à ce projet de mieux conceptualiser l'importance des mécanismes de tolérance cellulaire et moléculaire dans les réactions au stress hydrique observées chez les plantes cultivées au champ ou en pot.

Le LPV (Belgique) a poursuivi ses recherches sur la mise au point de méthodes de mesure de la fluorescence appliquées à la description de l'activité photosynthétique des plantes. Les travaux menés sur *vigna unguiculata* L. et *phaseolus vulgaris* L. montrent que la caractérisation des paramètres décrivant la cinétique rapide de la fluorescence et de la fluorescence modulée permet de distinguer la réponse photosynthétique au stress de plantes sensibles ou non. Le LPV travaille aussi à la mise au point d'un dispositif laser permettant d'obtenir au champ et sans contact une image de fluorescence renseignant précisément sur l'activité photosynthétique des feuilles. Ces travaux devront aboutir à la proposition de méthodes discriminantes efficaces pour des criblages rapides de plantes.

Les recherches du DPV (Portugal) mettent en évidence le lien direct entre la mesure de la tolérance à la sécheresse mesurée au niveau cellulaire et au niveau de la productivité primaire (photosynthèse). Les travaux de ce laboratoire sur plusieurs espèces de *vigna* valident aussi l'approche moléculaire exploitée dans ce projet au LBPAV. Le DPV montre que les variétés chez lesquelles les processus dégradatifs des lipides membranaires sont les plus importantes sont aussi celles pour lesquelles l'activité photosynthétique est la plus affectée en condition de stress. Ces résultats ont été aussi confirmés par des essais au champ.

Coopération, relations

Ce projet bénéficie de l'existence de coopérations solides entre ses partenaires. Des négociations sont en cours afin de les renforcer notamment entre les partenaires des institutions du Nord et les SNRA d'Afrique et d'Amérique du Sud. Le CERAAS constitue le centre autour duquel s'organise ce renforcement. Une proposition entre le LPV et le CERAAS est ainsi en cours d'examen par l'AGCD² pour un appui en infrastructures (serre) et la mise à disposition d'un expert belge. Des négociations de ce type sont aussi en cours avec le Brésil et la France (CIRAD).

Entre les SNRA ses discussions sont bien avancées et se concrétisent dans un premier temps par la mise à disposition d'experts régionaux au CERAAS afin de renforcer le potentiel humain dans les différents thèmes étudiés. Ces mécanismes inédits et la mise en place d'un mode de gestion adapté font du CERAAS la première structure régionale fonctionnelle des pays membres du CILSS et de la CORAF.

Un atelier de lancement des activités pour l'ensemble du projet est programmé pour le mois de janvier 1995 à Dakar (Sénégal). Il rassemblera l'ensemble des partenaires et des chercheurs représentant les SNRA et permettra d'organiser et de planifier les recherches et les activités de formation de ce projet.

*Agence générale de coopération pour le développement (Belgique)

Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration
de l'Adaptation à la Sécheresse
(CERAAS)

Rapport annuel 1994

**Physiologie et génétique de l'adaptation à la sécheresse
des espèces cultivées**

Responsable : Dr. Daniel J.M. ANNEROSE
(Physiologiste, Cirad/Isra)

Décembre 1994

Introduction

Le CERAAS constitue depuis sa création en 1989 l'unique base-centre fonctionnelle du dispositif régional développé par les institutions nationales de recherche membres de la CORAF¹ et du CILSS². Ce laboratoire national à vocation régionale a bénéficié pour son montage d'un financement de la CCE/DG XII dans le cadre du programme STD2 qui a pris fin en octobre 1993.

Ce soutien de la CCE/DGXII a permis au CERAAS d'élargir à la région ses compétences dans le domaine de l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées acquises dans le cadre d'un programme associant le CIRAD et l'ISRA sur l'arachide destinée aux zones sèches. Dans le cadre d'une approche pluridisciplinaire, ce projet a notamment contribué à renforcer la maîtrise par les chercheurs des SNRA des concepts et des méthodologies sur les thèmes de l'agronomie, la physiologie et la génétique de l'adaptation à la sécheresse de 15 espèces végétales³. Une importante communauté scientifique s'est constituée autour de ces recherches et des actions de formation associées, aboutissant à la fin de cette première phase à l'obtention des premiers résultats significatifs pour le développement³.

Sur la base des résultats obtenus la DGXII a renouvelé son appui au CERAAS dans le cadre de son programme STD3. Le CERAAS est le coordonnateur scientifique de ce nouveau projet qui associe maintenant aux SNRA⁴ membres de la CORAF et du CILSS, des équipes universitaires et d'institutions de recherche belges françaises et portugaises. Les principaux objectifs de ce projet sont :

- . améliorer les connaissances sur les mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées dans les PED;
- . préciser la génétique des espèces concernées afin de proposer des stratégies de sélection réalistes;
- . intégrer ces connaissances dans une approche multidisciplinaire du problème afin de mettre en place, pour chaque situation, des programmes de sélection performants.
- . proposer à la vulgarisation du matériel végétal amélioré et adapté aux formes de contrainte hydrique rencontrées dans chaque situation.

Ce projet a débuté en janvier 1994 et ce rapport présente les principaux résultats obtenus au 31 décembre 1994.

Mise en oeuvre du projet.

Les activités scientifiques du CERAAS ont débuté avec un important retard. En effet, la CCE/DGXII a, pour des raisons administratives, estimé que l'alimentation du CERAAS transiterait par l'Université Paris 7. Ce processus s'est révélé extrêmement lent et a repoussé au mois de septembre 1994 le début du financement des activités

¹Conférence des responsables d'institutions de recherche africaines.

²Comité interafricain de lutte contre la sécheresse dans le Sahel.

³Voir rapport final projet CERAAS/STD2

⁴Systèmes nationaux de recherches agronomiques

scientifiques du CERAAS. Des discussions sont en cours avec la CCE/DGXII pour reprendre le système des alimentations directes qui était déjà utilisé dans le programme STD2

Cette longue période a cependant été mise à profit afin de renforcer le cadre institutionnel de ce projet, mettre en place les mécanismes de fonctionnement adaptés, développer et consolider les coopérations scientifiques.

Appui de la CCE/FED

Les discussions **avec** le **FED** se sont poursuivies et se sont concrétisées par l'acceptation d'une proposition **complémentaire** de renforcement du CERAAS dans les domaines des investissements, des infrastructures et de la formation. Elles devront aboutir à une mise en oeuvre du financement accordé durant le premier trimestre 1995.

Gestion du projet

Les négociations avec l'**ISRA** et la **CORAÇ** ont permis de concrétiser pour la première fois au CERAAS le principe d'autonomie des base-centre régionales. Le projet bénéficie maintenant d'une large responsabilité déléguée pour l'engagement et la liquidation des dépenses lui permettant de remplir plus efficacement son mandat de structure à vocation régionale. Ceci s'est notamment concrétisé par l'affectation au CERAAS, depuis le 1^{er} septembre 1994 et sur proposition du Responsable du projet, de Mr Amadou KANDJI, en tant que gestionnaire-comptable.

Renforcement de la coopération scientifique

Le renforcement de la coopération avec les différents partenaires du CERAAS s'est effectué principalement à travers la préparation de propositions de recherche.

Le CIRAD est impliqué fortement dans le CERAAS depuis la mise en place de ce projet. Les discussions sont en cours afin de renforcer l'affichage de sa coopération à travers le montage, dans le cadre du CERAAS, d'un projet en coopération avec la CORAF et l'**ISRA**. Les premiers contacts ont été pris avec la Mission de Coopération **Française** à Dakar afin d'envisager les moyens permettant de supporter cette initiative.

Une proposition associant le CERAAS au laboratoire de Physiologie végétale de l'Université Libre de Bruxelles (Belgique) a été soumise pour financement à l'agence de coopération belge (AGCD). Cette proposition facilitera la mobilité des chercheurs des 2 laboratoires et contribuera notamment à la construction d'une serre automatisée au CERAAS.

Les autorités brésiliennes ont accepté, lors de la réunion bilatérale entre le Sénégal et le Brésil, le **principe** d'un renforcement de leur coopération scientifique en Afrique notamment à travers des projets régionaux comme celui-ci. Un projet est en cours d'élaboration dans ce domaine pour des collaborations avec les universités de Rio de Janeiro et du **Mato Grosso**.

Les recherches menées au CERAAS dans le domaine de la modélisation du fonctionnement des plantes et des cultures dans les zones sèches sont en cours d'extension à travers un projet d'**appui** à la prévision de la production agricole au Sénégal. Cette proposition associant étroitement les équipes du CERAAS, à celles

de la Direction de l'Agriculture et du Centre de Suivi Ecologique, a été reçue avec un avis très favorable par la FAO où elle est en cours d'étude.

Recherches

Le CERAAS a organisé des séjours de recherche et de formation à l'intention de neuf (9) chercheurs ou étudiants en fin de cycle (voir tableau). Les études ont porté sur 7 espèces. Trois d'entre elles, l'arachide, le pachyrhizus et le coton, font l'objet de recherches conduites par l'équipe de base du CERAAS.

Niébé

Le CERAAS a accueilli Mlle f. BOULFROY Emmanuelle dans le cadre d'une collaboration avec le CIRAD-EMVT et l'ENSAM-INRA (Montpellier, France) sur une action thématique programmée (ATP). Durant ce séjour à vocation diplômante (DAA) elle a mené une étude sur les effets d'un stress hydrique post-floral sur la production du niébé (BOULFROY, 1994).

L'étude comprenait une variété semencière et une variété fourragère cultivées au champ sur parcelles couvertes et avec une maîtrise des apports en eau

Les principaux résultats ont confirmé la bonne capacité du niébé à maintenir l'état hydrique de ses tissus foliaires en condition de sécheresse. L'effet du stress s'est traduit par un ralentissement du développement végétatif des 2 variétés. Néanmoins et dans les conditions de cette étude aucun effet significatif de la sécheresse sur le rendement final n'a été observé chez les 2 variétés. Cette réponse au stress hydrique révèle une bonne capacité du niébé à supporter une sécheresse post-florale grâce aussi à une bonne capacité de récupération.

Cette étude a permis de proposer un certain nombre de solutions pour le pilotage de l'irrigation sur cette espèce pouvant être cultivée pour des objectifs fourragers dans la vallée du fleuve Sénégal.

Gliciridia et Cassia

Monsieur Mamadou NDIAYE, agronome (ISRA, Sénégal), a débuté un travail de thèse sur l'agronomie du maïs cultivé en conditions pluviales au Sénégal. Un volet de ses recherches concerne l'étude des espèces complémentaires pouvant être exploitées avec le maïs dans le cadre d'un système de culture en couloir. L'objectif de ces travaux est de proposer un système améliorant la fertilité des sols cultivés en maïs et l'efficacité de l'utilisation de l'eau de cette espèce. Une expérimentation a été mise en place afin d'étudier la dynamique d'enracinement de deux espèces légumineuses, *cassia siamea* et *gliciridia sepium*, et de fournir les premiers éléments sur leur utilisation potentielle dans le système de culture préconisé. Cette étude s'est effectuée en rhizotron et sous différentes conditions de culture (chaux +/- et inoculum +/-). L'essai est encore en cours de réalisation mais les premières observations révèlent des différences importantes des caractéristiques d'enracinement de ces 2 espèces.

Arachide

Agro-physiologie

Les précédents travaux sur l'arachide avaient permis de préciser au champ les relations entre l'état hydrique du sol dans la zone racinaire et celui de la plante

(MARONE, 1994). Nous avons ainsi montré que chez la variété 55-437 soumise à une sécheresse en phase de pleine floraison les stomates commençaient à se fermer pour une RUR^5 de 55% permettant aux plantes de maintenir l'état hydrique de leurs tissus foliaires jusqu'à une RUR de 43%. Cependant les premiers effets sur la production et le développement se manifestaient pour des RUR inférieures ou égales à 30%. Ces résultats mettaient notamment en évidence, durant les sécheresses de fin de cycle, l'importance des mécanismes de tolérance à la déshydratation chez cette espèce. Les recherches conduites en 1994 ont pour objectif de préciser la nature des réponses adaptatives développées par l'arachide lorsqu'elle est soumise à une sécheresse à différentes phases de son cycle.

Un essai au champ sur parcelles couvertes et avec pilotage de l'irrigation a été mis en place avec la variété 55-437. Une sécheresse a été appliquée sur les parcelles traitées durant 3 phases du développement de la culture. Les analyses de cet essai sont en cours mais les premiers résultats révèlent bien l'expression de réponses adaptatives contrastées à la sécheresse en fonction de l'âge de la culture.

Les interactions variétés x sécheresse ont aussi fait l'objet d'une expérimentation en 1994. Cinq variétés ont été cultivées au champ en conditions pluviales et à ETM afin de préciser la diversité des réponses adaptatives à la sécheresse chez cette espèce. Les premières analyses mettent en évidence la meilleure adaptation des variétés récentes qui se caractérisent par un maintien de leur développement aux plus faibles niveaux de RUR (BEYALOU, 1994). Cette étude a fourni le sujet de stage de deux élèves-ingénieurs. Monsieur N. BEYALOU (Tchad) a présenté les résultats de cette étude pour l'obtention de son diplôme d'ingénieur agronome (ENCR) et Monsieur O. SAUTEREAU (France) a présenté un mémoire dans le cadre de sa formation d'ingénieur agronome de l'ISTOM.

Monsieur M. SENE (ISRA, Sénégal) termine actuellement une thèse d'agropédologie comportant un volet d'étude sur l'influence des conditions hydromécaniques de surface du sol sur la gynophorisation de l'arachide. Un essai en pots de culture mis en place en 1993 a été repris en contre saison 1993/1994. Les résultats de cet essai sont en cours d'exploitation. Pour la conduite de cette étude le CERAAS a développé une technique originale de culture en pots cloisonnés permettant de compartimenter la zone racinaire et la zone de gynophorisation d'une même plante afin de les soumettre simultanément à des situations hydriques différenciées.

Modélisation

Les résultats présentés plus haut permettent de mieux apprécier l'importance des réponses adaptatives en fonction de leurs conséquences sur la production de l'espèce. Ils permettent aussi d'alimenter des modèles de simulation du développement de l'arachide cultivée en condition de contrainte hydrique.

Ces modèles sont exploités dans nos programmes de recherche afin d'améliorer le diagnostic effectué sur les formes de sécheresse rencontrées et de définir de manière plus réaliste les formes adaptatives à rechercher dans la conduite des programmes de sélection et de création variétale. L'élargissement de cette démarche a débuté notamment avec les développements en cours du modèle Ara.B.Hy. afin de l'adapter à la simulation du bilan hydrique de l'arachide cultivée dans la région de Cordoba (Argentine). Ces travaux sont effectués dans le cadre

⁵Réserve utile racinaire

d'une collaboration avec l'INTA (Cordoba, Argentine) et plus particulièrement avec Mr J. DARDANELLI.

Depuis 1992 le modèle Ara.B.Hy. développé sur arachide est aussi exploité dans le cadre d'une coopération avec la Direction de l'Agriculture et le Projet National de Vulgarisation Agricole (PNVA) pour le suivi des cultures et l'aide à la prévision de la production. Monsieur K. LAOUORMADJI (Tchad) a effectué son stage de fin de cycle d'ingénieur agronome de l'ENCR (Bambey, Sénégal) sur l'application de ce modèle au suivi de la campagne arachidière dans la région de Diourbel (Sénégal). Ce travail a permis de fournir une nouvelle série de données validant l'approche utilisée et son efficacité pour l'estimation de la production à partir de données provenant des champs paysans (LAOUORMADJI, 1994). l'étude a confirmé l'importante variabilité des rendements de l'arachide dans cette région et a permis de distinguer les effets climatiques de ceux liés aux pratiques paysannes.

Cette recherche sur la modélisation offre déjà à ce stade de développement un potentiel important pour l'appui à la planification de la politique alimentaire, de santé et économique. La proposition de recherche évoquée plus haut et soumise à la F.A.O. a pour objectif d'élargir cette expertise à l'échelle nationale et aux autres espèces vivrières cultivées en conditions pluviales. Une première étude sommaire envisageant cette extension a été effectuée lors d'un séjour organisé pour Monsieur R CUISSARD élève-ingénieur au Laboratoire de Physiologie Végétale du Pr. LANNOYE (ULB, Belgique).

Coton

Les recherches sur le coton s'effectuent dans le cadre de la préparation d'une thèse de J.M. LACAPE (CERAAS, CIRAD) sur l'adaptation à la sécheresse du cotonnier.

Les travaux sur la résistance protoplasmique à la chaleur et la dessiccation du cotonnier ont nécessité une mise au point méthodologique qui met principalement en évidence :

- une forte variabilité de la réponse au test de résistance protoplasmique à la dessiccation
- un effet de l'âge de la plante, sans effet de l'âge de la feuille, sur la réponse au test de résistance protoplasmique à la chaleur;
- une meilleure tolérance membranaire de la variété Linea 100 comparée aux variétés IRMA 1243 et Deltapine 90.

Les interactions variétés x sécheresse ont été étudiées au champ sur 15 génotypes avec un dispositif d'irrigation différentielle. Les résultats de cet essai sont en cours de traitement. Ils confirment déjà la forte variabilité de croissance et de développement des variétés choisies. Une importante diversité des réponses observées au niveau du rendement et de ses composantes s'est exprimée chez les variétés testées. L'analyse de cet essai permettra de sélectionner 6 variétés présentant des réponses agronomiques différenciées pour la poursuite des travaux sur la physiologie de l'adaptation à la sécheresse du cotonnier.

Sorgho

Monsieur M. SENE (ISRA, Sénégal) a commencé une étude au champ des interactions entre alimentation en eau, densité de semis et fumure azotée chez le sorgho. Cette étude s'inscrit dans un projet de thèse sur l'agronomie de cette espèce

cultivée dans les zones pluviales sahéliennes. Un accident phytosanitaire n'a malheureusement pas permis de poursuivre cet essai qui sera reconduit en 1995

Pachyrhizus

Monsieur O. DIOUF étudie depuis 3 ans les espèces du genre *Pachyt-hizus* pour leur adaptation aux conditions de culture des zones sahéliennes. Une partie des coûts de la recherche de ce programme sont pris en charge par le CERAAS. Un essai d'évaluation multilocale a été mis en place dans 12 sites du nord au sud du Sénégal. Les résultats seront disponibles au début de l'année 1995.

Autres recherches

Monsieur F. PANNE a fini son séjour de CSN au CERAAS en novembre 1994 et a rejoint la France pour effectuer un doctorat. Durant son séjour il a fourni un excellent appui aux chercheurs en mission au CERAAS en biométrie, a collaboré à la poursuite des travaux sur la modélisation, et a proposé une méthode uniformisant la gestion et le traitement des **données** des essais (PANNE, 1994).

La **fonctionnalité** du dispositif d'hydroponie a été confirmée lors de tests préliminaires conduits sur des séries de plantes d'arachide. Des modifications sont en cours afin d'augmenter la distance entre plantes et permettre une meilleure individualisation des systèmes **racinaires**.

Le CERAAS bénéficie de l'appui du Département de Génie électrique de l'ENSUT (Dakar) pour la construction d'un automate de pesée de feuilles détachées. Les spécifications de cet appareil ont été définies et un premier prototype sera livré dans le courant du premier trimestre 1995. Cet automate permettra d'estimer la capacité de régulation stomatique de 200 échantillons foliaires par jour et contribuera à faciliter l'utilisation de ce test dans les programmes de sélection variétale.

Formation

Techniques d'étude physiologiques

Monsieur J.L. KONAN-KONAN, sélectionneur-junior sur cocotier à la Station IDEFOR Marc Delorme en Côte d'Ivoire a pu se former à différentes techniques d'études physiologiques en **collaborant** aux expérimentations en cours dans le laboratoire. La possibilité d'un appui du CERAAS à une thèse de Mr KONAN-KONAN a été évoquée dans le cadre de collaborations entre l'IDEFOR, le CERAAS et la station de Pobé au Bénin.

Stage en entreprise

Le CERAAS a organisé à la demande de l'**Ecole** Nationale Supérieure d'Agriculture (**ENSA**) de Thiès (Sénégal) un stage en entreprise pour Monsieur C. NDOUR élève-ingénieur en 3ème année. Ce stage s'inscrit dans le cursus que l'**ENSA** propose à ses élèves. Monsieur NDOUR a pu ainsi, au travers du projet CERAAS et de sa place au sein de l'**ISRA**, étudier les objectifs, la mise en oeuvre des moyens et les mécanismes scientifiques et administratifs assurant le fonctionnement d'une structure de recherche à vocation régionale.

Relations et partenariat

Réseau R3S-INSAH

Monsieur L. NETOYO de l'INSAH (CILSS) et coordonnateur du R3S a fourni un important appui au CERAAS pour la définition et la mise en place des mécanismes institutionnels de ce projet..

Monsieur NETOYO a effectué 2 missions à Dakar afin de préparer les documents relatifs à la mise à disposition des experts régionaux au CERAAS et ceux relatifs au rôle et au mode de fonctionnement de son futur Conseil Scientifique et Technique. Ces textes ont été discutés et amendés par l'ISRA et le Secrétariat exécutif de lia CORAF.

Une mission conjointe effectuée en Sierra Leone par Messieurs **ANNEROSE** et NETOYO afin de négocier la mise à disposition au CERAAS d'un biochimiste du Département de l'Botanique de l'Université de Freetown a permis de démarrer la mise en oeuvre de ces dispositions. L'accord obtenu affecte le Dr H. ROY-MACAULEY au CERAAS pour une période d'un an renouvelable afin de contribuer au montage du laboratoire de biochimie de l'adaptation à la sécheresse et à la conduite des recherches dans ce domaine.

Coopération française, CIRAD

Depuis l'origine du CERAAS, le **CIRAD** est fortement impliqué dans les réalisations effectuées à travers la coopération bilatérale entre le Sénégal et la France. La dimension régionale atteinte par ce projet nécessite maintenant de renforcer l'affichage et la nature de son intervention. Un avant-projet a été élaboré et a servi de base aux discussions avec la Mission de coopération française à Dakar où il a été bien accueilli. Mr N. **MBAYE**, Secrétaire exécutif de la CORAF, et Monsieur **ANNEROSE** ont ensuite effectué une mission en France afin de discuter de cette initiative au Ministère de la **Coopération**.

Les discussions avec le CIRAD-CA et la Direction scientifique du **CIRAD** ont permis d'évoquer les suites à donner à ce projet notamment en ce qui concerne le mode d'affectation d'experts pouvant intervenir dans un cadre régional.

Durant cette mission Mr **ANNEROSE** a rencontré les partenaires de l'université Paris 7 et a pu visiter le laboratoire du phytotron de Gif sur Yvette accompagné du Pr. G. **ESNAULT** et du Dr. Y. **ZUILY**. Cette visite a fourni d'importantes informations pour la construction du futur laboratoire central du CERAAS.

Belgique

Monsieur R. **GUISSARD** de l'**ULB** (Bruxelles) a effectué une mission préparatoire à un séjour à vocation diplômante sous la responsabilité du Pr. **LANNOYE**. Cette mission a permis de préciser les objectifs d'une étude permettant d'étendre à une échelle nationale l'application des outils de modélisation développés au **CERAAS** (voir plus haut).

Visites

Monsieur **DENEUF**, membre du conseil d'administration du **CIRAD** et professeur à l'Université Paris X, et Monsieur G. **BEYE**, expert à la F.A.O. (Rome, Italie) et ancien directeur du CNRA de Bambey ont visité le CERAAS.

Activités du prochain semestre

Recherches

Les recherches en cours se poursuivront durant cette période **principalement** sur les 3 espèces étudiées au CERAAS.

L'étude des relations racines-parties aériennes sur arachide aura pour **objectif** de préciser l'importance des modifications du métabolisme hormonal dans la **perception** de la sécheresse chez cette **espèce**. Une étude comparative avec le niébé précisera l'intérêt de ces modifications chez 2 **espèces** développant une réponse différente à la sécheresse (évitement et tolérance).

Les travaux sur le cotonnier auront pour objectif de décrire les mécanismes biophysiques d'adaptation chez les **6** variétés retenues à l'issue de l'analyse des résultats agronomiques et **d'établir** leur relation avec la performance observée au champ.

L'effet de compétition entre les graines et les tubercules sur *Pachyrhizus* sera évalué en relation avec la capacité de maintien des relations hydriques et des échanges gazeux des plantes soumises à différentes conditions d'alimentation ~~en~~ eau.

Le Dr. ROY-MACAULEY (Université de Freetown, Sierra Leone) prendra son poste de biochimiste au CERAAS pour une période d'un an à partir du mois de mars 1995. Il assurera la programmation des activités dans le domaine de la biochimie de l'adaptation à la sécheresse et l'appui au montage du laboratoire de biochimie.

L'accueil des chercheurs missionnaires débutera avec l'arrivée de Mr K. LABARE (INCV, Togo) pour une étude sur la dynamique d'enracinement du sorgho dans des conditions d'alimentations hydriques différentes. Monsieur N. LORENZO sélectionneur sur légumineuses à l'INTA (Cordoba, Argentine) effectuera une mission dans le cadre des **activités** de modélisation que le CERAAS a débuté avec son programme.

Le développement de l'automate de pesée de feuilles détachées se poursuivra en collaboration avec l'ENSUT {Dakar}. Cette coopération se poursuivra avec la reprise des travaux sur le système **informatique** d'images racinaires.

Un nouveau système de rhizotron est en cours d'étude et le premier prototype sera construit au CERAAS durant ce semestre.

Partenariat, Coopération

Le CERAAS organise à Dakar au début du mois de janvier un atelier (voir annexe) auquel participeront tous les partenaires du projet et des chercheurs des institutions du sud. Cet atelier a pour objectif principal de faire le point des recherches, de programmer les activités et de renforcer la coopération notamment dans le domaine de la formation.

Les négociations entre le CERAAS et l'Université IMO State (Nigeria) ont débuté afin de préparer un protocole d'accord pour la mise à disposition du Dr Marcel NWALOEZIE au CERAAS en tant que biophysicien. Cette mise à disposition s'effectuera sur la base du modèle expérimenté avec le Dr ROY-MACAULEY et devrait être effective avant la fin du prochain semestre.

Les discussions entre la Coopération Française, le CIRAD et la CORAF se poursuivront afin de faire avancer les initiatives en cours pour le renforcement de l'intervention du CIRAD dans ce projet.

Le devis programme pour la première année du projet FED finançant le CERAAS est en cours de discussion afin aboutir à une mise en place rapide de la première phase de financement.

Les négociations en cours avec la FAO et l'AGCD (Belgique) aboutiront durant ce semestre avec des avis définitifs formulés au mois de mars au plus tard.

Durant ce semestre le CERAAS participera aux assemblées générales du R3S et de la CORAF au cours desquelles des exposés seront faits notamment sur les mécanismes institutionnels originaux développés par le projet à l'échelle régionale.

TABLEAU : CHERCHEURS EN MISSION AU C.E.R.A.A.S. EN 1994

CHERCHEURS	PLANTE/OBJET	INSTITUTION	PAYS	PERIODES
Boulfroy E.	Niébé	ENSAM, Montpellier	France	Mai-Sept
Beyaloum N.	Arachide	ENCR Bambey	Sénégal	Juin-Oct.
Laouormadji K.	Arachide	ENCR Bambey	Sénégal	Juin-Oct
Netoyo L.	Partenariat	R3S Bamako	Mali	Mars Juillet Novembre
Sautereau O.	Arachide	ISTOM Cergy-Pontoise	France	Juil-Oct.
Ndour C.	Etude	ENSA Thiès	Sénégal	Août-Sept.
Konan Konan J.	Formation	Stat. Marc Delorme	Côte d'Ivoire	Octobre
Labare K.	Sorgho	INCV Lome	Togo	Déc-Janv 95
Guissard R.	Modélisation	ULB Bruxelles	Belgique	Décembre
Sène Modou	Arachide	ISRA Kaolack	Sénégal	Mars-Mai
Sène Manièvel	Sorgho	ISRA Bambey	Sénégal	Juil-Sept.
Ndiaye M.	Gliciridia, . . .	ISRA Bambey	Sénégal	Nov-Fév , 95

Bibliographie

- Annerose D., Cornaire B., 1994.** Approche physiologique de l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées pour l'amélioration de la production en zones sèches. "Bilan Hydrique Agricole et Sécheresse en Afrique Tropicale". 137-150.
- Annerose D., Diagne M., 1994.** les modèles de cultures : des outils de la recherche et du développement. Arachide Infos N° 5 septembre 1994, 5-11.
- Annerose D., Netoyo L., 1994.** Rapport de mission en Sierra Leone. Doc CERAAS, 5 p + annexes.
- Beyaloum N., 1994.** Etude comparative du développement agrophysiologique de cinq variétés d'arachide (*Arachis hypogea* L.) cultivées au Sénégal durant des deux premières phases de leur cycle en vue d'alimenter en données le modèle ARABHY. Mémoire de fin d'études, ENCR, 26 p.
- Boulfroy E., 1994.** Analyse écophysologique et agronomique des perspectives d'amélioration de la production de semences de niébé au Sénégal. Mémoire de fin d'études, ENSAM, 46 p et annexes.
- CIRAD, 1994.** Adapter les plantes à la sécheresse. "Images de la Recherche". 66-69.
- Guissard R., 1994.** Rapport de stage effectué au CERAAS. Doc. CERAAS, 4 p
- Konan Konan J. L., 1994.** Amélioration pour l'adaptation des plantes à la sécheresse : quelques méthodes d'étude physiologique. Doc. CERAAS, 18 p.
- Labare K., 1994.** Réponses génotypiques du sorgho (*Sorghum bicolor* L. Moench) à un déficit hydrique : développement du système racinaire. Doc. CERAAS, 14 p + annexes.
- Laouormadji K., 1994.** Modélisation des cultures. Application du modèle ARA.B.HY au suivi de la campagne arachidière 1994 : cas de la région de Diourbel au Sénégal. Mémoire de fin d'études, ENCR, 43 p + annexes.
- Marone E., 1994.** Etudes des relations hydriques entre le sol et la plante chez l'arachide pour une meilleure définition des concepts de sécheresse et de stress hydrique. Mémoire probatoire, 53 p.
- Ndour C., 1994.** Le CERAAS de Bambey : Etude du fonctionnement d'un laboratoire de recherche. Doc. CERAAS, 11 p.
- Netoyo L., 1994.** Appui institutionnel pour la mise en place de la phase de renforcement du CERAAS. Doc. CERAAS,
- Panne F., 1994.** Rapport d'activités. Doc. CERAAS, 14 p.
- Sautereau O., 1994.** Suivi du bilan hydrique et du développement agrophysiologique de cinq variétés d'arachide (*Arachis hypogea* L) en vue

d'alimenter en données nouvelles le modèle de croissance Ara.B.Hy. Doc
CERAAS, 22 p + annexes.

Annexe

Atelier

Stratégies et méthodologies pour l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées

Organisateur : Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (CERAAS), Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA).

Lieu : Dakar (Sénégal)

Date : du 10 au 12 janvier 1995

Objectifs :

Cet atelier a pour objectif principal d'organiser les activités du dispositif scientifique que constituent les différentes équipes de recherche partenaires du projet *“Physiologie de l'adaptation à la sécheresse et création variétale pour les régions sèches”*. Ce projet est financé par l'Union Européenne dans le cadre du programme STD3 de la DGXII.

A partir de l'établissement d'un état des connaissances dans le domaine considéré l'atelier permettra aux partenaires d'organiser et de planifier la gestion des ressources scientifiques, techniques et humaines mises en oeuvre dans ce projet.

La participation des représentants d'équipes de recherche des SNRA membres de la CORAF et du CILSS contribuera à ce que les propositions formulées prennent bien en compte les différentes problématiques rencontrées.

Programme :

08/01-09/01 Arrivée et accueil de participants

10/01

- 09 00 : Ouverture
- 1000: Sécheresse et photosynthèse. Présentation des recherches (Prof. Lannoye, Université Libre de Bruxelles, Belgique)
- 1045: Discussions
- 1115: Relations hydriques et adaptation à la sécheresse (Dr Maria Do Ceu **Matos**, E.A.N., Portugal)
- 12 00 : Discussions
- 12 30 : Pause
- 14 30 : Aspects cellulaires de l'adaptation à la sécheresse (Dr Anh Pham Thi, Université Paris 7)

- 1600:** Biologie moléculaire appliquée à l'adaptation à la sécheresse (Dr Yasmine **Zuily**, **Université Paris 7**)
- 11/01**
- 09 00:** Approche de l'adaptation à la sécheresse en zones sèches (Dr D. Annerose, **CERAAS/Cirad**)
- 10 00:** Discussions
- 1030:** Pause
- 1100:** Perspectives pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse (Prof. **Vieira da Silva**, **Université Paris 7**)
- 1200:** Discussions
- 1230:** Pause
- 1430:** Régionalisation de la recherche en zones sèches (Dr **L. Netoyo**, **CILSS/IN.SAH.**)
- 1500:** Discussions
- 1530:** Pause
- 1600:** Union Européenne : Programme STD (Mr **Darthenucq**, **DGXII**)
Programmes FED (Mr **Lefèvre**, **FED Dakar**)
- 12/01**
- 07 30 :** Départ pour le **CERAAS**
- 09 00 :** Visite des installations
- 1000:** Pause
- 1100:** Groupes de travail : Gestion des ressources
Projets en cours
- 1230:** Pause
- 1430:** Discussions et recommandations
- 1600 :** Départ du **CERAAS**

13/01-14/01 Départ des participants



Pour tout renseignement complémentaire contacter le **CERAAS**

Tél. : (+ 221) 73 61 97 / 73 60 50 / 73 60 51

Fax : (+221) 73 61 97 / 73 60 52 / 21 18 79

**Laboratoire de Biochimie et Physiologie
de l'Adaptation végétale
Université Paris 7 Denis Diderot**

Rapport annuel 1994

Aspects cellulaires et moléculaires de la résistance à la
sécheresse chez les légumineuses tropicales

**Responsable : Dr. Yasmine ZUILY-FODIL
(Physiologiste)**

Décembre 1994

**ASPECTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE
LA RESISTANCE A LA SECHERESSE
CHEZ LES LEGUMINEUSES TROPICALES**

**RAPPORT ANNUEL
Décembre 1994**

Contrat Communauté européenne TS3-CT93 0215

“Physiologie de l’adaptation à la sécheresse
et création. variétale pour les régions sèches”

* * *

Laboratoire de **Biochimie** et Physiologie
de l'**Adaptation** végétale
Université Paris 7 Denis Diderot
2, Place Jussieu, case 70 19
7525 1 Paris Cedex 05,
France

RESISTANCE .A LA SECHERESSE CHEZ LES LEGUMINEUSES
TROPICALES
- ASPECTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES -

* * * *

Les recherches sont effectuées au Laboratoire **de** Biochimie et Physiologie de
l'Adaptation végétale

Université **Paris** 7 Denis Diderot, case **70** 19,
2, Place Jussieu
75251 Paris Cedex **05**
tel 33-1-44276065
fax : 33-1-40517108

Participants au programme :

Membres permanents :

Vieira da Silva J., Professeur,
Zuily-Fodil Y., Maître de conférences,
Lameta d'Arcy A., Maître de conférences,
Ferrari-Iliou R., Maître de **conférences**,
Pham Thi A.T., Chargée de recherches **CNRS**,
Gareil M., Ingénieur de **recherche**,
Tashakorie A., technicienne,

Etudiants en stage pst-doctoral et en thèse :

Repellin A., stage post-doctoral
Sahsah Y ., stage post-doctoral
El-Maarouf **H.**, thèse de **doctorat**.

RESULTATS SCIENTIFIQUES

I - RAPPEL DES THEMES DE RECHERCHE

Dans le cadre du programme TS3-CT93-021, le Laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation végétale de l'Université Paris 7 a pour principales missions :

1) les recherches fondamentales ayant pour objectif la compréhension des mécanismes biochimiques et moléculaires de l'adaptation à la sécheresse de plantes tropicales, afin de proposer de nouveaux critères et techniques utilisables pour les créations variétales, en vue de l'amélioration de la production de plantes alimentaires dans les régions où le rendement est limité par la sécheresse ;

2) le transfert de technologie vers les pays du Sud, qui se fera par l'intermédiaire du CERAAS, où seront mis en oeuvre des projets de recherche utilisant en conditions réelles les meilleures acquisitions scientifiques des partenaires d-es pays du Nord, avec leur participation active, ayant comme objectif la création variétale de plantes performantes et tolérantes à l'aridité

Les plantes utilisées (*Vigna*, *Phaseolus*) ont été choisies suivant deux critères l'intérêt agronomique pour les -pays: subissant la sécheresse et la possibilité d' utiliser ces plantes comme modèle expérimental.

Ce programme fait suite à celui financé par STD2 (contrat TS2-A0101-MCD). Un bref rappel des principaux résultats obtenus par notre laboratoire au terme du programme précédent permettra de mieux situer les recherches actuellement en cours

Il a été montré que la tolérance au niveau membranaire constitue une composante essentielle de la résistance des plantes au déficit hydrique . **Une corrélation très significative** a été trouvée **entre la teneur en lipides membranaires et la tolérance cellulaire au déficit hydrique**, les cultivars les plus tolérants étant ceux qui possèdent le moins de lipides.

En outre, les processus dégradatifs provoqués par la sécheresse sont plus importants chez les plantes sensibles : **protéolyse, hydrolyse et peroxydation des lipides membranaires**. **La capacité de résister aux phénomènes de dégradation confère donc à certaines variétés une stabilité membranaire qui peut constituer un avantage adaptatif certain**

De plus, les résultats obtenus par notre laboratoire dans le cadre du projet financé par STD2, ont conduit à la production de variétés déjà en cours d'expérimentation depuis quelques années dans les essais régionaux, variétés devant être prochainement certifiées (Sénégal et Brésil). La démarche choisie s'étant révélée **fructueuse**, elle est donc poursuivie dans le cadre de ce projet.

L'agronomie moderne s'oriente de plus en plus vers l'obtention de plantes transgéniques, c'est-à-dire de plantes dans lesquelles une information génétique a été introduite, par des techniques de biologie moléculaire.

Les manipulations génétiques sur les plantes ont jusqu'à présent porté sur des caractères monogéniques, codant par exemple pour une couleur de fleurs, une résistance à un herbicide ou à un pathogène, ou contrôlant une étape précise de la voie de biosynthèse d'un composé à intérêt économique (une protéine ou un acide gras). Il est évident que transformer une plante pour un phénomène physiologique complexe tel que l'adaptation à la sécheresse peut sembler une entreprise hasardeuse. Cependant, des travaux récents de l'équipe de Murata (Nature 356: 710-714, 1992), qui a réussi à obtenir des plantes transgéniques résistantes au gel, par modification d'un seul gène impliqué dans la biosynthèse des acides gras, démontrent que l'entreprise n'est pas impossible.

Nos recherches sur l'implication des lipides membranaires dans la résistance à la sécheresse ont montré, chez de nombreuses espèces, une **relation entre résistance cellulaire à la sécheresse et la dégradation du 18:3-MGDG (monogalactosyl-diacylglycérol)**. Il s'agit d'un galactolipide polyinsaturé, contenant plus de 90% d'acide α -linoléique (Cl 8:3), et principal constituant lipidique des membranes chloroplastiques. Ce lipide est particulièrement sensible aux dégradations hydrolytiques et peroxydatives induites par le déficit hydrique. **Plus la plante est sensible, et plus la dégradation de ce lipide est importante**. Nous avons réussi à purifier l'enzyme responsable de cette dégradation (Sahsah et al., 1994, voir annexes): il s'agit d'une galactolipase non spécifique, puisqu'elle

attaque aussi les phospholipides ; nous la nommerons donc : **lipolytic acyl-hydrolase (LAH)**

Nous avons proposé comme programme pour STD3 le séquençage du gène de la LAH, l'étude de la régulation de son expression chez des cultivars sensibles et résistants de Niébé, soumis à des traitements de sécheresse plus ou moins sévères. Dès que la connaissance du gène de la LAH sera suffisante, la transformation des plantes sera tentée, soit par stratégie anti-sens, soit par **contrôle** du promoteur.

Un deuxième **thème** de notre programme concerne **les phénomènes de lipoperoxydation**

La peroxydation non enzymatique des lipides insaturés sous l'action des espèces activées de l'**oxygène** ayant fait l'objet des travaux référencés **précédemment** et cités dans ce rapport, nous nous **proposons** maintenant d'aborder les phénomènes de peroxydation enzymatique par l'étude des **Lipoxygénases** cytosoliques et/ ou chloroplastiques.

De plus, il existe de nombreux systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène et des radicaux libres qui agissent en cascade dans les **différents** compartiments cellulaires et en particulier chloroplastique : Superoxyde dismutase, Ascorbate **peroxydase**, Monohydro- et dehydro-ascorbate **réductases**, Glutathion réductase. Les gènes codant pour ces enzymes sont déjà **séquencés et clonés** dans différentes plantes en particulier le Soja. Il sera donc intéressant de cribler notre banque **d'ADNc** par les sondes correspondant à certains de ces gènes pour voir leur présence dans le *Vigna* et leur expression sous l'**effet** de la contrainte hydrique.

L'ensemble des travaux sur les enzymes marqueurs permettra grâce à l'immunologie et à la biologie **moléculaire** de mettre au point des tests de criblage rapides et fiables, ainsi que d'envisager la transformation génétique des plantes.

2 - RESULTATS OBTENUS AU COURS DE L'ANNEE 1994

2.1. Effet de la sécheresse sur l'activité de la LAH

Trois cultivars de Niébé , EPACE-1, IT-83D, résistants, et I 183, sensible, ont été cultivés en conditions de culture contrôlées et soumis à un traitement de sécheresse. La dégradation enzymatique des principaux galactolipides membranaires, MGDG et DGDG, a été mesurée dans la fraction soluble et la fraction membranaire des extraits foliaires. Les résultats ont été présentés au 11^{ème} Congrès International des Lipides végétaux (Paris, Juillet 1994, voir annexes). Ils montrent que les activités galactolipasiques augmentent avec le déficit hydrique, d'autant plus intensément que le cultivar est sensible. Chez 1183, après un maximum atteint vers -1.2 MPa dans le cas de la forme soluble de la MGDG-LAH, on observe une diminution brutale, dûe probablement à une altération des structures chloroplastiques. Chez les 2 cultivars résistants, par contre, l'augmentation d'activité ne commence que vers -1.0 à -1.2 MPa et se maintient jusqu'aux déficits les plus sévères (- 1.7 MPa). En ce qui concerne les formes membranaires des MGDG- et DGDG-LAH, l'augmentation des activités enzymatiques reste modérée chez les cultivars résistants , même pour les potentiels hydriques les plus bas. Par contre, chez le cultivar sensible, une augmentation de plus de 500% a été enregistrée,

2.2 - Biologie moléculaire de la LAH

L'isolement et le séquençage de l'ADN complémentaire qui code pour la LAH est une entreprise à long terme, dont les résultats ne peuvent être présentés d'une façon fragmentaire

Néanmoins, nous avons d'ores et déjà, au cours de cette première année, réalisé un certain nombre d'étapes :

- * Réalisation de la banque d'ADN complémentaires des ARN extraits à partir de feuilles de *Vigna unguiculata*
- * Microséquençage d'une sous-unité de la protéine ; la séquence d'acides aminés obtenus en NH₂ terminal nous a permis d'obtenir les oligonucléotides qui ont été utilisés comme sondes pour cribler la banque d'ADNc dont l'analyse des clones est en cours

2.3 - Étude de la dégradation oxydative des lipides insaturés

La mise au point d'un système original a permis de suivre *in vitro* la peroxydation des lipides provenant d'extraits de plantes grâce à un système générateur d'oxygène singulet. Les résultats obtenus sont décrits dans les rapports du contrat STD 2. Ils ont permis de montrer que les extraits lipophiles totaux de feuilles sont plus sensibles à la peroxydation s'ils proviennent de plantes sensibles au déficit hydrique, tels que *Phaseolus vulgaris* cv. Carioquinha que s'ils proviennent de plantes résistantes, telles que *Vigna unguiculata* cv. EPACE (Ferrari-Iliou et al., 1994, voir annexes)

Le travail suivant (Lameta-d'Arcy et al., publication soumise, voir annexes) permet de préciser le rôle des pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) dans la dégradation oxydative des lipides insaturés induite par des espèces activées de l'oxygène observés *in vitro* puis de les relier avec les compositions précises de ces pigments déterminées dans les plantes.

Des extraits lipophiles totaux de feuilles de *Phaseolus vulgaris* cv. Carioquinha provenant soit de plantes témoins soit soumises à une sécheresse moyenne (S1) ou sévère (S2) ont été peroxydés. Un délai de 3 h est observé entre le début de la réaction et l'apparition des motifs diéniques conjugués, délai qui n'apparaît pas au cours de la peroxydation d'acide linoléique pur. Ce délai peut être expliqué par la présence des pigments photosynthétiques.

Cependant, après ces 3 h, plus la plante d'origine est sèche, plus la vitesse de peroxydation de extraits lipophiles totaux est rapide. Nous avons donc cherché si la nature des différents pigments photosynthétiques pouvait jouer un rôle.

L'étude de l'évolution de ces pigments au cours des 90 premières minutes d'irradiation dans la cuve de peroxydation montre que **la chlorophylle a disparaît plus rapidement que la chlorophylle b et les caroténoïdes.**

Par la suite, la composition et les teneurs en pigments photosynthétiques et en particulier la répartition des caroténoïdes a été réalisée par une technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur des extraits de plantes témoins, S1 et S2. Les plantes S2 se caractérisent par une forte diminution de tous les pigments avec des variations importantes des pourcentages des caroténoïdes par rapport aux plantes témoins. Les carotènes diminuent

pendant que les xanthophylles augmentent, parmi ces dernières, on peut observer **l'apparition de nouvelles molécules, anthéroxanthine** chez la plante S1 et anthéroxanthine et **zéaxanthine** chez la plante S2. Avec la violaxanthine, ces molécules font partie du cycle des xanthophylles dont l'existence a été mise en évidence dans les plantes soumises à des contraintes de l'environnement (en particulier lumineuses).

Les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* ont amené plusieurs conclusions et hypothèses.

. Dans le cas de plantes soumises à la sécheresse, les faibles différences de composition des pigments observées entre S1 et S2 n'expliquent pas les différences dans les taux de peroxydation lipidique observés *in vitro*, nous avons donc formulé l'hypothèse que la composition lipidique et en **particulier** la balance entre les classes principales de lipides polaires (phospholipides et galactolipides) pourrait jouer également un rôle dans la sensibilité des extraits **lipophiles** totaux à la **photoperoxydation**.

« Si l'apparition de l'anthéroxanthine et de la zéaxanthine chez des plantes soumises à des contraintes lumineuses a été **souvent** signalée, peu d'auteurs l'ont observée dans des plantes soumises à la sécheresse.

Nous postulons donc **que** ces xanthophylles et en particulier la zéaxanthine pourraient être impliquées dans la protection et la stabilisation des lipides membranaires des thylacoïdes. Ceux-ci, à **l'inverse** des photosystèmes, **possèdent** peu de protection contre les phénomènes peroxydatifs engendrés par un excès d'espèces activées de l'oxygène présentes dans les **chloroplastes** à la suite d'une contrainte hydrique.

PUBLICATIONS 1994

FERRARI-ILIOU R., d'ARCY-LAMETA A., PHAM THI A.T., LEMOINE Y., ZUILY FODIL Y. (1994) Drought-sensitivity of tropical bean : Involvement of reactive oxygen species and role of carotenoids. C.R. Soc. Biol., 1 SS, 303.

SAHSAH Y., PHAM THI A.T., ROY-MACAULEY H., D'ARCY-LAMETA A., ZUILY FODIL Y. (1994) Purification and characterization of a soluble lipolytic acylhydrolase from Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves. Biochim. Biophys. Acta, 1215 : 66-73

FERRARI-ILIOU R., D'ARCY-LAMETA A., PHAM THI A.T., ZUILY-FODIL Y., MAZLIAK P. (1994) Effect of drought on photodynamic peroxidation of leaf total lipophilic extracts. Phytochemistry, 37 : 1237-1243.

PHAM THI A.T., SCOTTI CAMPOS P., ZUILY-FODIL Y., ROY-MACAULEY H , VIEIRA DA SILVA J. Correlation between leaf polar lipids and plant membrane resistance to osmotic stress, a hypothesis on the role of monogalactosyl diacylglycerol containing linoleic acid in drought tolerance. (Soumis).

ROY-MACAULEY I-I., ZUILY-FOIDIL Y., SAHSAH Y., REPELLIN A., PHAM THI A.T., D'ARCY-LAMETA A. Endoproteinases involved in drought tolerance processes of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris*. (Soumis).

d'ARCY-LAMETA A., FERRARI-ILIOU R., PHAM THI A.T., LEMOINE Y., ZUILY FODIL Y. Involvement of photosynthetic pigments in total lipophilic leaf extract sensitivity to photoperoxidation. (Soumis).

PARTICIPATION A DES 'CONGRES ET COLLOQUES
--

PHAM TE-II A.T , SAHSAH Y., ROY-MACAULEY H., d'ARCY-LAMETA A., ZUILY-FODIL Y. (1994) Purification of a soluble MGDG-acyl-hydrolase from Cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves. 1 lth International Meeting on Plant Lipids, Paris.

CAMPOS P., PHAM THI A.T. (1994) Effects of drought stress on enzymatic breakdown of galactolipids in Cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves. 1 lth International Meeting on Plant Lipids, Paris.

d'ARCY-LAMETA A., FERRARI-ILIOU R., PHAM THI A.T., ZUILY FODIL Y. (1994) Peroxydation lipidique et photosynthèse. Université P. et M. Curie, 3èmes Journées des Sciences de la Vie.

d'ARCY-LAMETA A., FERRARI-ILIOU R., PHAM THI A.T., TASHAKORIE A., ZUILY FODIL Y. (1994) Drought-increased sensitivity of leaf total lipophilic extracts to photoperoxidation. Involvement of photosynthetic pigments. 2ème colloque général de la société Française de Physiologie Végétale, Saint Malo (France).

FERRARI-ILIOU R. (1994) Implication des pigments photosynthétiques dans la sensibilité à la photoperoxydation des lipides polaires . Journée CERLIB du 16 Décembre 1994 sur Le Stress oxydant chez les Plantes .

STAGES ET VISITES DE PARTENAIRES

J M. **LACAPE** (CERAAS, Senegal) : 27 Mai 1994 : visite du laboratoire, discussion sur son projet de thèse.

P SCOTT1 **CAMPOS** (EAN, Oeiras, Portugal) : du 31 Mai 1994 au 3 Juillet 1994 : :

- mesure des activités galactolipasiques (**MGDG** et **DGDG**) en fonction de la sécheresse sur 3 cv. de *Vigna unguiculata* : **Epace**, **IT83D** et **1183**.

- Préparation du congrès international des lipides végétaux (Paris, 26/6 au 2/7/1994)

F. **VAN ECKEN** (ULB, Belgique) : du 4 au 8 Juillet 1994 :

Analyse des lipides de feuilles de **Maïs** soumis à un traitement de sulfite, en milieu basique ou acide

D. **ANNEROSE** (CERAAS) : 16 Décembre 1994 : Echanges et coordination de programme.

ANNEXES

SAHSAH Y., PHAM THI A.T., ROY-MACAULEY H., D'ARCY-LAMETA A., ZUILY-FODIL Y. (1994) Purification and characterization of a soluble lipolytic acylhydrolase from Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves. Biochim. Biophys. Acta, 1215 : 66- 73.

FERRARI-ILIOU R., D'ARCY-LAMETA A., PHAM THI A.T., ZUILY-FODIL Y., MAZLIAK P. (1994) Effèct of drought on photodynamic peroxidation of leaf total lipophiiiç extracts. Phytochemistry, 37 : 1237-1243.

d'ARCY-LAMETA A., FERRARI-ILIOU R., PHAM THI A.T., LEMOINE Y ., ZUILY-FODIL Y. Involvement of photosynthetic pigments in total lipophilic leaf extract sensitivity to photoperoxidation. (Soumis).

C AMPOS P ., PHAM THI A.T. (1994) Effects of drought stress on enzymatic breakdown of galactolipids in Cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves. 1 lth International Meeting on Plant Lipids, Paris.



Purification and characterization of a soluble lipolytic acylhydrolase from Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves

Yamina Sahseh, Anh Thu Pham Thi ^{*1}, Harold Roy-Macauley, Agnès d' Arcy-Lameta, Anne Repellin, Yasmine Zuily-Fodil

Laboratoire Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale, Université Paris 7 Denis Diderot, 2 Place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 05, France

Received 15 April 1994

Abstract

With the use of [¹⁴C]monogalactosyl diacylglycerol as substrate for enzymatic test, a lipolytic acylhydrolase (EC 3.1.1.26) was purified 263-fold with a yield of 2.0% from soluble leaf extract of *Vigna unguiculata* L. cv. EPACE-1. The procedure involved ammonium sulfate precipitation, Q-Sepharose Fast Flow chromatography, gel filtration on Sephacryl 300 HR and chromatofocusing on Mono-P followed by a semi-preparative electrophoresis on polyacrylamide gel. The purified enzyme had a molecular mass of about 80 kDa, as determined by gel filtration. On SDS-PAGE, it showed a single band corresponding to a molecular mass of 40 kDa. The isoelectric point of the enzyme was estimated to be 5.0–5.1 by isoelectric focusing and chromatofocusing. The K_m value was 0.119 mM for monogalactosyl-diacylglycerol. The hydrolytic activity of the enzyme on different substrates was determined: the relative rates were digalactosyl-diacylglycerol > monogalactosyl-diacylglycerol > phosphatidylcholine > phosphatidylglycerol. For all substrates, the products of hydrolysis were free fatty acids. Triacylglycerols were not hydrolysed. The enzyme was activated by calcium but was not calcium-dependent. Experiments concerning the enzyme stability as affected by temperature and pH demonstrated that it was quite stable.

Keywords: Acylhydrolase; lipolytic; Galactolipase; Phospholipase; Cowpea

1. Introduction

In plants, membrane lipids have been found to play an essential role in the maintenance of the cell integrity and functioning, especially under harsh environmental conditions like heat, cold, salinity or water deficit (see Refs. [1–4]). Plants are able to adapt to these unfavourable surroundings thanks to a particular composition of their membrane lipids, or thanks to a capacity to modify them in order to render them more resistant. However, when the

stress becomes too harmful, homeostasis could no more be maintained and misfunctionings occur in the cell metabolism.

Decreases in polar lipid content have been observed during senescence [5–7] and under various stresses like heat [8], cold [9,10], and water deficit [11–14]. These variations are mainly due to activation of lipolytic enzymes, particularly phospholipases and galactolipases.

Unlike plant phospholipases D and C, very few reports exist on plant galactolipases and non specific acylhydrolases which remove fatty acids from galactolipids, even though the latter are the most abundant of lipids in plants, found in high concentrations in the chloroplasts.

Under stressful conditions, galactolipids, in particular monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) and digalactosyl-diacylglycerol (DGDG), are rapidly hydrolysed. The presence of galactolipase activities has been demonstrated in green leaves and in isolated cell organelles [15–20]. The products of lipolytic enzyme degradation inhibit several physiologic functions [21,22]. Endogenous galactolipases thus play an important role in leaf metabolism.

Abbreviations: CAPS, 3-[cyclohexylamine]-1-propanesulfonic acid; CHES, 2-[N-cyclohexylamine]ethanesulfonic acid; DGDG, digalactosyl-diacylglycerol; DTT, DL-dithiothreitol; FA, fatty acid; kDa, kilodaltons; IEF, iso-electrofocusing; LAH, lipolytic-acylhydrolase; MES, morpholinethane sulfonic acid; MGDG, monogalactosyl-diacylglycerol; MW, molecular weight; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycerol; pI, isoelectric point; PMSF, phenylmethane sulfonyl fluoride; PVP, polyvinyl pyrrolidone; TAG, triacylglycerols; TLC, thin-layer chromatography.

^{*} Corresponding author. Fax: +33 1 40537108.

¹ CNRS, URA 1180.

Attempts for purifying galactolipases and non specific lipolytic acylhydrolases are found in literature [23–31]. Except the work of Burns, Galliard and Hatwood [28], who have separated two distinct hydrolases from leaves of *Phaseolus multiflorus*, one with galactolipase activity, the other with phospholipase activity, in all reports, a unique enzyme has been isolated, which appeared to be a non-specific acylhydrolase, acting on galactolipids as well as on phospholipids. However, results concerning the other characteristics of this non-specific lipolytic-acylhydrolase (LAH) were contradictory: in particular, its molecular mass was found to vary from 40 kDa [31] to 110 kDa [23]; its isoelectric point from 4.4 [30] to 7.0 [23].

In most reports, the enzyme was only partially purified [24–26,28], and in those where the authors claimed to have the pure enzyme, the *in situ* enzymatic test after polyacrylamide gel electrophoresis, was a measure of esterase activity [27,29–31].

Surprisingly, since the late work of Matsuda and Hayama in 1979 [32], no recent report on purification of plant galactolipases or lipolytic acyl hydrolases was found in literature, despite the great development of interest in the field of stress and senescence.

In the present study, we have purified a LAH from soluble extracts of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves and determined some of its biochemical properties.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Experiments were performed using a cultivar of *Vigna unguiculata* (L) Walp, EPACE-1, originating from Brazil. The plants were grown in a greenhouse, in pots of diameter 9 cm, in a mixture of vermiculite and peat, under temperature controlled conditions (22°C during the day and 19°C at night), as previously described [33]. They were used for experiments when 5-weeks old, with 3 fully-expanded mature leaves and 2 young leaves.

2.2. Preparation of substrates for enzymatic assays

The substrates used in this work: MGDG, DGDG, PG, PC and TAG were prepared from young leaves (4th and 5th leaves, counting from the cotyledons) of the same plants described above. The leaf lipids were radioactively labelled with [¹⁴C]acetic acid, sodium salt (CEA, France, specific activity 1.85 GBq.mmol⁻¹) and extracted in chloroform/methanol/water following Allen and Good [34]. Lipid classes were separated by thin-layer chromatography on silica-gel plates (Merck G-60), using the solvent systems proposed by Lepage [35] and Mangold [36]. Lipids were visualized under UV, scraped off and eluted from silica-gel. Details of the methods are described in [19]. The fatty acid composition of the different lipid substrates was determined by gas chromatography and the radioactivity

incorporated in fatty acids was counted after separating them following their degree of unsaturation on activated silica-gel containing silver nitrate, as described in [37].

2.3. Assay for galactolipase activity

[¹⁴C]MGDG, prepared from Cowpea leaves as described in the previous paragraph, was used as substrate in routine assays for galactolipase activity. The substrate (350 Bq, 65 nmol) was dried under a stream of nitrogen and dissolved in 50 µl methanol containing 0.4% Triton X-100 (w/v). This mixture was brought to a final volume of 150 µl by adding 0.1 M MES buffer (pH 6.0). Emulsification was ensured by sonication at room temperature for 15 min (Sonicator W-10, Sonica, NY).

The enzyme assay mixture consisted of the substrate preparation described above (150 µl) and 200 µl enzyme solution containing 5 mM CaCl₂. After 3 h of incubation in a waterbath at 30°C, the reaction was stopped. The products resulting from enzymatic degradation were separated by TLC on silica-gel plates as described by El-Hafid et al. [19]. Radioactivity of the free fatty acids band was measured using a liquid scintillation analyzer (Packard 1600CA).

2.4. Extraction of leaf-soluble enzyme

Fresh leaves (300 g) frozen in liquid nitrogen were homogenized in 1000 ml extraction buffer: 0.1 M MES-NaOH, pH 6.5 containing 10 mM DTT, 1 mM cystein, 5 mM sodium metabisulfite, protease inhibitors (0.5 mM PMSF, 0.5 mM benzamidine, 1 µM pepstatin A) and 10% glycerol (v/v), using a mortar and pestle. 2% insoluble PVP (w/v) was added just before homogenization.

The homogenate was filtered through a layer of monyl (64 µm pore size) and centrifuged at 39000 x g for 30 min (Beckman J2-21 M/E). The resulting supernatant was acidified to a pH of 5.1 with 1 M HCl, and the precipitated membranes of the different organelles were sedimented by centrifugation under the same conditions described above. The pH of the supernatant resulting from this centrifugation was increased to 6.5 and corresponded to the crude extract.

2.5. Purification

Step 1: Ammonium sulfate precipitation

Ammonium sulfate was added to the crude extract to a concentration of 80% saturation. The mixture was left stirring for 12 h at 4°C. The precipitated protein was centrifuged at 27000 X g for 15 min. The sediment was resuspended in a limited volume of buffer A (10 mM Tricine (pH 8.0), 0.5 mM DTT, 0.1 mM cystein, 0.5 mM sodium metabisulfite, 10% glycerol (v/v), and protease inhibitors as in the extraction buffer). Undissolved material was removed by centrifugation under the same conditions.

Step 2: Desalting

The clear yellow supernatant resulting from step 1 was desalted on a Sephadex G-25 column (2.5 x 100 cm, Pharmacia, Uppsala, Sweden), equilibrated with buffer A. The protein was eluted at a flow rate of 1.3 ml.min⁻¹ using the same buffer. The protein peak was collected and assayed for enzymatic activity.

Step 3: Ion-exchange chromatography

Using an FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia) system, the protein fraction was applied at a flow rate of 5.3 ml.min⁻¹, to a Q-Sepharose Fast Flow column (2.6 x 15 cm, Pharmacia), equilibrated with buffer A. The column was washed, and bound proteins were eluted by a NaCl gradient of 0-1 M NaCl in the same buffer. Fractions were collected every 2 min, and then assayed for enzymatic activity.

Step 4: Gel filtration

The active fractions obtained from the preceding step were pooled and concentrated. The concentrated protein solution (4 ml) was then applied, at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ using a peristaltic pump, to a Sephacryl HR-300 column (2.6 x 100 cm, Pharmacia), equilibrated with buffer A. Elution was continued at the same flow rate; fractions of 4 ml were collected. The enzymatic activity of fractions was assayed. The column was calibrated using the same separation procedure. Blue dextran marked the void volume, α -amylase (250 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa), were used as molecular weight markers.

Step 5: Chromatofocusing

The active fractions resulting from step 4 were pooled and applied at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹ to a Mono-P column (5 X 20 cm, Pharmacia), equilibrated with 25 mM Bis-Tris buffer (pH 7.1). Chromatofocusing was carried out with 35 ml 10% (v/v) Polybuffer 74-HCl pH 4.0 (Pharmacia). Fractions of 0.5 ml were collected and the enzymatic activities were measured.

Step 6: Semi-preparative polyacrylamide gel electrophoresis

Native-PAGE of the enzyme after chromatofocalisation was performed using a Bio-Rad apparatus (Mini Protean II). The gels were polymerized with concentrations of monomer from 7.5 to 12.5%, with a spacer gel of 4%. Electrophoresis was run with 25 mM Tris-glycine buffer (pH 8.8), at constant current of 20 mA. Bromophenol blue was used as the tracking dye. Test bands of the gel were stained with the Bio-Rad silver nitrate staining kit. By comparison, the colourless bands obtained, were cut up and carefully crushed in buffer A. Cold diffusion for 24 h, followed by centrifugation at 15000 X g for 10 min allowed the precipitation of acrylamide. The supernatants were collected and their enzymatic activity tested.

2.4. Analytical polyacrylamide gel electrophoresis

Analytical native and SDS-PAGE were performed using the PHAST system (Pharmacia). The gels used were ready-for-use Phast gels 10-15. For isoelectric focusing, Phast gels 4-6.5 were chosen. The protein bands were stained with the silver nitrate staining kit (Pharmacia).

2.7. Protein determination

Protein determination was carried out using the Bio-Rad dye reagent based on the method of Bradford [38], with crystalline bovine serum albumin as the standard.

3. Results**3.1. Purification of the enzyme**

Proteins in the crude extract, precipitated by ammonium sulfate were applied to a Sephadex G-25 column (2.6 X 100 cm). This step allowed the removal of salts, small molecules and undesirable material as pigments and phenols. It could also be remarked that a slight increase in the

Table 1
Purification of a soluble MGDG-lipolytic-acylhydrolase from Cowpea leaves

Step	Protein (mg)	Total activity (nmol FA.min ⁻¹)	Specific activity (nmol FA.min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Yield (%)	Purification (-fold)
(NH ₄) ₂ SO ₄	381.8	157.3	0.412	100	
G-25	333.6	167.8	0.503	107	1.22
Q-Sepharose	25.97	36.05	1.388	22.9	3.37
Sephacryl 300	1.30	17.9	13.76	11.4	33.4
Mono-P	0.152	3.92	25.77	2.5	63
Native-PAGE	0.03	3.25	108.3	2.0	263

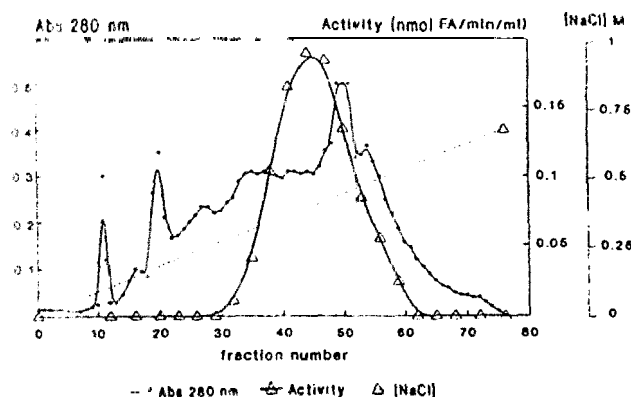


Fig. 1 Elution profile of protein (absorbance at 280 nm) and MGDG-acylhydrolase activity on a Q-Sepharose fast flow column. The enzyme fraction, obtained after ammonium sulfate precipitation and desalted on Sephadex G-25, was loaded on a Q-Sepharose fast flow column (2.5 X 15 cm) at a rate of 5.3 ml.min⁻¹. Round proteins were eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl. Fractions of 10.6 ml were collected and subjected to enzyme assay.

yield of total enzymatic activity was recovered after this step (107%, Table 1), probably due to the elimination of a low molecular weight inhibitor. The resulting fraction was then chromatographed on a Q-Sepharose column. As shown in Fig. 1, the enzyme eluted between fractions 33 and 58. The maximum activity, according to enzyme assay, corresponded to the fractions separating between 0.35 and 0.43 M of the NaCl gradient. Fractions separating within this gradient range were collected and pooled. Up to this point, a 3.37-fold purification was achieved (Table 1).

The pooled fractions were concentrated and further purified on a gel filtration column (Sephacryl 300 HR, Pharmacia).

The fractions (22 to 33) having MGDG-acylhydrolase activity (Fig. 2) were collected and subjected to chromatofocusing (Mono-P, Pharmacia) using pH 4-7 ampholytes. As presented in Fig. 3, the maximum activity, situated between fractions 70 and 90, corresponded to an isoelectric point of 5.0. The protein recovery was low (0.04%), a 63-fold purification of the LAH from the homogenate was achieved, with a yield of 2.5% (Table 1).

SDS-PAGE of the pooled active Mono-P fractions still revealed the existence of several bands (2 major and one minor, results not shown). Attempts to further purify the enzyme using several chromatographic methods (Hydroxylapatite, Bio-Rad; Mono-Q, Pharmacia; Octyl-Sepharose, Pharmacia) did not allow the separation of these bands.

A semi-preparative Native-PAGE electrophoretic step was therefore included in the purification process. After elution of the proteins from the gel, only one of the bands showed galactolipase activity whilst none was detected for the others.

The purity of the active band was tested by SDS-PAGE: only one band of MW = 40000 was visible (Fig. 4). IEF also revealed one unique band, at pI = 5.0 (results not shown). This ultimate step led to a 263-fold purification of

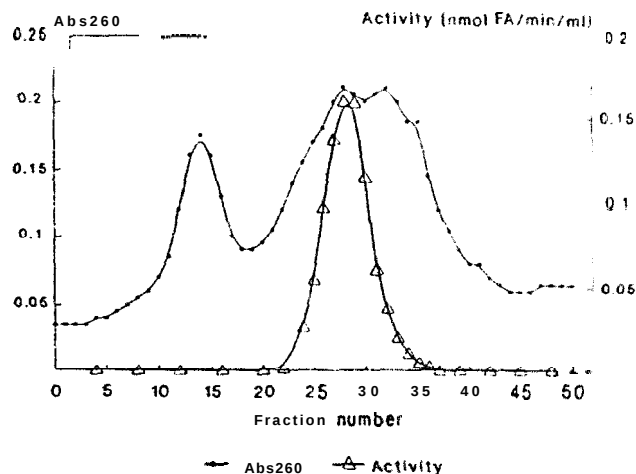


Fig. 2. Elution profile of protein (absorbance at 280 nm) and MGDG-acylhydrolase activity on a Sephacryl 300 HR column. The pooled fractions from the Q-Sepharose column were concentrated and loaded onto a Sephacryl 300 HR column (2.6X 100 cm) at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Fractions of 4 ml were collected and subjected to enzyme assay.

the enzyme from the homogenate of EPACE-1 leaves, with a yield of 2% (Table 1).

3.2. Characteristics of the purified enzyme

Molecular weight

Gel filtration on Sephacryl 300 HR (step 3 in the purification scheme) gave an estimate of the molecular mass of the enzyme. The elution point of the enzyme and those of the reference standards plotted against the logarithms of their molecular masses are shown in Fig. 5. The estimated molecular mass of the enzyme as determined by gel filtration was found to be about 80 kDa. SDS-polyacrylamide electrophoresis of the purified enzyme, as shown in Fig. 4, revealed one band of about 40000

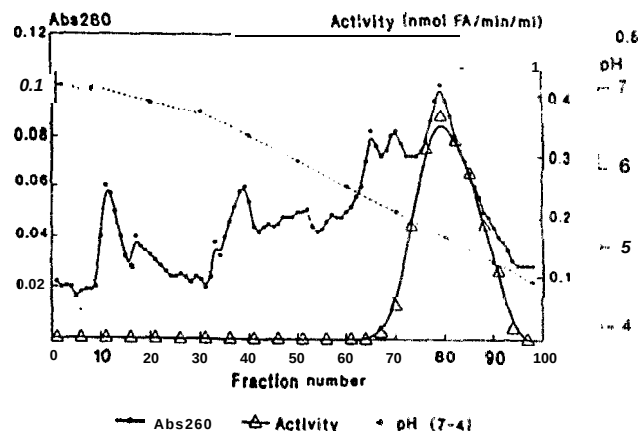


Fig. 3. Elution profile of protein (absorbance at 280 nm) and MGDG-acylhydrolase activity on a Mono-P column. The active fractions from the Sephacryl 300 HR column were subjected to chromatofocusing on a Mono-P column (5 X 20 cm) using ampholytes for the pH range of 4-7. Fractions of 0.5 ml were collected at a flow rate of 0.5 ml.min⁻¹ and were assayed for enzymatic activities.

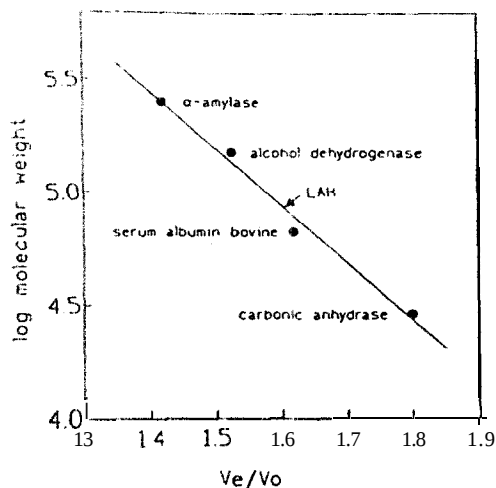


Fig. 4. Determination of the molecular mass of the purified enzyme by gel filtration on a Sephacryl 300 HR column. The enzyme solution was applied to a column (2.6 X 100 cm) of Sephacryl 300 HR at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ and fractions of 4 ml were collected. Void volume was determined with blue dextran. The ratio of elution volume (V_e) to void volume (V_o) was plotted against the logarithm of molecular masses for the marker proteins: α -amylase (250 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa). The arrow indicates the elution position of the MGDG-acylhydrolase.

molecular weight. These observations demonstrated that the Cowpea leaf MGDG-acylhydrolase is a dimer.

Effect of pH

Under the conditions of routine assay, the purified enzyme shows activity at all the pHs tested, with a maximum activity at pH 5.0 (Fig. 6).

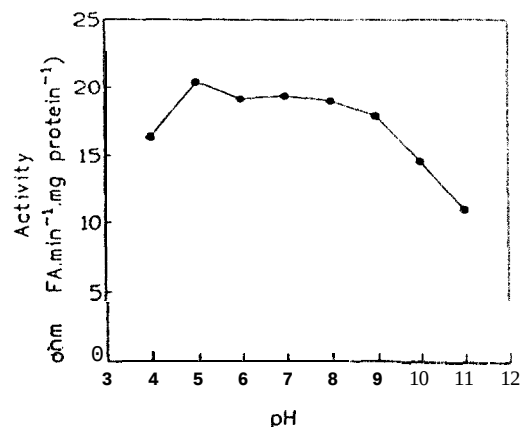


Fig. 6. Effect of pH on the activity of MGDG-acyl hydrolase. The purified enzyme was incubated for 3 h at 30°C in the following buffers: 0.1 M sodium acetate (pH 3.0, 4.0; 5.0), 0.1 mM MES (pH 6.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 M Tricine (pH 8.0), 0.1 M CHES (pH 9.0), 5.1 M CAPS (pH 10.0, 11.0).

Thermal stability of the enzyme

When the enzyme was heated for 10, 30, and 60 min in a waterbath at different temperatures, it was shown that it exhibits a rather high resistance to heat inactivation, being maximally active after 10 min incubation at 50°C. (Fig. 7). At more longer incubation times and higher temperatures, however, the activity of the enzyme began to fall.

Effect of calcium

Practically no effect on the enzymatic activity was observed at calcium concentrations of 1 mM and 5 mM. An increase in activity was observed from a concentration of 50 mM, reaching the maximum at a concentration of 500 mM.

Effect of substrate concentration

The curve relating the acylhydrolase activity and different MGDG concentrations (Fig. 8A) indicates that the

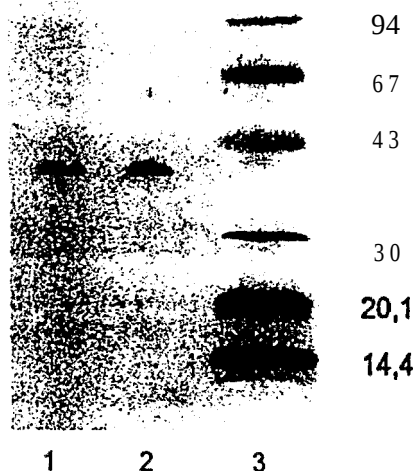


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified MGDG-acylhydrolase from Cowpea leaves. The active protein band from the preparative Native-PAGE was eluted and subjected to SDS-PAGE (see Section 2) and stained with silver nitrate. Lane 1 and 2, purified enzyme; lane 3, standards. Molecular mass (kDa) is indicated on the right.

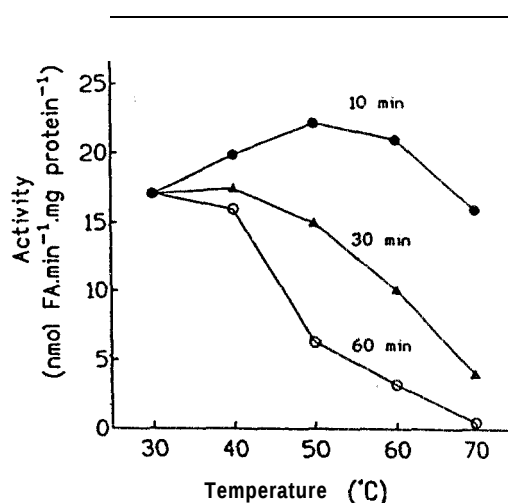


Fig. 7. Thermal stability of the purified MGDG-acyl hydrolase. The enzyme was incubated at various temperatures, for various duration times. Enzymatic activity was then assayed in standard conditions (3 h at 30°C, pH 6.0).

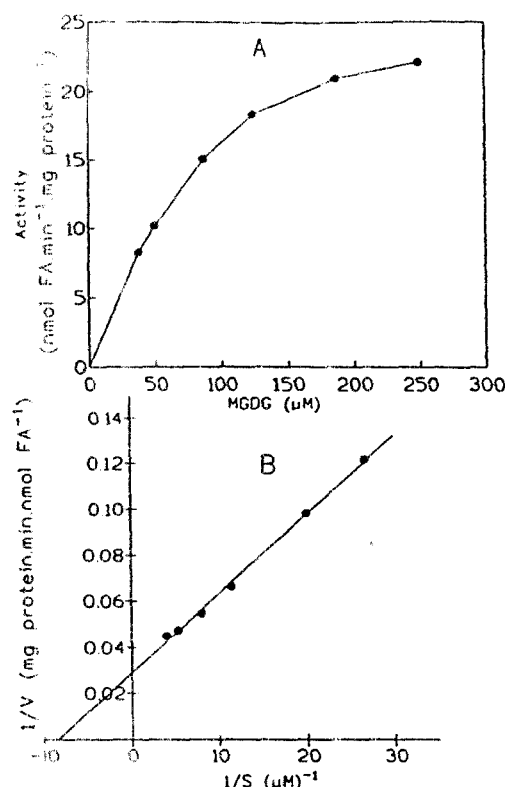


Fig. 8 Effect of substrate concentration on the activity of the purified enzyme. (A) Effect of MGDG concentration on the enzyme activity; (B) Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of MGDG by the purified enzyme.

enzyme activity tended to reach a plateau beginning at 250 μM MGDG. The K_m value of the enzyme for this substrate was calculated to be 119 μM from a Lineweaver-Burk plot (Fig. 8B).

Substrate specificity

The purified enzyme was tested for activity towards the various substrates shown in Fig. 9. Hydrolyzing activity was obtained for the phospholipids and galactolipids tested. The hydrolysis rate for DGDG was the highest (11.7 nmol

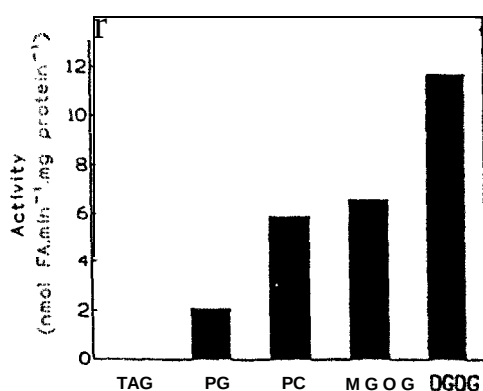


Fig. 9. Substrate specificity of the purified enzyme. Substrates were extracted from Cowpea leaves as indicated in Section 2. Enzymatic assays were done following the standard procedure with 0.1 nmol purified enzyme and 65 nmol of each substrate.

Table 2

Fatty acid composition (in mass%) of the polar lipids extracted from Cowpea leaves and used as substrates for LAH

		F a t t y acid	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
MGDG	A	1.9	0.8	0.5	2.4	94.4		
	B	8.4	3.5	3.6	5.8	78	7	
DGDG	A	17.3	2.2	0.8	2.1	76.9		
	B	25.7	3.7	1.3	2.1	67.1		
PC	A	23.3	4.4	77	34.4	30.2		
	B	41.7	11.2	14	17.4	15.6		
PG	A	31.2	22.6	5.1	2.8	18.3	20.0	
	B	60.7	5.6	8.4	4.1	8.8	10.4	

(A) Before the enzymatic degradation; (B) after.

FA.min⁻¹.mg⁻¹ protein). This was followed by MGDG and PC, which showed almost equal rates (6.6 and 5.9 nmol FA.min⁻¹.mg⁻¹ protein, respectively). PG showed the lowest rate (2.1 nmol FA.min⁻¹.mg⁻¹ protein). On the other hand, the neutral lipid, TAG, was not affected.

Table 2 presents the fatty acid composition of the different polar lipids used as substrates, and Table 3 shows the distribution of radioactivity among the saturated (C16:0 + C18:0), mono- (C16:1 + C18:1), di- (C18:2) and tri- (C18:3) unsaturated fatty acids, prior to and after degradation by LAH. As could be seen, the lipids remaining after enzymatic reaction were less unsaturated, and the relative radioactivity of polyunsaturated fatty acids, especially linolenic acid, decreased: in other words, LAH degraded preferentially the polyunsaturated molecular species of polar lipids.

4. Discussion

In the present study, we have purified a MGDG-lipolytic acylhydrolase from soluble extracts of Cowpea leaves, and determined its biochemical characteristics.

The purified enzyme exhibited no activity towards TAG, on the other hand it deacylated phospholipids as well as

Table 3

Distribution of the radioactivity (in% of the total radioactivity) among the fatty acids of the polar lipids extracted from Cowpea leaves and used as substrates for LAH

		double bond	:0	:1	:2	:3
MGDG	A		1.6	0.3	5.2	93
	B		8.1	0.9	4.8	86.2
DGDG	A		7.2	7.0		85.5
	B		33.5	x.4	6.6	58.5
Pc	A		221	23	28.9	46.7
	B		65.7		20.0	14.3
PG	A		25.1	3.0	40.3	31.6
	B		86.7		10.0	3.3

(A) Before the enzymatic degradation; (B) after. :0 = saturated fatty acids (C16:0 + C18:0), :1 = monounsaturated (C16:1 + C18:1), :2 = diunsaturated (C18:2), :3 = triunsaturated (C18:3).

galactolipids, with a preference for the polyunsaturated molecular species; it was therefore similar to the LAH first described by Galliard [24] in potato tubers. Similar results were obtained by Matsuda et al. on Bean and Potato leaves [29,30] and by Hirayama et al. on potato tubers [27]. These authors suggest that the active site was the same for MGDG and PC [27].

The enzyme was shown to have a native molecular mass of 80 kDa. This value was similar to those found by Burns et al. [28] on *Phaseolus multiflorus* leaves (70–90 kDa) and by Matsuda et al. [30] on leaves of *Phaseolus vulgaris* (90 kDa), but differ noticeably from those found by Helmsing [23] on *Phaseolus multiflorus* leaves (110 kDa) and by Anderson et al. [26] on *Phaseolus vulgaris* chloroplasts (55 kDa). By SDS-PAGE, we showed that the enzyme was a dimer of 2 polypeptides of 40 kDa each. Curiously, no report on the subunits of the LAH or of the galactolipase could be found in literature.

The isoelectric point of the enzyme was at pH 5.0. Apart from Welmsing's report of a $pI = 7$ [23], the LAHs described in literature seemed generally to be acidic proteins, with a pI ranging from 4.4 [30] to 5 [27]. In Rice bran, Matsuda and Hirayama [31] demonstrated the existence of multiple isomeric forms of the enzyme.

The activity of the enzyme was also found to be maximal at rather acid pH: 5–6, a value consistent with those reported by other authors.

Our experiments on the thermostability of the enzyme indicated that it is relatively heat-resistant. Helmsing [23], Matsuda and Hirayama [29] also found a good resistance to high temperatures of their acylhydrolases, especially at acidic pH. Moreover, Anderson et al. [26] suggested the existence in Bean leaves, of a heat-labile inhibitor of the enzyme since they observed an increase in activity when the leaf extract was subjected to 65°C for 2 min. This could explain the increase in activity that we obtained after gel filtration of the crude enzyme, the inhibitor being probably separated on the Sephadex G-25 column.

The enzyme was slightly activated by CaCl_2 , but was not calcium-dependent, at the difference of phospholipases A from animal sources.

In the present study, we have purified the MGDG-acylhydrolase from the particle-free extract of Cowpea leaves. However, MGDG-acyl hydrolytic activities have been found in the chloroplast membranes [16,21,27]. It will be of great interest to precise the eventual differences or similarities between them. Further work on this problem is in progress in our laboratory.

Recently [39], it was demonstrated that the major storage protein of Potato tubers, patatin, has an acyl hydrolase activity towards polar lipids. However, patatin was not found in leaves [40], and it has a specific activity with galactolipids 30-fold less than with phospholipids [40]. Then, the molecular identity between patatin and leaf LAH still remains ambiguous.

On the other hand, our purification scheme leading to

the availability of the pure leaf enzyme makes possible more detailed studies on the sub-cellular localization of the enzyme and on the mechanisms of its regulation that may provide a more comprehensive understanding of the process of membrane lipid degradation in plants

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the European Community (STD Program).

References

- [1] Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K. (1979) Low temperature stress in crop plants The role of the membrane. Academic Press New York, p. 565.
- [2] Kuiper, P.J.C. (1980) *Physiol. Veg.* 18, 83–88.
- [3] Liljenberg, C.S. (1992) *Prog. Lipid. Res.* 31, 335–343.
- [4] Pham Thi, A.T., Vieira da Silva, J. and Mazliak, P. (1990) *Bull. Soc. Fr.* 137, 99–144.
- [5] Fergusson, C.H.R. and Simon, E.W. (1973) *J. Exp. Bot.* 24, 307–316.
- [6] Harwood, J.L., Jones, A. V.H.M. and Thomas, H. (1982) *Planta* 156, 152–157.
- [7] Paliyath, G. and Droillard, M.-J. (1992) *Plant Physiol. Biochem.* 30, 789–812.
- [8] Guillot-Salomon, T., Bahl, J., Ben Rais, L., Alpha, M.J., Cantrel, C. and Dubaq, J.P. (1991) *Plant Physiol. Biochem.* 29, 667–679.
- [9] Yoshida, S. (1979) *Plant Cell Physiol.* 64, 241–256.
- [10] Lynch, D.V. and Thompson, J.A. (1984) *Plant Physiol.* 72, 198–203.
- [11] Chetani, S., Wagle, D.S. and Nainawatee, H.S. (1982) *Phytochemistry* 21, 51–53.
- [12] Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A.T. and Vieira da Silva, J. (1984) *Physiol. Plant.* 62, 219–224.
- [13] Navari-Izzo, F., Quertacci, M.F. and Izzo, R. (1989) *J. Exp. Bot.* 40, 675–680.
- [14] Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Vieira da Silva, J., Justin A.M., Demandre, C. and Mazliak, P. (1990) *Plant Sci.* 66, 185–193.
- [15] Sastry, P.S. and Kates, M. (1964) *Biochemistry* 3, 1280–1287.
- [16] Helmsing, P.J. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 144, 470–472.
- [17] Kaniuga, Z. and Gemel, J. (1984) *FEBS Lett.* 171, 55–58.
- [18] O'Sullivan, J.N., Warwick, N.W.M. and Dalling, M.J. (1987) *J. Plant Physiol.* 131, 393–404.
- [19] El-Hafid, L., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y. and Vieira da Silva J. (1989) *Plant Physiol. Biochem.* 27, 495–502.
- [20] Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou R., Vieira da Silva, J. and Mazliak, P. (1993) *Plant. Physiol. Biochem.* 31, 707–715.
- [21] McCarty, R.E. and Jagendorf, A.T. (1965) *Plant. Physiol.* 40, 725–735.
- [22] O'Sullivan, J.N. and Dalling, M.J. (1989) *J. Plant Physiol.* 134, 504–509.
- [23] Helmsing, P.J. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 178, 519–533.
- [24] Galliard, T. (1971) *Biochem. J.* 121, 379–390.
- [25] Galliard, T. and Denis, S. (1974) *Phytochemistry* 13, 1731–1735.
- [26] Anderson, M.M., McCarty, R.E. and Zimmer, E.A. (1974) *Plant Physiol.* 53, 699–704.
- [27] Hirayama, O., Matsuda, H., Takeda, H., Maenaka, K. and Taksuka, H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 384, 127–139.
- [28] Burns, D.D., Galliard, T. and Harwood, J.L. (1979) *Phytochemistry* 18, 1793–1797.
- [29] Matsuda, H. and Hirayama, O. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 573, 155–165.

- [30] Matsuda, H., Tanaka, G., Morita, K and Hirayama, O. (1979) Agric Biol. Chem. 43, 563–570.
- [31] Matsuda, H. and Hirayama, O. (1979) Agric. Biol. Chem. 43, 463–469.
- [32] Matsuda, H and Hirayama, O. (1979) Agric. Biol. Chem. 43, 697–703.
- [33] Pham Thi, A.T., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J.B., Justin, AM. and Mazliak, P. (1985) Phytochemistry 24, 723–727.
- [34] Allen C.F., Good, P., Davis, H.F., Chisum, P. and Fowler, S.D. (1966) J. Am. Oil Chem. Soc. 43, 223–213.
- [35] Lepage, M. (1967) Lipids 2, 244–250.
- [36] Mangold, H.K. (1961) J. Am. Oil. Chem. Soc. 38, 708–727.
- [37] Hulanicka, D., Erwin, J and Block, K. (1964) J Biol. Chem 239, 1778–1787.
- [38] Bradford, M. (1976) Anal. Biochem 72, 248–253.
- [39] Andrew, D.L., Beames, B., Summers, M.D. and Park, W D (1988) Biochem. J. 252, 199–206.
- [40] Paiva, E., Lister, K.M. and Park, W.D. (1983) Plant Physiol 71, 161–168.



EFFECT OF DROUGHT ON PHOTODYNAMIC PEROXIDATION OF LEAF TOTAL LIPOPHILIC EXTRACTS

ROSELYNE FERRARI-ILIOU,*†† AGNÈS D'ARCY-LAMETA,* ANH THU PHAM THI,*† YASMINE ZUILY-FODIL* and PAUL MAZLIAK†

*Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale, Université Paris 7, place Jussieu, case 7019, 75251 Paris cedex 05, France;

†Physiologie Cellulaire et Moléculaire (URA 1180), Université Paris 6, Paris, France

(Received in revised form 15 February 1994)

Key Word Index—*Phaseolus vulgaris*; *Vigna unguiculata*; Leguminosae; tri-linolenic acid; drought; lipid photoperoxidation; plant pigments.

Abstract—*In vitro* lipid peroxidation, induced by photochemically generated reactive oxygen species, was carried out either on purified α -linolenic acid (18:3n-3) (1.32 mM) or on total lipophilic extracts of leaf (standardized at 1.32 mM for 18:3n-3 content). Three cultivars of plants differing in their sensitivity to water deficit were used: *Vigna unguiculata* L. cv. EPACE (drought-tolerant), *Vigna unguiculata* L. cv. IT-83D (moderately drought-tolerant) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Cariquinha (drought-sensitive). The time-course of 18:3n-3 photoperoxidation was comprised of three phases: (i) monohydroperoxidation, characterized by formation of conjugated diene patterns, (ii) secondary oxidation, characterized by formation of conjugated triene patterns, (iii) oxidative fragmentation of peroxidized compounds, characterized both by the disappearance of conjugated polyenic patterns and by the formation of thiobarbituric acid reacting substances. Only the first and second phases were observed on photoperoxidation of total lipophilic extracts from leaves of well-hydrated plants. When each cultivar was subjected to drought treatment, the conjugated diene pattern maximum was attained earlier than for well-hydrated plants, suggesting that drought affects the resistance capacity of total lipophilic extracts from leaves to photoperoxidation. The more severe the drought, the more susceptible the leaf extracts were to lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. The more resistant to drought the plant was, the slower the rate of formation of conjugated polyenic patterns. These results are discussed in relation with the chlorophyll a/b and carotenoids/18:3n-3 molar ratios in the photoperoxidation apparatus. This work is the first attempt to correlate plant drought tolerance and the sensitivity of their leaf total lipophilic extracts to lipid peroxidation.

INTRODUCTION

Membrane lipids are required for sustaining photosynthetic activity under environmental conditions, and a loss in activity is observed if the leaf lipids are degraded either by high light or high temperature stresses [1]. Drought-related changes in the lipid composition of plant membranes of various species resistant or sensitive to drought result generally in a decrease in polyunsaturated fatty acid content, especially α -linolenic acid (18:3n-3) [2], which represents 60–75% of the leaf fatty acids. Polyunsaturated fatty acids are major components of the thylakoids and their degradation under drought treatment is more pronounced in chloroplasts isolated from drought-sensitive cotton leaves than in chloroplasts isolated from drought-resistant ones [3]. Chloroplast unsaturated lipid breakdown has also been observed in a drought-sensitive wheat cultivar but not in a drought-resistant one [4]. This decrease could be due not only to enzymatic breakdown caused by the activation of some

degradative enzymes [5] but also to inhibition of some enzymes playing a role in the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids [6]. Some authors have suggested that reactive oxygen species, normally produced in chloroplasts during photosynthesis, are responsible for polyunsaturated lipid degradation [7]. Singlet oxygen (1O_2) is naturally produced in the chloroplast via a type II photooxidation mechanism using the triplet state of photosensitizers such as anthraquinones, furo-coumarins and polyacetylenes [8]. However, in plants, the most ubiquitous sensitizer is chlorophyll. Addition of chlorophyll to pure 18:3n-3 [9] or to polyunsaturated fatty acid mixtures [10] induces lipid peroxidation. Chlorophyll is known to be responsible for *in vivo* 1O_2 generation under stress conditions [11]. 1O_2 generated by photosensitization has been recognized for a long time to be responsible for polyunsaturated lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes [12]. The involvement of reactive oxygen species and radical processing systems in plants, under drought stress, has been suggested by many authors [13, 14]. Drought-induced pathology is a consequence of superoxide generation in damaged chloroplasts

† Author to whom correspondence should be addressed.

[5]. A 17% higher free radical production in sunflower seedlings is observed under drought conditions [16]. In plants, a frequent response to drought is a significant increase in α -tocopherol content, indicating that free radical damage is enhanced by drought and that antioxidants are necessary to prevent non-enzymatic membrane oxidative damages [17]. Drought-tolerant species have elevated α -tocopherol levels up to three-fold higher than drought-susceptible species [18, 19]. Carotenoids are known to collect light energy for driving photosynthesis processes [20] and to prevent photodynamic destruction of plant and bacterial photosynthetic apparatuses [21, 22]. This photodynamic destruction is principally induced by $^1\text{O}_2$ [11]. This entity is very transient and can be quenched *in situ* by non-polar molecules such as carotenoids. The most efficient of these carotenoids are zeaxanthin [22] and lycopene [23]. Recently, we devised a method for inducing *in vitro* photoperoxidation of plant lipophilic extracts by reactive oxygen species photochemically generated using mesotetraphenylporphine (mTPP) as photosensitizer [9]. In the present work, we try to demonstrate an eventual relationship between the cellular tolerance of plants to drought and the sensitivity of their total lipophilic leaf extracts to *in vitro* photoperoxidation. Accordingly, plants were chosen from cultivars of different drought-sensitivities: *Vigna unguiculata* cv. EPACE (drought-tolerant) and *Vigna unguiculata* cv. IT-83D (moderately drought-tolerant) [24]. To compare these plants with a really drought-sensitive plant, we were forced to select a second plant species: *Phaseolus vulgaris* cv. Carioquinha [24].

RESULTS

Time-course of photoperoxidation of 18 : 30 - 3

Photochemically generated reactive oxygen species induced peroxidation of 18 : 3n - 3 (1.32 mM). Three main phases were distinguishable (Fig. 1). The first phase (0 - 120 min) corresponding to monohydroperoxidation, characterized by formation of monohydroperoxidized 18 : 3n - 3 possessing conjugated diene patterns exhibiting maximum absorbance at 235 nm. The second phase (120 - 180 min) corresponding to the secondary oxidation of the monohydroperoxidized products, characterized by formation of polyoxygenated products including dihydroperoxidized 18 : 3n - 3 possessing conjugated triene patterns (maximum absorbance at 268 nm). The third phase corresponding to the oxidative fragmentation of peroxidized compounds characterized both by the disappearance of conjugated polyenic patterns and by the concomitant formation of aldehydic products reacting with thiobarbituric acid (TBARS). The maximum absorbance of conjugated diene patterns was obtained after 135 min of irradiation while that of conjugated triene patterns was obtained after 180 min of irradiation. The TBARS maximum was obtained after 210 min of irradiation.

Time-course of photoperoxidation of standardized total

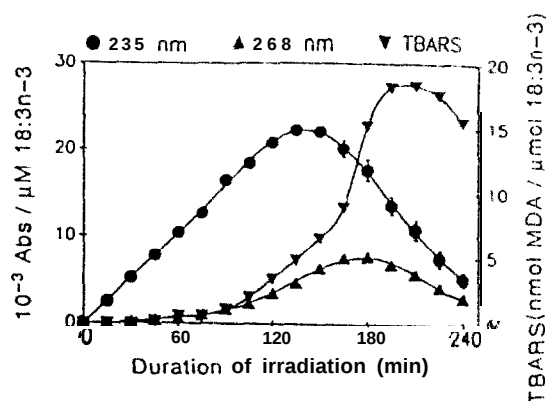


Fig. 1. Time-course of the production of conjugated patterns and evolution of peroxidation products during photoperoxidation of 18 : 3n - 3 (1.32 mM) in the presence of mesotetraphenylporphine (mTPP) (17 μM). Conjugated diene (solid circles) and triene (solid triangles) patterns are expressed as milliAbsorbance (mAbs) at 235 nm and 268 nm μM^{-1} equivalent initial 18 : 3n - 3, respectively, as a function of irradiation duration. Results are expressed as mean $\pm$ SEM for seven experiments. Time-course of the formation of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) (solid inverse triangles) is expressed as nmol malonyldialdehyde (MDA) μmol^{-1} equivalent initial 18 : 3n - 3 as a function of irradiation duration. TBARS results are expressed as mean (3) $\pm$ SEM.

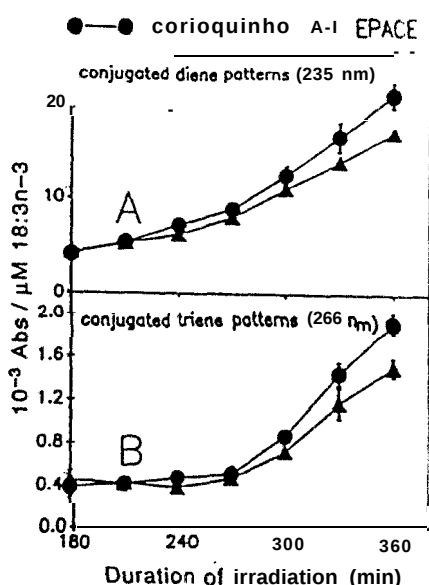


Fig. 2. Time-course of the production of conjugated diene (235 nm, panel A) and triene (268 nm, panel B) patterns during photoperoxidation in the presence of mTPP (17 μM) of total lipophilic extracts from leaves of well-hydrated (≈ 0.5 MPa) Carioquinha (solid circles) and EPACE (solid triangles) plants standardized at 1.32 mM 18 : 3n - 3. One measurement every 30 min between 180 and 360 min. The results are expressed in mAbs μM^{-1} equivalent initial 18 : 3n - 3 as a function of irradiation duration. Results are expressed as mean (3) $\pm$ SEM.

lipophilic extracts from well-hydrated *V. unguiculata* cv. EPACE and *P. vulgaris* cv. Carioquinha leaves

Leaf total lipophilic extracts standardized with regard to 18 : 3n - 3 concentration (1.32 mM) were photoperoxidized. The results (Fig. 2), compared to those obtained

with purified 18:3n-3 at an identical concentration (Fig. 1), showed that the formation of conjugated polyenic patterns was considerably slower. Although for purified 18:3n-3, it was possible to follow and distinguish three phases during the 240 min period of irradiation as described before, in the leaf total lipophilic extracts it was only possible during a 360 min period of irradiation to observe the first and the second phases corresponding to mono- and dihydroperoxidation, respectively. Purified 18:3n-3 was completely oxidized to aldehydic products after 240 min of irradiation whereas, in the case of leaf total lipophilic extracts of well-hydrated plants, the maximum plateaus of conjugated diene and triene patterns were not obtained after 360 min of irradiation. Under our conditions, the maximum plateau of conjugated polyenic patterns was not attained, and the disappearance of conjugated patterns and the formation of TBARS could not, therefore, be observed. For conjugated diene and triene formation, differences were observed between EPACE and Carioquinha in the last two hours of the experiment. The maximum productions of conjugated diene and triene patterns after 360 min of irradiation were, respectively, 25 and 36% higher for Carioquinha than for EPACE (Fig. 2).

Effect of drought on time-course of photoperoxidation of standardized total lipophilic extracts from P. vulgaris and V. unguiculata leaves

P. vulgaris cv. *Carioquinha* (drought-sensitive). The kinetics of conjugated diene formation (Fig. 3A) indicated that for droughted plants (-1.5 MPa), maximum conjugated diene pattern formation was obtained after 300 min of irradiation, whereas it was not obtained, under our conditions, for well-hydrated plants (-0.5 MPa). Conjugated diene formation was thus increased in droughted plants as compared with well-hydrated plants. Maximum conjugated triene pattern formation (Fig. 3B) was not obtained after 360 min of irradiation, even for droughted plants (-1.5 MPa), although the level of conjugated triene pattern observed for droughted plants was roughly twice that for well-hydrated plants subjected to an identical irradiation duration. Again, we observe that conjugated triene production was increased by drought stress.

V. unguiculata cv. *EPACE* (drought-resistant). As the drought-tolerance of EPACE was greater than that of Carioquinha, it was possible to reach water potentials of -2.0 MPa, corresponding to severely droughted plants. However, the time-course of the photoperoxidation of leaf total lipophilic extracts of EPACE (Fig. 4A) exhibited only two distinct phases as in the case of Carioquinha. The formation of conjugated diene patterns started to increase after 180, 210 and 240 min of irradiation for severely (-2.0 MPa), moderately-droughted (-1.5 MPa) and well-hydrated (-0.5 MPa) plants, respectively. Conjugated diene pattern level obtained in the case of well-hydrated plants after 300 min of irradiation was obtained after 255 and 225 min in the case of moderately- and severely droughted plants, respectively (Fig. 4A).

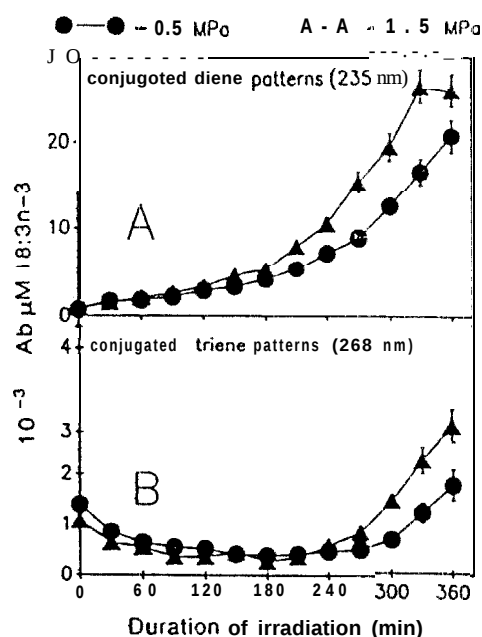


Fig. 3. Time-course of the production of conjugated diene (235 nm, panel A) and triene (268 nm, panel B) patterns during photoperoxidation in the presence of mTPP ($17 \mu\text{M}$) of total lipophilic extracts from leaves of well-hydrated (-0.5 MPa) and moderately-droughted (-1.5 MPa) Carioquinha plants standardized at $1.32 \text{ mM } 18:3n-3$. One measurement every 30 min. The results are expressed as in Fig. 2.

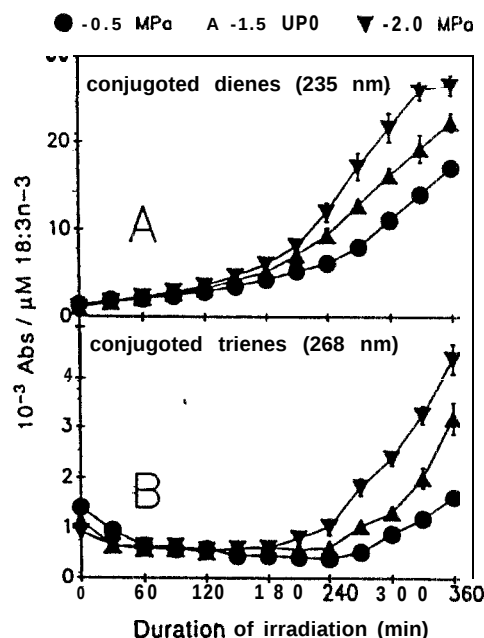


Fig. 4. Time-course of the production of conjugated diene (235 nm, panel A) and triene (268 nm, panel B) patterns during photoperoxidation in the presence of mTPP ($17 \mu\text{M}$) of total lipophilic extracts from leaves of well-hydrated (-0.5 MPa), moderately-droughted (-1.5 MPa) and severely-droughted (-2.0 MPa) EPACE plants standardized at $1.32 \text{ mM } 18:3n-3$. The results are expressed as in Fig. 2.

Concerning conjugated triene pattern formation, the absorbance at 268 nm began to increase after 210 min for severely-droughted plants and after 240 min of irradiation for mildly-droughted plants, whereas, in the case of well-hydrated plants, this increase was only obtained after 270–300 min of irradiation (Fig. 4B). Conjugated diene and triene maxima obtained after 135 and 165 min, respectively, for 18:3n-3 photoperoxidation (Fig. 1) were not observed for well-hydrated or mildly-droughted EPACE plants after 360 min of irradiation. Conjugated diene pattern maximum was obtained after 330 min of irradiation for severely-droughted plants (Fig. 4A). In contrast, for the same drought deficit and the same irradiation duration, conjugated triene pattern maximum was not obtained (Fig. 4B).

Comparison of the rates of formation of conjugated diene and triene patterns

In order to obtain a better picture of the peroxidation phenomenon, the rates of formation of conjugated diene and triene patterns between 270 and 330 min have been calculated for the three cultivars and the different levels of water potential. The results are shown in Fig. 5.

As regards well-hydrated plants, the rate of conjugated diene pattern formation was 30.5% higher for Carioquinha than for EPACE, and 67% higher than for IT-83D (Fig. 5A). The rate of conjugated triene formation was 50% lower for IT-83D compared to EPACE or Carioquinha (Fig. 5B).

In the case of droughted EPACE, the rate of conjugated diene pattern formation was 61% (–1.5 MPa) and

48% (–2.0 MPa) higher compared to that of well-hydrated plants (Fig. 5A). The rate of conjugated triene formation was 22.5% (–1.5 MPa) and 80.5% (–2.0 MPa) higher compared to that of well-hydrated plants (Fig. 5B).

In the case of droughted IT-83D, the rate of conjugated diene formation was 64% (–1.5 MPa) and 161% (–2.0 MPa) higher compared to that of well-hydrated plants (Fig. 5A). The rate of conjugated triene formation was 3 (–1.5 MPa) and 6.5 (–2.0 MPa) times higher than that of well-hydrated plants (Fig. 5B).

In the case of droughted Carioquinha, the rate of conjugated diene formation was 64.5% higher compared to that of well-hydrated plants (Fig. 5A) and the rate of conjugated triene pattern formation was 90.5% higher compared to that of well-hydrated plants (Fig. 5B).

When we compared the three cultivars with the same water status (–1.5 MPa), the rate of conjugated diene pattern formation was 33% higher for Carioquinha compared to that of EPACE, while IT-83D and EPACE were the same (Fig. 5A). The rate of conjugated triene pattern formation was 24% higher for IT-83D compared to EPACE and 63% higher in the case of Carioquinha compared to EPACE (Fig. 5B). In the case of severe drought (–2.0 MPa), the rate of conjugated diene and triene pattern formation of IT-83D was 40 and 74.5%, respectively, higher than that of EPACE (Fig. 5B).

Effect of drought on chlorophyll a/b and carotenoids 18:3n-3 molar ratios in the photoperoxidation apparatus

The chlorophyll a/b (Fig. 6A) molar ratio decreased in the case of the drought-tolerant cultivar (EPACE) and

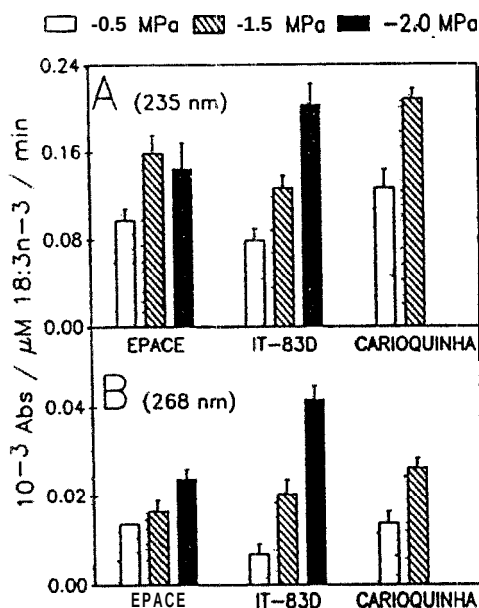


Fig. 5. Effect of drought on the rates of conjugated diene (235 nm, panel A) and triene (268 nm, panel B) generation, between 270 and 330 min, during photoperoxidation of well-hydrated (–0.5 MPa), moderately-droughted (–1.5 MPa) and severely droughted (–2.0 MPa) Carioquinha, IT-83D, EPACE plant extracts. Results are expressed as $\text{mAbs } \mu\text{M}^{-1}$ equivalent Initial 18:3n-3 min^{-1} . Results are expressed as mean (3) $\pm$ SEM.

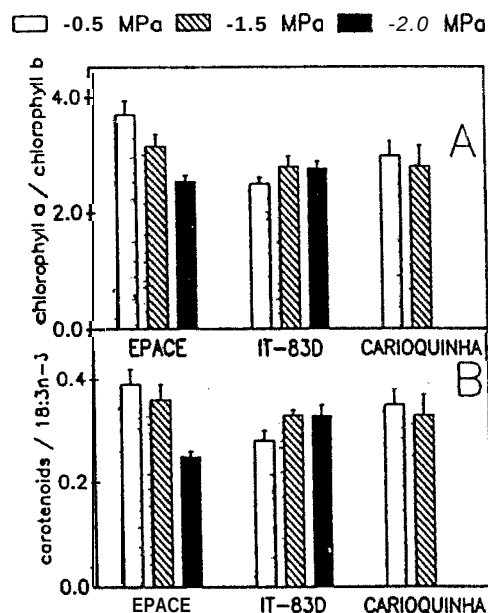


Fig. 6. Variations in chlorophyll a/b (panel A) and carotenoids/18:3n-3 (panel B) molar ratios in the photoperoxidation apparatus obtained from well-hydrated (–0.5 MPa), moderately-droughted (–1.5 MPa) Carioquinha and well-hydrated (–0.5 MPa), moderately droughted (–1.5 MPa), severely-droughted (–2.0 MPa) IT-83D and EPACE plant extracts. Results are expressed as mean (3) $\pm$ SEM.

remained unchanged in the case of the moderately drought-tolerant one (IT-83D) and drought-sensitive one (Carioquinha). In the photoperoxidation apparatus and for well-hydrated plants, the carotenoids/18:3n-3 molar ratio was 39% higher in EPACE compared to IT-83D and 115% higher in EPACE compared to Carioquinha (Fig. 6B). The carotenoids/18:3n-3 molar ratio decreased by 8% under mild drought and by 56% under severe drought in EPACE. The carotenoids/18:3n-3 molar ratio increased by 18% under mild or severe drought in IT-83D whereas it remained unchanged in Carioquinha (Fig. 6B).

DISCUSSION

The great resistance of total lipophilic extracts from plant leaves to photoperoxidation as compared to pure 18:3n-3 photoperoxidation [9] is clearly demonstrated in this work. The three main phases of the reaction of photoperoxidation which were observed in the case of 18:3n-3 alone were not observed in the photoperoxidation of total lipophilic extracts from leaves of well-hydrated plants (Fig. 2). Comparing the behaviour of leaf total lipophilic extracts from three different cultivars (two plant species) confirmed this first result. Moreover, we established, for the first time, a relationship between plant drought sensitivity and leaf total lipophilic extracts photoperoxidation induced by reactive oxygen species, photochemically generated. The sensitivity to photoperoxidation increased gradually as a function of drought intensity. For well-hydrated (-0.5 MPa) and moderately-droughted (-1.5 MPa) EPACE (drought-tolerant), the maximum plateau of conjugated diene formation was not obtained (Fig. 4) even after 360 min of irradiation. But, in the case of mildly droughted (-1.5 MPa) Carioquinha (the drought-sensitive cultivar), it was obtained after 330 min of irradiation (Fig. 3). The maximum plateau of conjugated diene formation was also obtained with leaf total lipophilic extracts from severely-droughted plants of EPACE (-2.0 MPa). The more severe the drought, the earlier the conjugated dienes appeared, and the more resistant the plant to drought, the later the formation of conjugated dienes. The expression of the results in terms of rates of polyenic conjugated pattern formation, emphasized differences between plant species and drought treatment (Fig. 5). For EPACE, these rates were not different for severe and mild drought; this result points out the great resistance of leaf total lipophilic extracts from this cultivar to photoperoxidation. As concerns IT-83D and Carioquinha, the rate of conjugated polyenic pattern formation increased as function of drought intensity. If, in well-hydrated plants, no net discrimination could be observed between the two species, the differences between the three plants were enhanced with increasing drought stress. In severely-droughted plants, the behaviour of the three cultivars was clearly different. The more resistant to drought was the cultivar, the slower the formation of conjugated polyenic pattern of leaf total lipophilic extracts (standardized in their 18:3n-3 content) to induced photoperoxidation.

On the other hand, a correlation seemed to exist between linolenic acid content of leaves and drought sensitivity of plants [2]. When subjected to drought, the polyunsaturated fatty acid content of leaves decreased, this decrease being larger in the sensitive varieties than in the resistant ones [25]. Moreover, in well-hydrated plants, galactolipids from resistant varieties contain less linolenic acid than those from drought-sensitive varieties [2]. Being less unsaturated, their membranes are less susceptible to peroxidative degradation. Water loss in a desiccation-sensitive moss *Dicranella palustris* resulted in increased lipid peroxidation, which caused a build-up of stable free radicals detected in vivo. Desiccation-sensitive mosses exhibited increased lipid peroxidation under drought treatment but not desiccation-tolerant mosses [26].

In leaf total lipophilic extracts of *V. unguiculata* and *P. vulgaris* subjected to different water deficits: the chlorophyll a/b molar ratio remained unchanged under drought treatment for the moderately drought-tolerant cultivar (IT-83D) and drought-sensitive one (Carioquinha) (Fig. 6A). In contrast, for the drought-tolerant cultivar (EPACE), this ratio was affected by drought indicating selective destruction of chlorophyll a (data not shown). In plants, chlorophyll b is present in the antenna pigment complex of the photosystems and plays a role in energy dissipation like carotenoids [27]. Chlorophyll a is in the reaction centre and is responsible for triplet mediated 1O_2 formation and prolonged illumination of the isolated photosystem II reaction centre under aerobic conditions causes a selective photodestruction of chlorophyll a [28]. Chlorophyll a appeared to be destroyed more readily than chlorophyll b through free radical mechanisms [29]. As pointed out, oxidative cleavage of chlorophyll porphyrin would be sufficient to prevent membrane oxidative damage by reactive oxygen species generated by photosensitization of free porphyrins [30]. The chlorophyll porphyrin seems to be responsible for 1O_2 formation leading to its own destruction. Our *in vitro* results led us to hypothesize that, in vivo, although chlorophyll a was a major component for photosynthesis, it could nevertheless indirectly cause deleterious effects to thylakoid membranes. Chlorophyll destruction and lipid peroxidation are effectively major causes of cellular damage in chloroplasts [7].

Concerning carotenoids, we demonstrated recently that addition of β -carotene to linolenic acid could delay conjugated diene and triene formation because β -carotene quenched 1O_2 [9]. Similar results were obtained using arachidonic acid as oxidizable substrate [31]. Carotenoids can interact with the triplet state of chlorophyll a or singlet excited state of oxygen and then prevent reactive oxygen species formation and free radical damage [32]. Leaf total lipophilic extracts of the drought-tolerant cultivar EPACE also exhibited the lowest sensitivity to lipid peroxidation induced by reactive oxygen species photochemically generated and the greater amount in carotenoids. In the photoperoxidation apparatus, both moderately drought-tolerant and drought-sensitive cultivars exhibited a lower carotenoids/18:3n-3 molar ratio than drought-tolerant ones. The

carotenoids/18:3n-3 molar ratio correlated with leaf total lipophilic extract resistance to photoperoxidation and the delay observed in conjugated polyenic pattern formation could be due to the presence of carotenoids protecting *in vitro* 18:3n-3 [9]. In plants, the protective role of carotenoids against cell membrane oxidative damage is well known [21]. A decline in protection against $^1\text{O}_2$ induced damages is due to a decrease in carotenoid content of the chloroplast [10].

Further experiments are in progress to measure carotenoid content and distribution and eventually to observe the structural changes to these molecules under drought [33]. One such change might be an epoxidation caused via the formation of the triplet state of the molecules, which is related to their photo-protective function. For example, all-*trans* β -carotene epoxide has been found in the thylakoid membranes of irradiated spinach and the amount of this compound was a function of light incident on the leaves [34]. These structural changes could also be responsible for the tolerance of the sensitivity to drought of the different cultivars.

Finally, the tocopherol contents in our plant extracts were negligible as compared to other constituents. In view of this, we did not attempt to quantify tocopherols in leaf total lipophilic extracts.

EXPERIMENTAL

Materials. Mesotetraphenylporphine (mTPP) and α -linolenic acid (18:3n-3) were obtained from Sigma. Alcohols used were HPLC grade and obtained from Pharmitalia Carlo Erba (Milan). Organic solvents used were HPLC grade and obtained from BDH. All other chemicals were analytical grade and were obtained from Merck. All chemicals were used as received, with the exception of 18:3n-3 which was purified as previously described [9].

Plant material and drought treatment. Expts were performed using 2 cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp (cv. EPACE and cv. IT-83D from Brazil and Nigeria, respectively) and one cultivar of *Phaseolus vulgaris* L. (cv. Cariquinha from Brazil). The protoplasmic tolerance to drought was estimated by a method measuring electrolyte leakages from leaf discs subjected to an osmotic treatment [35]. Following this method, *V. unguiculata* cv. EPACE was classified as drought-tolerant, *V. unguiculata* cv. IT-83D as moderately drought-tolerant and *P. vulgaris* cv. Cariquinha as drought-sensitive. This classification was in accordance with the behaviour of the plants as a whole under natural conditions [24]. Plants were grown, under conditions previously described [3], in a greenhouse. Control plants were irrigated daily with a nutrient soln, while stressed plants were subjected to water deficit by withholding irrigation for 6-10 days. Water potentials were measured using a pressure chamber (PMS instrument), as described [36]. Control (well-hydrated) plants exhibited a water potential of -0.5 MPa whereas droughted plants exhibited water potentials of -1.5 MPa and -2.0 MPa corresponding to mild and severe water deficit, respectively. Cariquinha is

more sensitive to drought than *V. unguiculata* and it was impossible to obtain, for this cultivar, a water deficit corresponding to -2.0 MPa.

Lipid sample preparation and lipid analysis. The lipophilic foliar samples from leaf homogenates were prep'd by solvent extraction and their content in 18:3n-3 was determined by CC analysis as described [9]. The samples were kept at -80° before photodynamic peroxidation.

Photoperoxidation procedure and UV analysis. The reaction was performed at 25° in a glass apparatus as described [30]. In a routine expt, 9.2 mg of purified 18:3n-3 or the equivalent amount coming from leaf extracts and 300 μg mTPP in a final vol. of 25 ml CCl_4 were irradiated in the reaction vessel. Pure 18:3n-3 was systematically purified as described [9] because this fatty acid is very sensitive to autooxidation. The final concns were 1.32 mM for 18:3n-3 and 17 μM for mTPP. The total irradiation time for pure 18:3n-3 was 240 min and 200 μl of the irradiated soln was sampled every 15 min for conjugated dienes and trienes. In the case of plant extracts, the total irradiation time was 360 min and aliquots were sampled every 30 min. For analytical procedures, the aliquot removed was taken to dryness in a rotary evaporator and then analysed, after resolubilization in MeOH, by UV spectrophotometry. In the case of control expts using 18:3n-3 alone, thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) evaluation was performed in parallel with conjugated polyenic pattern measurement [9]. Malonyldialdehyde (MDA) was used for calibration purposes.

For UV spectrophotometry, the dried aliquots were solubilized in 600 μl MeOH to obtain the equivalent of a 55 μM soln of non-irradiated 18:3n-3. UV spectra were obtained using a scanning spectrophotometer (Perkin Elmer lambda 5) from 190 nm to 320 nm, with MeOH as a blank. Conjugated diene and triene patterns showed the expected absorbance maxima at 234-237 nm and 268 nm, respectively [37]. The specific absorbances were characterized by analysis of the second derivative of each spectrum [38]. The UV spectral results were expressed as absorbance at 235 nm and 268 nm, μM^{-1} of equivalent initial concn of 18:3n-3. Rates of conjugated polyenic patterns were calcd from the most linear part of the curves, between 270 and 330 min of irradiation. On the same aliquots, spectra from 190 nm to 700 nm were obtained. These spectra were used to quantify plant pigments such as chlorophyll a and b and carotenoids using the Mackinney formula [39].

Acknowledgement—The authors thank Dr Jean-Pierre Iliou (Institut de Recherches Servier, Suresnes, France) for his helpful comments.

REFERENCES

1. Mishra, R. K. and Singhal, G. S. (1992) *Plant Physiol.* 98, 1.
2. Pham Thi, A. T., Vieira Da Silva, J. and Mazliak, P. (1990) *Bull. Soc. Bot. Fr.* 137, 99.

- 3 Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A. T. and Vieira Da Silva, J. (1984) *Physiol. Plant.* **62**, 219.
- 4 Zhigalova, T. V., Tukeeva, M. I., Chivkunova, O. B. and Merzliak, B. N. (1989) *Vest Mosk. Univ. Ser. XVI Biol.* **1**, 29.
- 5 El-Hafid, L., Pham Thi, A. T., Zuily-Fodil, Y. and Vieira Da Silva, J. (1989) *Plant Physiol. Biochem.* **27**, 495.
- 6 Pham Thi, A. T., Borrel-Flood, C., Vieira Da Silva, J., Justin, A. M. and Mazliak, P. (1987) *Physiol. Plant.* **69**, 147.
- 7 Halliwell, B. (1987) *Chem. Phys. Lipids* **44**, 327.
- 8 Towers, G. N. N., (1980) *Prog. Photochem. Photobiol.* **6**, 183.
- 9 Ferrari-Iliou, R., D'Arcy-Lameta, A., Iliou, J. P., Pham Thi, A. T., Monteiro De Paula, F., Vieira Da Silva, J. and Mazliak, P. (1993) *Biophys. Biochim. Acta* **1166**, 48.
- 10 Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- 11 Barber, J. and Anderson, J. (1992) *T.I.B.S.* **17**, 61.
- 12 Eisenberg, W., Anand, J., Wang, S. and Stevenson, R. J. (1992) *Photochem. Photobiol.* **56**, 441.
- 13 Senaratna, T., McKersie, B. D. and Borochoy, A. (1987) *J. Exp. Bot.* **38**, 2005.
- 14 Leprince, O., Deltour, R., Thorpe, P. C., Atherton, N. M. and Hendry, G. A. F. (1990) *New Phytol.* **116**, 573.
- 15 Price, A. H., Atherton, N. M. and Hendry, G. A. F. (1989) *Free Rad. Res. Comms.* **8**, 61.
- 16 Quartacci, M. F. and Navarri-Izzo, F. (1992) *J. Plant Physiol.* **139**, 621.
- 17 Price, A. H. and Hendry, G. A. F. (1989) *Biochem. Soc. Trans.*, 629th Meeting London, **17**, 493.
- 18 Tanaka, K., Masuda, R., Sugimoto, T., Omasa, K. and Sakaki, T. (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2629.
- 19 Fryer, M. J. (1992) *Plant Cell Envir.* **15**, 381.
- 20 Siefermann-Harms, D. (1987) *Physiol. Plant.* **69**, 561.
- 21 Demmig-Adams, B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 1.
- 22 Young, J. A. (1991) *Physiol. Plant.* **83**, 702.
- 23 Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H. (1989) *Arch Biochem. Biophys.* **274**, 532.
- 24 Zuily-Fodil, Y., Vasquez-Tello, A. and Vieira Da Silva, J. (1990) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **137**, 115.
- 25 Monteiro De Paula, F., Pham Thi, A. T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou, R., Vieira Da Silva, J. and Mazliak, P. (1993) *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 707.
- 26 Seel, W., Hendry, G., Artherton, N. and Lee, J. (1991) *Free Rad. Res. Comms.* **15**, 133.
- 27 Demmig-Adams, B. and Adams III, W. W. (1992) *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 599.
- 28 Telfer, A., Wei-Zhong, H. and Barbe-r, J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1017**, 143.
- 29 Peiser, G. D. and Yang, F. Y. (1978) *Phytochemistry* **17**, 79.
- 30 Matile, P., Schellenberg, M. and Peisker, P. (1992) *Planta* **187**, 230.
- 31 Iliou, J. P., Jourdeuil, D., Robin, F., Serkiz, B., Guivarc'h, P., Volland, J. P. and Vilaine, J. P. (1992) *Lipids* **27**, 959.
- 32 Conn, P. F., Schalch, W. and Truscott, T. G. (1991) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **11**, 41.
- 33 Ferrari-Iliou, R., D'Arcy-Lameta, A., Lemome, Y., Pham Thi, A. T. and Zuily-Fodil, Y. (1994) *in press*.
- 34 Ashikawa, I., Kito, M., Satoh, K., Koike, H., Inoue, Y., Saiki, K., Tsukida, K. and Koyama, Y. (1985) *Photochem. Photobiol.* **46**, 269.
- 35 Vasquez-Tello, A., Zuily-Fodil, Y., Pham Thi, A. T., and Vieira Da Silva, J. (1990) *J. Exp. Bot.* **41**, 827.
- 36 Scholander, F., Hammel, H. T., Hemmingsten, E. A. and Bradstreet, E. D. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **52**, 119.
- 37 Gray, J. L. (1978) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **55**, 539.
- 38 Lezerovich, A. (1986) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 883.
- 39 Mackinnay, G. (1941) *J. Biol. Chem.* **140**, 315.

EFFECTS OF DROUGHT STRESS ON ENZYMATIC BREAKDOWN OF GALACTOLIPIDS IN COWPEA (*Vigna unguiculata* L.) LEAVES.

Campos Paula¹ and Pham Thi Anh Thu ²

¹ Dep.Fisiologia Vegetal, Estação Agronômica Nacional, 2780 Oeiras, Portugal; ²: Laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale, Université Paris 7 Denis Diderot, 2 Place Jussieu, F-75241 Paris Cedex 05, France, CNRS, URA 1183.

Introduction

Lipidic composition seems to be one of the main factors related to membrane resistance under water stress. Drought provokes a decrease in polar lipid content of leaves, the galactolipids (GL) being more affected than the phospholipids (PL) [1,2]. The decrease in GL content could be due to an increase in galactolipase activities and/or to a decrease in galactolipid biosynthesis. Studying two cultivars of *Vigna unguiculata*, Monteiro de Paula *et al.* [3] demonstrated that water stress stimulated the catabolism of galactolipids. These authors also found that changes in biosynthesis and degradation rates of leaf polar lipids were less pronounced in the drought-tolerant cultivar, possibly indicating a more stable cell membrane. Lipolytic acyl-hydrolases (LAH) and phospholipases play a major role in plant polar lipid degradation. Fatty acids (FA) resulting from LAH activity are the starting point for lipid peroxidation phenomena, which can in turn cause oxidation of membrane proteins and have damaging effects on the structure and function of the membrane El-Hafid *et al.* [4] demonstrated that, in cotton leaves, LAH activities for ¹⁴C-MGDG increased under water stress.

In this study we investigated changes in MGDG- and DGDG- LAH activities, in soluble and membrane fractions of leaf extracts prepared from three cultivars of *V. unguiculata* submitted to drought and differing in their degree of tolerance to water stress.

Materials and methods.

Three cultivars of *V. unguiculata* (cv. 1183, drought-sensitive, cv. EPACE and IT-83D, drought-resistant), were grown in previously described conditions [1]. Drought was imposed by withholding irrigation for a period of 6 to 10 days. ¹⁴C galactolipids used as LAH-I substrates were obtained supplying leaves with ¹⁴C acetic acid, sodium salt, for 36h. They were subsequently extracted and purified according to [1]. Water potential (Ψ) was followed with a pressure chamber [5]. 4-5g fresh weight leaves were fixed in liquid nitrogen and homogenised in 0.1M MES buffer, pH6.5, containing 1mM EDTA, 1 mM cystein, 5mM sodium metabisulfite, 5mM DTT and 0.5mM PMSF. After centrifuging, the supernatant was used as soluble enzymatic fraction. The pellets was resuspended in the same buffer containing 0.1M Triton X-100, and left for 15min for solubilizing the membrane proteins, recovered after centrifuging. ¹⁴C-MGDG- and ¹⁴C-DGDG-LAH activities were measured according to [4].

Results

Figures 1 and 2 present the LAH activity in the soluble (A) and membrane (B) fractions of leaf extracts. Activity levels for membrane enzyme are generally higher than those found for the soluble enzyme, in the 3 cv. under study. For both DGDG and MGDG-LAH activities, the 2 resistant cv. (EPACE and IT-83D) showed significant lower values than the sensitive cv. (1183), at all water potential values. Apart from the soluble MGDG-LAH activity (fig. 1 A.), in all other cases, LAH activities drastically increased

Fig.1 : Effect of water stress on the activity of MGDG-LAH in soluble (A) and membrane (B) fractions from *Vigna unguiculata* leaf extracts.

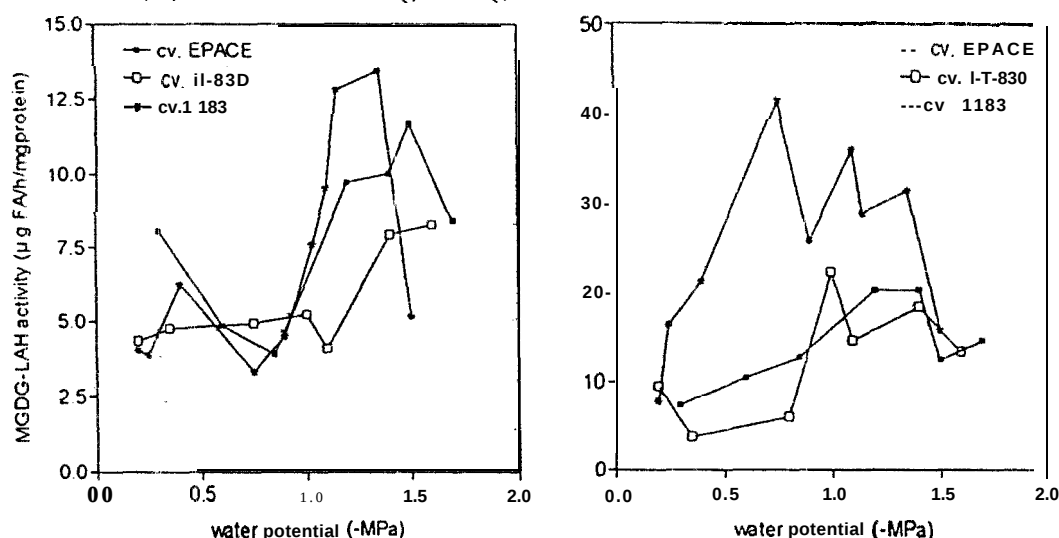
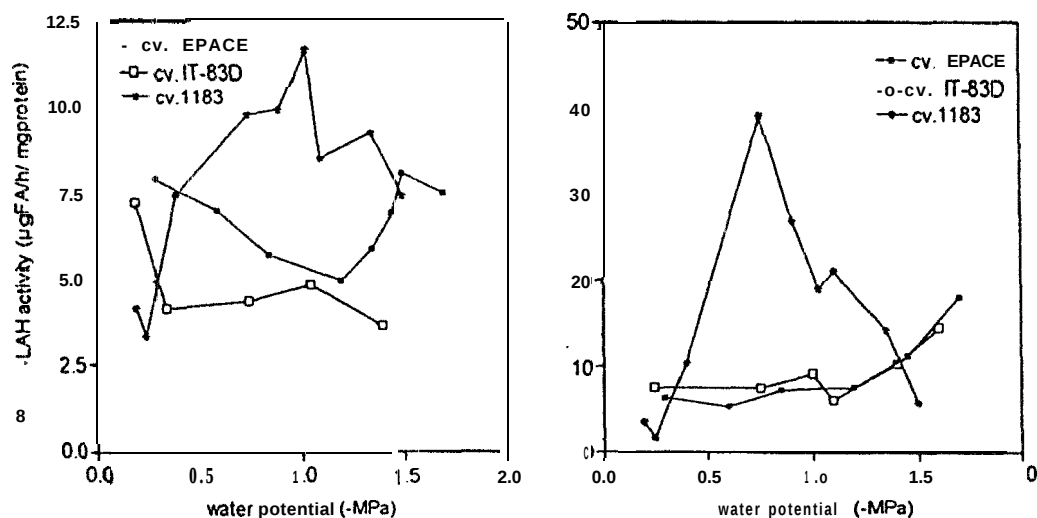


Fig.2 Effect of water stress on the activity of DGDG-LAH in soluble (A) and membrane (B) fractions from *Vigna unguiculata* leaf extracts



from the earliest stages of drought treatment in the sensitive cv. At the most severe water deficits, LAH activities decreased sharply in this cv., contrarily to the 2 more resistant cultivars. The sensitive cv. 1183 also presented the highest stimulation of the LAH activity, being 5 to 10-fold higher than the controls. Furthermore, those maximum values were reached at rather moderate water deficits (-0.7MPa). In the 2 resistant cv. EPACE and IT-83D, LAH activities did not vary to a great extent, the most significant changes being observed only for soluble MGDG-LAH activity.

Conclusion

It has been referred that in *Vigna unguiculata*, degradative phenomena in leaves submitted to dehydration are of the greatest importance, especially in species susceptible to drought [3]. An increase of LAH activities as well as a higher susceptibility of leaf lipid extracts to peroxidation may be at the basis of membrane disfunctions occurring under water stress [4,6]. In this study we observe that the activation of this enzyme, under water stress conditions, is different for the membrane or the soluble form of the enzyme. This is particularly evident in the sensitive cv. 1183

In previous studies, we have demonstrated that drought susceptible *Vigna* species present higher 18:3-MGDG content of their leaf membranes [7]. On the other hand, LAH preferentially degrades polyunsaturated MGDG molecular species [3,4]. It could therefore be expected that LAH activity causes more damage to membranes of sensitive cv., which seems to be the case from the present results.

References

- 1 Pham Thi AT, Borrel-Flood C, Vieira da Silva J, Justin AM and Mazliak P. Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochem* 1985;24:723-727.
- 2 Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Vieira da Silva J, Justin AM, Demandre C, Mazliak P. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Sci* 1990;66: 1 SS- 193.
- 3 Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y, Ferrari-Iliou R, Vieira da Silva J, Mazliak P. Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol Biochem* 1993;31:707-715.
- 4 El-Hafid L, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y, Vieira da Silva J. Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under stress; degradation of monogalactosyl-diacylglycerol. *Plant Physiol Biochem* 1989;27:495-502.
- 5 Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. Sap pressure in vascular plants. *Science* 1965;148:339-346.
- 6 Ferrari-Iliou R., d'Arcy-Lameta A, Iliou JP et al. In vitro photodynamic lipid peroxidation of total lipophilic extracts from leaves of bean plants. *Biochim Biophys Acta* 1993;1166:48-54.
- 7 Campos P, Pham Thi AT. Drought resistance and membrane lipids in *Vigna* sp. *Physiol Plant* 1990, 79:A113.

INVOLVEMENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN TOTAL LIPOPHILIC LEAF
EXTRACT SENSITIVITY TO PHOTOPEROXIDATION

Agnès D'Arcy-Lameta¹, Roselyne Ferrari-Iliou¹, Anh Thu Pham Thi^{1*}, Yves Lemoine² and Yasmine Zuily-Fodil¹

¹ Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale, Université Paris 7 Denis Diderot,
2 place Jussieu, case 7019, 75251 Paris cedex 05, France.

* URA 1180 CNRS

² Cytophysiologie Végétale et Phycologie, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex
et Photoregulation et Dynamique des Membranes Végétales, ENS,
46 rue d'Ulm, 75005 Paris.

Mail should be addressed to Dr A. d'Arcy-Lameta : Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale,
Université Paris 7 Denis Diderot, 2 place Jussieu, case 7019,
F-75251 Paris cedex 05, France.
telephone number: (33) 144 27 60 65
fax number: (33) 140 5 17108

Keywords : drought, fluorescence measurements, lipid photoperoxidation,
Phaseolus vulgaris L, xanthophyll cycle., zeaxanthin.

ABSTRACT

Total lipophilic leaf extracts (TLLE) of bean plants subjected to different levels of drought [control (C), mild (S1), severe (S2)] were photoperoxidized in an in vitro apparatus. Conjugated diene and triene pattern formations were higher for S1 and S2 than for control TLLE. In the photoperoxidation apparatus, chlorophyll a disappeared more rapidly than chlorophyll b and carotenoids. The delay observed for the formation of conjugated polyenic compounds in TLLE versus α -linolenic acid was due to the protective effect of photosynthetic pigments. Nevertheless, the weak differences in pigment composition between the three TLLE could not entirely explain the differences in the rates of polyenic pattern formations. We claim that leaf lipid composition and particularly the balance between the main classes of polar lipids could also play a role in the different in vitro peroxidation time-courses of TLLE. In vivo fluorescence measurements showed that drought had little influence on PSII and PSI functioning. HPLC analyses of carotenoid patterns of C, S1 and S2 plant extracts reveal antheraxanthin in S1 and S2 plants as well as zeaxanthin in S2 plants. We postulate that these pigments could play a role in the photoprotection and stabilization of the thylakoid membrane lipids of drought-stressed plants.

Abbreviations : 18:3n-3 = α -linolenic acid ; A = antheraxanthin ; chl = chlorophyll ; C, S1, S2 = control, mildly droughted, severely droughted plants ; DW = dry weight ; F_0 , F_M , F_V = initial, maximum, and variable fluorescence ; LHC (I or II) = light harvesting complex (I or II) ; TLLE = total lipophilic leaf extracts ; MGDG = monogalactosyldiacylglycerol ; Q_A^- = reduced quinone A , qE = fluorescence quenching ; MPa = megaPascal ; mTPP = mesotetraphenylporphine ; V = violaxanthin ; V + A + Z = pool size of xanthophyll cycle components ; Z = zeaxanthin.

INTRODUCTION

Drought is a harmful phenomenon which induces irreversible damage in plants leading to death in case of severe stress. Chloroplasts and particularly thylakoids which sustain photosynthetic activity are important targets for drought. Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), the main chloroplast lipids contain 70 to 80 % of α -linolenic acid (18:3n-3) [1]. Under drought conditions, the 18:3n-3 leaf content decreased (2, 3, 4), this decrease being more important for drought sensitive plant species than for drought resistant ones [5]. α -linolenic acid is particularly sensitive to degradative phenomena involving reactive oxygen species because of its polyenic structure [4, 6]. During photosynthetic processes, numerous reactive oxygen species (O_2 , $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) are generated [7, 8]. The primary source of $^1\text{O}_2$ appears to be the photosynthetic pigment bed [9]. Drought is known to accelerate senescence phenomena and to increase the production of these reactive oxygen species [10, 11, 12, 13]; it is also responsible for the polyunsaturated lipid bilayer destruction observed under high light stress [14]. We previously described an in vitro apparatus which allowed to follow lipid peroxidation induced by photochemically generated reactive oxygen species [4, 15, 16]. In this apparatus, the formation of conjugated polyenic pattern was considerably slower in TLLE from well-hydrated plants than peroxidation of pure 18:3n-3. Furthermore, drought treatment of plants increased TLLE susceptibility to reactive oxygen induced peroxidation [4, 16]. In our in vitro photoperoxidation experiments, identical quantities of 18:3n-3 were always used; therefore, the differences observed between results were not due to the polyunsaturated fatty acid content. A possible explanation could be the presence of more efficient protective mechanisms in well-hydrated leaf extracts which enabled a better resistance of their polyunsaturated lipids to photoperoxidation-induced damage. Among those protective compounds against peroxidative processes, carotenoids and especially β -carotene were prominent [4]; on the other hand, chlorophylls (chl) are known to induce the photoperoxidation of polyunsaturated lipids [10, 17, 18]. We observed that the chl *a*, chl *b* and carotenoid patterns of TLLE differed according to species and sensitivity to drought. Moreover, chl *a* decreased more sharply in droughted plants than chl *b* [16].

In the peroxidation apparatus the chl *a*, chl *b* and carotenoid levels can be calculated from UV-visible spectra. Carotenoid distribution had to be monitored by HPLC. Moreover, a lot of work was done on pigment composition (chlorophylls, carotenoids and particularly pigments of the xanthophyll cycle) in relation to high light stress [for a review, see 19] or cold and ozone stresses [for a review, see 20], but little was done in relation to drought stress [21, 22].

In the following study, carotenoid and chlorophyll patterns from control and droughted plant extracts were carried out in order to establish a relationship between susceptibility to photochemically induced peroxidation and content in photosynthetic pigments. As the photosynthetic apparatus when illuminated goes through several transitory stages known as induction phenomena, reflected by modifications of chl *a* fluorescence yield, photosystem (PS) integrity was studied in vivo by recording chl *a* fluorescence in leaves of control or droughted plants [20, 23, 24, 25].

MATERIALS AND METHODS

Materials

Mesotetraphenylporphyrin (mTPP) and α -linolenic acid (18:3n-3) were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA). Alcohols used were HPLC grade and obtained from Farmitalia Carlo Erba (Milano, Italy). Organic solvents used were HPLC grade and obtained from BDH (Broom Road Poole, U.K.). All other chemicals were analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals were used as received, with the exception of 18:3n-3 which was purified as previously described [4].

Plant material and drought treatment

Experiments were performed using a drought-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L (cv Carioquinha from Brazil). Plants were grown under conditions previously described [4] in a greenhouse and used when 3 week-old. Control plants were irrigated daily with a nutrition solution, while stressed plants were subjected to water deficit by withholding irrigation for 6 to 10 days. Water potentials were measured using a pressure chamber (PMS instrument, Corvallis, USA) as described [26]. Control (C) (well-hydrated) plants exhibited a water potential of -0.5 Megapascal (MPa) whereas droughted-plants exhibited water potentials of -1.5 MPa and -2.0 MPa corresponding respectively to mild (S1) and severe (S2) water deficit.

TLLE preparation and lipid analysis.

TLLE were prepared by solvent extraction and their content in 18:3n-3 was determined by gas liquid chromatography analysis as described [4].

Photoperoxidation procedure and UV-visible analysis.

The reaction was performed at 25°C in a glass apparatus as described [16]. In a routine experiment, 9.2 mg of purified 18:3n-3 or the equivalent amount from leaf extracts and 300 μ g of mTPP in a final volume of 25 ml of CC14 were irradiated in the reaction vessel. Pure 18:3n-3 was systematically purified as described [4] before use since this fatty acid is very sensitive to autooxidation. The final concentrations were 1.32 mM for 18:3n-3 and 17 μ M for mTPP. The total irradiation time for pure 18:3n-3 in presence of a mixture of chl *a* and *b* and β -carotene (1 % of each, respectively) was 240 minutes (min) and 200 μ l of the irradiated solution were sampled every 15 min for conjugated diene and triene measurements. In the case of plant extracts and of 18:3n-3 in presence of chl *a* and *b* and β -carotene (6 % of each, respectively), the total irradiation time was 360 min and aliquots were sampled every 30 min. For analytical procedures, the aliquot removed was rotary evaporated under vacuum and then analyzed, after resolubilisation in methanol, by UV-visible spectrophotometry.

The dried aliquots were solubilized in 600 μ l of methanol to obtain the equivalent of a 55 μ M solution of 18:3n-3. UV spectra were obtained using a scanning spectrophotometer (Perkin Elmer lambda 5, Norwalk, USA) from 190 nm to 320 nm, with methanol as a blank. Conjugated diene and triene patterns showed the expected absorbance maxima at 234-237 nm and 268 nm, respectively [27]. The UV spectral results were expressed as absorbance at 235 nm and 268 nm per μ M of equivalent initial concentration of 18:3n-3. Rates of conjugated polyenic pattern formation were calculated in the most linear part of the curves, between 270 and 330 min of irradiation. On the same aliquots, spectra from 190 nm to 700 nm were obtained. These spectra were used to quantify chl *a* and *b* and carotenoids in the photoperoxidation apparatus using the Mackinney formula [28].

Preparation of leaf-disk samples and carotenoid extraction

For carotenoid extraction, leaf disks (4.9 cm², 92 ± 9 mg fresh weight and 15.8 ± 0.2 mg DW) were punched from fully developed leaves of C, S1 and S2 plants and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C. Ten leaf disks from 4 to 5 different leaves were ground in a cold mortar in methanol under nitrogen, under dim laboratory light. Leaf suspensions were divided into ten microcentrifuge tubes, centrifuged at 1500 g for 5 min (Sigma, 201 M, USA) and the resulting supernatant saved. The pellets were reextracted as above to ensure complete extraction of pigments. The supernatants were pooled and then filtered through minisart SRP 25 (Sartorius, Göttingen, Germany). The pigment extracts were rotary evaporated at room temperature and kept dried at -80°C under nitrogen.

Pigment analysis

Pigment analysis was carried out by reversed phase HPLC with a procedure slightly modified from the method of Gilmore and Yamamoto [29] which allows a good separation of lutein and zeaxanthin. The pigments were separated with a 5 µm Spherisorb ODS-1 column (Altech Inc.) operating on a solvent gradient of 0-40 % methanol / ethyl acetate (68 : 32, v/v) in acetonitrile / methanol / water (72 : 8 : 3, v/v/v). A HP 1040 A diode array detector permitted the on-line monitoring of absorption spectra and integration of carotenoids and chlorophylls at their absorption maxima. Quantification of pigments was allowed by calibration of the detector response with standards using the coefficients calculated by Vernon [30] for the chlorophylls and pheophytins and those published by Britton [31] for the carotenoids.

Fluorescence measurements

Fluorescence induction kinetics were made with a PAM fluorometer (H. Walz, Effeltrich, Germany). After a dark adaptation period, the leaves were submitted to the modulated measuring beam alone and with the addition of a 1 sec pulse of saturating white light to determine respectively the FO and FM levels. The fluorescence transients were induced by a saturating white light given by a flash lamp (Schott, KL 1500). The signal detected by the fluorometer was recorded with a microcomputer through a 12 bit analogic-digital converter. A home-made software [32] allowed to average the experimental data and store the kinetics. The slow fluorescence transients are subdivided in several phases passing through various levels classically denominated O, I, D, P, S, M, T, [33]. These abbreviations will be used such a denomination in this paper. A semi-logarithmic plot of the dark decay kinetics of fluorescence yield from Fp to FO after a multiple turn-over pulse of saturating light allows to measure the times needed for full reoxidation of reduced quinone A (QA⁻) [34].

RESULTS

Two types of molecular damage were monitored in the photoperoxidation apparatus : lipid peroxidation and destruction of chl *a*, chl *b* and carotenoids.

Time-course of in vitro photoperoxidation of standardized TLLE from control bean plants

Reactive oxygen species, photochemically generated, induced the peroxidation of TLLE standardized in their 18:3n-3 content at 1.32 mM. The results (Fig. 1B) compared to those obtained with purified 18:3n-3 at identical concentration (Fig. 1A), showed that the formation of conjugated polycyclic patterns was considerably slower. For purified 18:3n-3, it was possible to follow and distinguish 3 phases during the 240 min of irradiation as described before [4]. In contrast, for TLLE

from C plants, it was only possible to observe the first phase corresponding to the mono-hydroperoxidation after 360 min of irradiation. Although, purified 18:3n-3 was completely oxidized into aldehydic products in a 240 min irradiation time, for C plants, the maximum plateau of conjugated diene patterns was not obtained after 360 min of irradiation. Almost no conjugated triene patterns were formed during the same period.

Time-course of in vitro photoperoxidation of standardized TLLE from control or droughted bean plants

Rates of formation of conjugated diene and triene patterns were calculated between 270 and 330 min after the beginning of irradiation (Fig. 2).

As far as conjugated diene pattern formation is concerned, TLLE from S1 and S2 plants exhibited rates 1.4 and 2.1 times higher than TLLE from C plants, respectively. The rates of formation of conjugated triene patterns were 2.2 and 3.4 higher for S1 and S2 than for C plant extracts, respectively.

Effect of a mixture of chlorophyll a + chlorophyll b + b-carotene on the time-course of photoperoxidation of pure 18:3n-3

The protection capacity of a mixture of pigments (chl a and b + b-carotene) at 1 % (1 mole of each pigment for 100 moles of oxidizable substrate, 18:3n-3) or 6 % (6 moles of each pigment for 100 moles of 18:3n-3) respectively was tested on the time-course of pure 18:3n-3 photoperoxidation. It was previously shown that 1% b-carotene alone totally inhibited the conjugated diene pattern formation during the first 60 min of irradiation but after this time, the curve was similar to that of the pure 18:3n-3 conjugated diene pattern one [4]. Figure 3 shows that in presence of mixtures of chl. a, b and b-carotene (1 and 6 % molar ratio), this maximum was only delayed by 45 min with the 1% concentration pigment (Fig. 3 A) and by 105 min with the 6% one (Fig. 3 B). Moreover, for the 60 min following the beginning of irradiation corresponding to the inhibition observed with b-carotene alone [4], the conjugated diene amount was 70 % lower with the 6 % mixture than with the 1 % one.

Effect of photoperoxidation induced by reactive oxygen species on absorption spectra of TLLE from control plants

The recording of spectra between 190 to 700 nm before the beginning and after 180 and 360 min of irradiation, respectively, allowed us to observe the formation of conjugated diene and triene patterns concomitantly with the disformation of pigment absorption peaks (Fig. 4). Before the beginning of irradiation (C_{zero}), the spectrum exhibited 5 major peaks corresponding respectively to chlorophylls (663 nm, peak G), carotenoids + chlorophylls (435 nm, peak E) and (468 nm, peak F), mTPP (the photosensitizer, 410 nm, peak D) and non conjugated double bond structures (especially 18:3n-3, 203 nm, peak A).

After 180 min of irradiation (C₁₈₀), the peaks corresponding to pigments (663, 435 and 468 nm, peaks G, F, E) had nearly disappeared whereas conjugated dienes began to appear (235 nm, peak B).

Between 180 and 360 min (C₃₆₀), a major peak found at 235 nm (peak B) correspond to conjugated diene patterns and a minor peak at 268 (peak C) corresponding to conjugated triene patterns.

Effect of irradiation duration on pigment content of TLLE in the photoperoxidation apparatus

Before the beginning of irradiation (Fig. 5), TLLE of C plants standardized at 1.32 mM in their 18:3n-3 content contained higher pigment (chl *a* and *b* and carotenoid) levels than SI or S2 plant extracts. During the first 30 min of irradiation, in C plant extracts, a 60 % decrease of chl *a* levels occurred whereas a moderate 30 % reduction was observed for chl *b* and carotenoid contents. In S 1 and S2 plants, a 56 % reduction of chl *a* content was observed, while the decrease of chl *b* and carotenoid levels was respectively 25 % and 30 %. From 30 to 90 min, for C, S 1 and S2 TLLE, the decrease of pigment contents was continuous and regular (Fig. 5). From 90 min until the end of irradiation, the decrease of pigment content remained unchanged as shown by the profiles of spectra (Fig. 4).

In vivo effect of drought on leaf pigment levels

Results in Table 1 showed that moderate drought (S1) had no effect on chl *b* and total carotenoid levels, whereas chl *a* decreased from 7.13 ± 0.52 to $5.76 \pm 0.42 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$. Severe drought affected pigment levels in different ways. In S2 plants, a decrease of about 50 % of chl *a* and carotenoid levels was observed in comparison with C plants. Chl *b* level showed a 37 % decrease. As regards the distribution of the different classes of carotenoids, drought increased the xanthophyll percentage from 68.5 % to 78.9 % of total carotenoids with a concomitant decrease in b-carotene percentage (3.14 % to 2.11 % of total carotenoids). Violaxanthin and b-carotene levels decreased sharply (-39 % and -33 %, respectively) and at the same time, new xanthophylls (antheraxanthin and zeaxanthin) were formed (3.9 % and 7.2 % of total carotenoids, respectively).

In comparison with C plants, the total xanthophyll cycle pigment pool (V + A + Z) of leaves from S2 plants increased from 14.7 to 20.2 %. In C plants, violaxanthin was the only xanthophyll of the xanthophyll cycle and there was no detectable zeaxanthin nor antheraxanthin. Antheraxanthin appeared in SI plants and zeaxanthin was present in S2 plants. Whereas a 47 % decrease of carotenoid content was observed in S2 plants, this reduction was only 15 % when the sum V + A + Z (in $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$) was taken into account (Fig. 6).

Fluorescence measurements

The extent of variable fluorescence was poorly modified by a drought treatment : the ratio $F_p - F_0 / F_p$ shifted from 0.80 in C leaves to respectively 0.77 and 0.71 in S 1 and S2 ones. The steady-state level of fluorescence F_T was no more modified. The ratio $F_T - F_0 / F_p - F_0$ increased from 0.18 in C and S 1 to 0.23 in S2 plant extracts. In contrast, the fluorescence kinetics slackened with increasing drought : the fluorescence time-course of P to M maximum levels was accomplished in 84 sec for C, 163 and 244 sec for S 1 and S2 leaves respectively. The time needed for full reoxidation of Q_A^- was 18 sec for C as well as 27 sec for S 1 and S2 leaves.

DISCUSSION

During the time course of in vitro photoperoxidation of TLLE of *Phaseolus vulgaris*, the conjugated diene formation began three hours after the onset of irradiation and no formation of conjugated trienes was observed. During the same irradiation duration (i. e. 3 hours) pure 18:3n-3 was completely oxidized (Fig. 1). After the same irradiation duration, conjugated polyenic pattern

formation was faster in droughted plant extracts as compared to C plant extracts (Fig. 2) These results confirmed our precedent results obtained with *P. vulgaris* [4] and *Vigna unguiculata* [16].

In order to reproduce in vitro the effect of pigments in leaf extracts, pure 18:3n-3 photoperoxidation was carried out with the addition of a mixture of chl *a*, chl *b* and b-carotene. At 1% molar ratio, the pigment mixture had only a slight protective effect on the photoperoxidation of pure 18:3n-3 (fig 3A). At 6 % molar ratio the delay for conjugated polyenic pattern formation was much longer and the maxima were attained only after 240 min for dienes and 270 for trienes (fig. 33).

Concurrently, UV-visible spectra analyses were performed at different times of in vitro peroxidation to follow the action of reactive oxygen species on photosynthetic pigment content. Conjugated polyenic pattern began to form when pigments had nearly disappeared. This again strongly indicates a protective effect of the photosynthetic pigments. Since the peaks corresponding to pigments disappeared after 180 min of exposition to reactive oxygen species (Fig. 4), more precise analyses were made during the first 90 min time period of irradiation (Fig. 5). In the three cases, a regular decrease in pigment content was observed; however, this decrease was more important during the first 30 min for chl *a* than for chl *b* and carotenoids. This phenomenon was more pronounced in S1 and S2 than in C plant extracts.

These results allowed us to explain the behaviour of TLLE in the peroxidation apparatus. It should be remembered that they are standardized for their 18:3n-3 content. The total pigment content of C is higher than that of S1 and S2 plant extracts (Fig. 5). The carotenoids / chl (*a+b*) ratio is nearly similar (0.29) in the 3 cases. During the first 90 min of irradiation, a regular decrease in pigment content was observed and after this time, there were more remaining pigments in peroxidized C extracts than in peroxidized S1 or S2 ones. All these observations may explain the longer delay observed in vitro for conjugated polyenic pattern formation in TLLE from well-hydrated plants than from drought-stressed plants.

Now, when we compared the in vitro behaviour of TLLE from S1 and S2 plants, we observed that the rates of formation of conjugated polyenic patterns were higher for S2 than for S1 (Fig. 2). However, the total pigment repartition and concentration of chl *a*, chl *b* and total carotenoids between TLLE from S1 and S2 plants were similar (Fig. 5). The decrease of these different pigment contents was also the same during the first 90 min of irradiation. Then the differences observed in the rate of formation of polyenic structures could be brought either by different carotenoid patterns or by different lipid composition.

HPLC analysis of C, S1 and S2 plant extracts (Table 1) afforded important results concerning the presence and the distribution of the different carotenoids. For C plants, the pigment distribution appeared to be approximately the same as compared to other green plants (36). Under drought, a decrease in leaf carotene content with a correlative increase in xanthophylls was observed. Between S1 and S2 plant extracts, it appeared a slight different repartition in the xanthophylls (Table 1) which could be responsible for the differences observed in the rates of peroxidation. Then, S1 and S2 leaf carotenoid content and distribution were calculated in three different respects: a) the calculation of the carotenoid double bond index gave approximately similar results for S1 and S2, b) the carotenoid formulae revealed a little more OH groups and epoxy cycles in S2 than in S1 TLLE, c) the calculation of the quenching effect of carotenoids as described by Conn et al. (37) and Di Mascio et al. (38) gave similar results for S1 and S2. Consequently, it appears that the differences observed between carotenoid pigment content and distribution in S2 and S1 leaf extracts are too small to explain the different rates of conjugated polyenic pattern formation in the in vitro peroxidation apparatus.

A work carried out on *Vigna unguiculata* cv. IT83D, a species of the same tribe Phaseolidae than *P. vulgaris* cv. Cariquinha, showed differences in the effects of drought on the repartition

between the two great lipidic classes, galactolipids and phospholipids [6]: S1 leaf extracts contained 56 % galactolipids and 32.8 % phospholipids as compared to 34 % galactolipids and 50 % phospholipids in S2 leaf extracts. Phospholipid polar headgroups being more protonated than that of galactolipids they have a greater influence on the lipid hydroperoxide dependent initiation of lipid peroxidation [39]. In the in vitro apparatus, when the protection provided by pigments disappeared (after 90 min irradiation), peroxidation started more rapidly in S2 than in S1 and C extracts. WC claim that the difference of balance observed between the 2 great classes of lipids can influence the difference of in vitro peroxidation rate in TLLE. Once the peroxidation reaction initiated, an amplification effect will accelerate it as much as the phospholipid content is greater than the galactolipid one.

When leaf extracts of C, S1 and S2 plants were analysed by HPLC, the results (Table 1), showed that the chl *a* content appeared to be more drought-sensitive than chl *b*. In the peroxidation apparatus, chl *a* appeared to be also more sensitive to photodestruction than chl *b* and carotenoids (Fig. 5). In chloroplasts, we know that chl *a* is in the photosynthetic reaction centre and is responsible for triplet mediated $^1\text{O}_2$ formation. Prolonged illumination of the isolated PSII reaction centre under aerobic conditions caused a selective photodestruction of chl *a* with maximal absorption at 680 nm [40]. It was also found out that chl *a* appeared to be destroyed more readily than chl *b* by free radical mechanisms [41] and that under desiccation, as pigment destruction continues, the chloroplast capacity to generate reactive oxygen species through the photosynthetic apparatus will also diminish [9]. Such a phenomenon could protect photosystems.

In parallel with in vitro experiments, in vivo fluorescence measurements on control and droughted plants were carried out. The fluorescence rise time-course is influenced by the various components of the electron transport chain [42]. The great stability of variable fluorescence ($F_p - F_0 / F_p$) in the various leaves can be correlated with a very faint loss of PS II integrity with drought. These results agree with those obtained by different authors [21, 22, 23, 24, 25, 43, 44]. Similarly PSI does not seem to be greatly altered as shown by the very low rise of the terminal fluorescence level F_T . It was also previously shown that PSI resists relatively well under water stress [23, 25, 44]. In contrast, the rate of polyphasic fluorescence yield decline slackens with increasing drought. These slow fluorescence changes may be attributed to a fall in the efficiency of electron transfer and of the flux of reducing equivalents through the electron transport chain [33]. A similar observation was made about marine algae by Wiltens et al. [45] who showed that the first reaction to be affected by desiccation is electron transport between PSI and PSII, with a sensitive site most likely between the plastoquinone pool and PSI reaction center.

In plants, drought induced a primary slow down of photosynthesis by stomatal closure. Under such conditions, the high photon flux could not sustain photosynthetic CO_2 fixation and formed in chloroplasts various reactive oxygen species which could cause a photooxidative degradation of pigments and lipids [13, 46].

Carotenoids are known to be good quenchers of reactive oxygen species and among these the major physiological and photosynthetic function of *b*-carotene is photoprotection of chlorophylls in PS I and II [36]. In drought-stressed leaves, the diminution of carotene percentage (Table 1) can be due to its destruction by free radical mechanisms.

It may be observed (Table 1) that the main change in carotenoid distribution is the operation under drought of the xanthophyll cycle in the presence of antheraxanthin in S1 plants (2 % of total carotenoids) and antheraxanthin and zeaxanthin in S2 plants (3.9 and 7.2 % of total carotenoids respectively). The $V+A+Z$ sum expressed in mol. g^{-1} DW decreased slightly in S2 compared to C plants (Fig. 6), when at the same time the carotenoid amount decreased by 47 % (Table 1). The formation of zeaxanthin could be due either to transformation of violaxanthin or to synthesis from *b*-carotene as the total amount of *b*-carotene + $V+A+Z$ is relatively constant between C (42.7 %) and

S2 (40.1 %) plant extracts. These results are in agreement with those obtained in drought-stressed *Nerium oleander* [21] and *Gossypium hirsutum* [22].

In the case of high-light stress, the xanthophyll cycle has been implicated in energy dependent mechanism of fluorescence quenching (qE). Zeaxanthin and antheraxanthin can be the quenchers and contribute to dissipate thermal energy [19, 29]. Zeaxanthin might also function as an amplifier of the qE formation perhaps by activation of the LHCII aggregation [47]. It was shown [48], that zeaxanthin and antheraxanthin were not exclusively responsible for the qE mechanism and that substantial amounts of free xanthophylls were found in the thylakoid membrane of intermittent-light-grown peas. This last result was in agreement with an hypothesis developed by Havaux and Gruszecki [34]: according to them, zeaxanthin exerts a noticeable ordering effect on the galactolipid bilayer with the pigment molecule being anchored in the 2 opposite polar regions of this bilayer. These authors concluded that thylakoid membranes, due to their lipid composition with polyunsaturated fatty acids, are very sensitive targets for photodestruction by reactive forms of oxygen. These lipids lack a photoprotector and consequently accumulation of zeaxanthin would be highly beneficial under high-light stress. Moreover the zeaxanthin-induced decrease in lipid fluidity will reduce membrane permeability to small molecules, e.g. oxygen.

In contrast to observations on barley [49], no important modifications of the carotenoid/chlorophyll ratio could be noticed in droughted bean leaves and we failed in our search for xanthophyll esters. The role of these esters is still unknown but their occurrence is related to leaf stress status. The absence of acylated carotenoids in droughted bean leaves might be due to a better preservation of thylakoid membranes related with the accumulation of zeaxanthin which was absent in barley.

The presence in thylakoid membranes of a large amount of polyunsaturated MGDG required stabilization by some unknown factors to form the thylakoid bilayer. Some possible stabilizing factors are the large amounts of transmembrane protein complexes (PSI, PSII, LHC, Cytochrome b6/f and ATP synthase) [50]. Under drought stress, the number of photosystems in each chloroplast decreases [51], which could reduce the extent of their stabilizing role and then the presence of antheraxanthin and zeaxanthin even at low levels would be beneficial to drought-stressed plants. As a conclusion, we claim that the accumulation of antheraxanthin and zeaxanthin would provide photoprotection and stabilization of photosynthetic membranes under drought stress.

Acknowledgements : This work was supported by a grant of European Community (STD program). We thank Mrs Tashakorie A., Mr Paresys G., Mr Zabulon G. for skillfull technical assistance. Mr Rivet J.M. and Mr Iliou J.P. critically read this manuscript.

REFERENCES

- 1 Benson, A.A. (1964) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 15, 1-16.
- 2 Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A.T. and Vieira Da Silva, J. (1984) *Physiol. Plant.* 62, 219-224.
- 3 Pham Thi, A.T., Vieira Da Silva, J. and Mazliak, P. (1990) *Bull. Soc. Bot. (France)* 137, 99-114.
- 4 Ferrari-Iliou, R., D'Arcy-Lameta, A., Iliou, J.P., Pham Thi, A.T., Monteiro De Paula, F., Vieira Da Silva, J. and Mazliak, P. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1166, 48-54.
- 5 Monteiro De Paula, P., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou, R., Vieira Da Silva, J. and Mazliak, P. (1993) *Plant Physiol. Biochem.* 31, 707-715.
- 6 Frankel, E.N. (1985) *Prog. Lipid Res.* 23, 197-221.
- 7 Leshem, Y.Y., Halevy, A.H. and Frenkel, C. (1986) *Processes and control of plant senescence*, pp 84-99. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 8 Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*, pp 277-298. Clarendon Press, Oxford.
- 9 Foyer, C.H. and Harbinson, J. (1994) in *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (Foyer, C.H. and Mullineaux P.M., eds), pp 1-41. CRC press, Boca Raton.
- 10 Halliwell, B. (1987) *Chem. Phys. Lipids* 44, 327-340.
- 11 Price, A.H., Atherton, N.M. and Hendry, G.A.F. (1989) *Free Rad. Res. Comm.* 8, 61-66.
- 12 Asada, K. (1992) in *Molecular biology of free radical scavenging systems* (Scandalios, J.G., ed), pp 173-192. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- 13 Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A.T., Mazliak, P. and Vieira Da Silva, J. (1992) *Ann. Biol.* 31, 1-23.
- 14 Demmig-Adams, B. and Adams III, W.W. (1992) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599-626.
- 15 Iliou, J.P., Jourdeuil, D., Robin, F., Serkiz, B., Guivarc'h, P., Volland J.P. and Vilaine, J.P. (1992) *Lipids* 27, 959-967.
- 16 Ferrari-Iliou, R., D'Arcy-Lameta, A., Pham Thi, A. T., Zuily-Fodil, Y. and Mazliak P. (1994) *Phytochemistry*, in press.
- 17 Le Tutour, B. (1990) *Phytochemistry* 29, 3759-3763.
- 18 Kubow, S. (1992) *Free Rad. Biol. Med.* 12, 63-81.
- 19 Demmig-Adams, B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* 1020, 1-24.
- 20 Young, A.J. (1991) *Physiol. Plant.* 83, 702-708.
- 21 Demmig, B., Winter, K., Krüger, A. and Czygan, F.G. (1988) *Plant Physiol.* 87, 17-24.
- 22 Brugnoli, E. and Björkman, O. (1992) *Planta* 187, 335-347.
- 23 Genty, B., Briantais, J.M. and Vieira Da Silva, J. (1987) *Plant Physiol.* 83, 360-364.
- 24 Dreyer, E. and Epron, D. (1990) in *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides* (Libbey, J. Eurotests eds.), pp 67-85 Montrouge, France.
- 25 Havaux, M. (1992) *Plant Physiol.* 100, 424-432.
- 26 Scholander, F., Hammel, H.T., Hemmingsten, E.A. and Bradstreet, E.D. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* 52, 119-125.
- 27 Gray, J.I. (1978) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55, 539-546.
- 28 Mackinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 315-322.
- 29 Gilmore, A.M. and Yamamoto, H.Y. (1991) *J. Chromat.* 543, 137-145.
- 30 Vernon, L.P. (1960) *Anal. Chem.* 32, 1144-1150.
- 31 Britton, G. (1985) in *Methods in enzymology*, vol. 111 Steroids and isoprenoids (Law, J.H. and Rilling, H.C. eds.), Part B, pp 113-149 Acad. Press Inc, New York.
- 32 Arsalane, W., Rousseau, B. and Duval, J.C. (1994) *Photochem. Photobiol.* 60, 237-243.

- 33 Papageorgiou, G. (1975) in Bioenergetics of photosynthesis (Govindjee ed), pp 320-37 I Acad Press Inc, New York.
- 34 Havaus, M. and Gruszecki, W.I. (1993) Photochem. Photobiol. **58**, 607-614.
- 35 Lezerovich, A. (1986) J. Am Oil Chem. Soc. **63**, 883-888.
- 36 Lichtenthaler, H.K. (1993) in Lipid metabolism in plants (Moore, Jr T.S. ed.), pp 427-470 CRC Press, Boca Raton.
- 37 Conn, P.F., Schalch, W. and Truscott, T.G. (1991) J. Photochem. Photobiol. **11**, 41-47.
- 38 Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H. (1989) Arch. Biochem. Biophys. **274**, 532-538.
- 39 Tadolini, B., Fiorentini, D., Motta, P., Cabrini, L. and Sechi, A.M. (1992) Biochem. Intern **26**, 275-285.
- 40 Telfer, A., Wei-Zhong, H. and Barber, J. (1990) Biochim. Biophys. Acta **1017**, 143-151.
- 41 Peiser, G. D. and Yang, F. Y. (1978) Phytochemistry **17**, 79-84.
- 42 Krause, G.H. and Weis, E. (1984) Photosynth. Res. **5**, 139-157.
- 43 Cornic, G., Le Gouallec, J.L., Briantais, J.M. and Hodges, M. (1989). Planta **177**, 84-90.
- 44 Meyer, S., Phung Nhu Hung, S., Trémolières, A. and de Kouchkovsky, Y (1992) Photosynth. Res. **32**, 95-107.
- 45 Wiltens, J., Schreiber, U. and Vidover, W. (1978) Can. J. Bot. **56**, 2787-2794.
- 46 Vick, B.A. (1993) in Lipid metabolism in plants (Moore Jr, T.S. ed), pp 167-191 CRC Press, Boca Raton.
- 47 Ruban, A.V., Young, J. and Horton P. (1993) Plant Physiol. **102**, 741-750.
- 48 Jahns, P. and Krause, G.H. (1994) Planta **192**, 176-182.
- 49 Barry, P., Evershed, R.P., Young A., Prescott, M. C. and Britton, G. (1992) Phytochemistry **31**, 3163-3168.
- 50 Selstam, E. and Widell Wigge, A. (1993) in Pigment protein complex in plastids : Synthesis and assembly (Sundqvist, C. and Ryberg, M. eds.), pp 241-277 Acad Press Inc, San Diego.
- 51 Pham Thi, A.T. and Vieira da Silva, J. (1975) C.R. Acad. Se. Paris **280**, 2857-2860.

Table I :

Effect of drought on leaf pigment levels (chlorophylls and carotenoids, expressed in $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ DW}$) and on the distribution of carotenoid classes (expressed in % of total carotenoids).

Pigments	Control	S1	s2
	$(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW})$		
Chlorophyll <i>a</i>	7.13 ± 0.52	5.76 ± 0.42	3.32 ± 0.17
Chlorophyll <i>b</i>	1.97 ± 0.15	2.02 ± 0.10	1.24 ± 0.08
Total Carotenoids	2.26 ± 0.17	2.13 ± 0.15	1.18 ± 0.12
Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>	3.6	2.9	2.7
Car/ Chl	0.25	0.27	0.26
	(% of total carotenoids)		
<u>Carotenes</u>	31.4	25.6	21.1
α -Carotene	2.4	1.2	1.2
β -Carotene	29	24.4	19.9
<u>Xanthophylls</u>	68.5	74.3	78.9
Lutein	37.7	45.3	46.0
Zeaxanthin	-	-	7.2
Antheraxanthin	-	2.0	3.9
Violaxanthin	14.7	12.4	9.0
V + A + Z	14.7	14.4	20.2
Neoxanthin	13.2	10.0	10
Lutein 5,6 epoxide	2.9	4.6	2.8

Ten leaf discs of 3 week-old **bean** plants were punched from **fully** developed leaves. Plants were well-hydrated (C), moderately-droughted (S1) and severely-droughted (S2). All samples were immersed in liquid nitrogen within 2-5 sec upon **removal** from the leaves. HPLC analysis was performed after methanol extraction of pigments. **Each** value represents a **mean** of three separate samples taken from different leaves and different plants.

LEGENDS OF THE FIGURES

Fig. 1 Panel A : Time-course of the production of conjugated patterns and evolution of peroxidation products during photoperoxidation of 18:3n-3 (1.32 mM) in the presence of mesotetraphenylporphine (mTPP) (17 IM). Conjugated diene (circles) and triene (triangles) patterns are expressed as milliAbsorbance (mAbs) at 235 nm and 268 nm . IM^{-1} equivalent initial 18:3n-3, respectively, as a function of irradiation duration. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. for seven experiments.

Panel B : Time-course of the production of conjugated patterns and evolution of peroxidation products during photoperoxidation of total lipophilic extracts from leaves of well-hydrated, (-0.5 MPa) (C) bean plants standardized at 1.32 mM in their content of 18:3n-3 in the presence of mTPP (17 IM). One measure every 30 min. Conjugated diene (circles) and triene (triangles) patterns are expressed as mAbs at 235 and 268 nm IM^{-1} equivalent initial 18:3n-3, respectively as a function of irradiation duration. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. for triplicate.

Fig. 2. Rates of conjugated diene (235 nm) (left panel) and triene (268 nm) (right panel) formation between 270 and 330 min during photoperoxidation of C, S 1 and S2 TLLE. Results are: expressed in mAbs IM^{-1} equivalent initial 18:3n-3 per minute, as mean $\pm$ S.E. for triplicate.

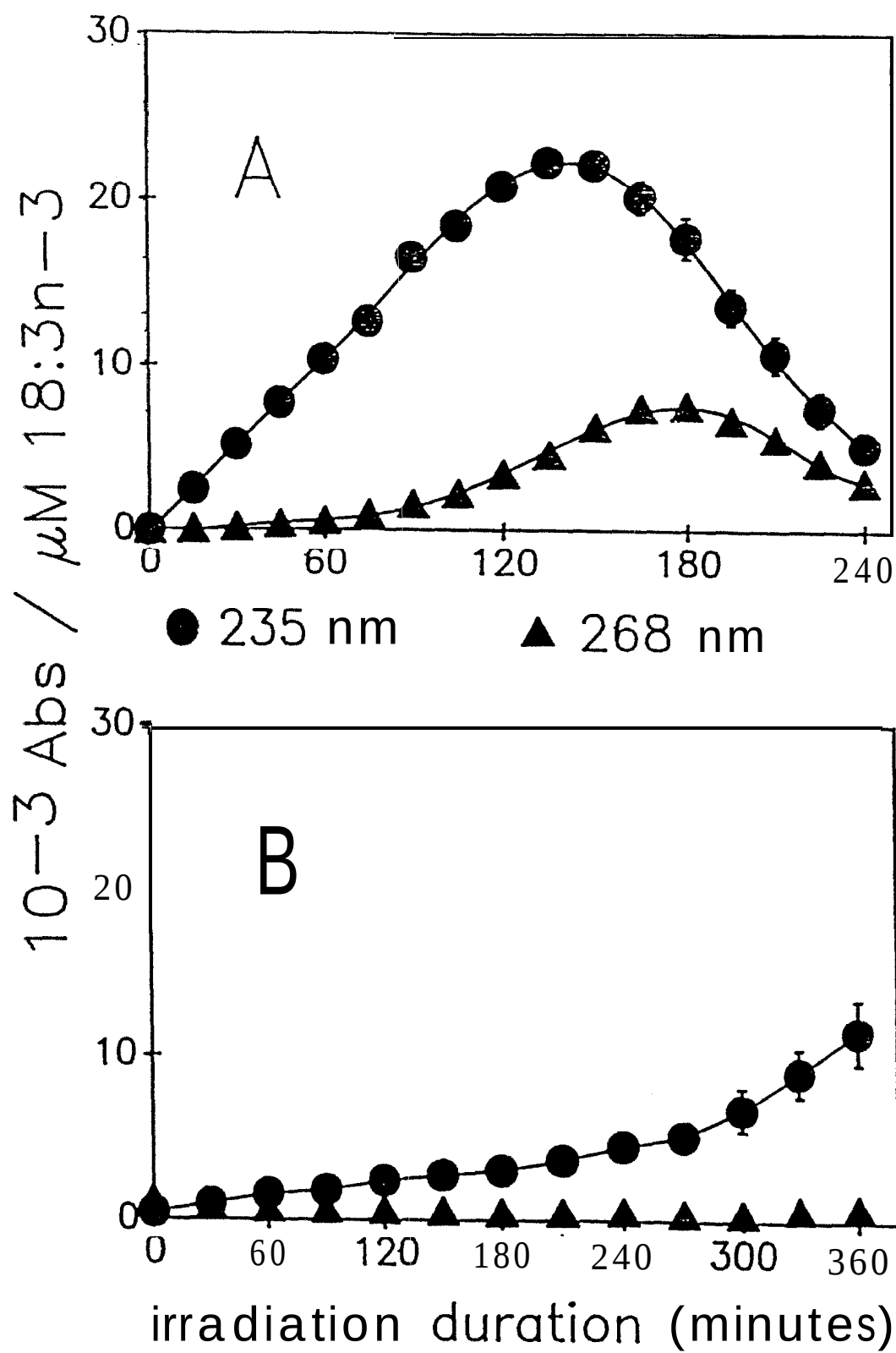
Fig. 3. Effect of a mixture of chl a, chl b, b-carotene (13.2 IM for each respectively, panel A or 69.2 IM for each respectively, panel B) on the time-course of the production of conjugated diene (circles) and triene (triangles) patterns during photoperoxidation of 18:3n-3 (1.32 mM) in the presence of mTPP 17 IM.

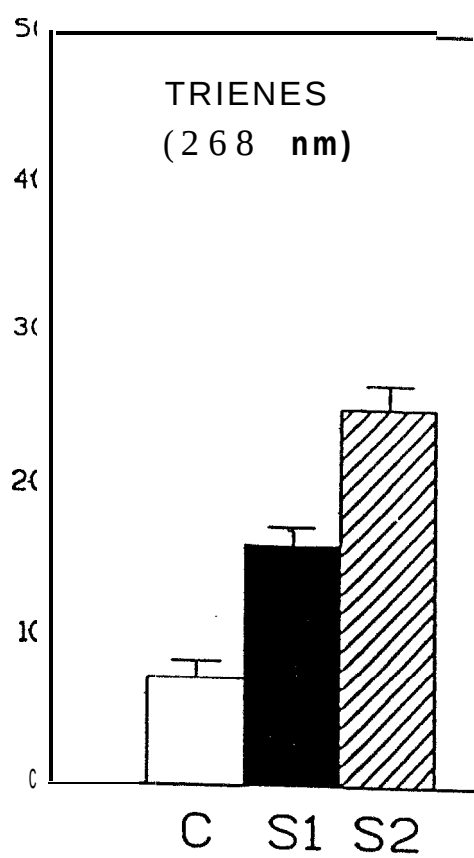
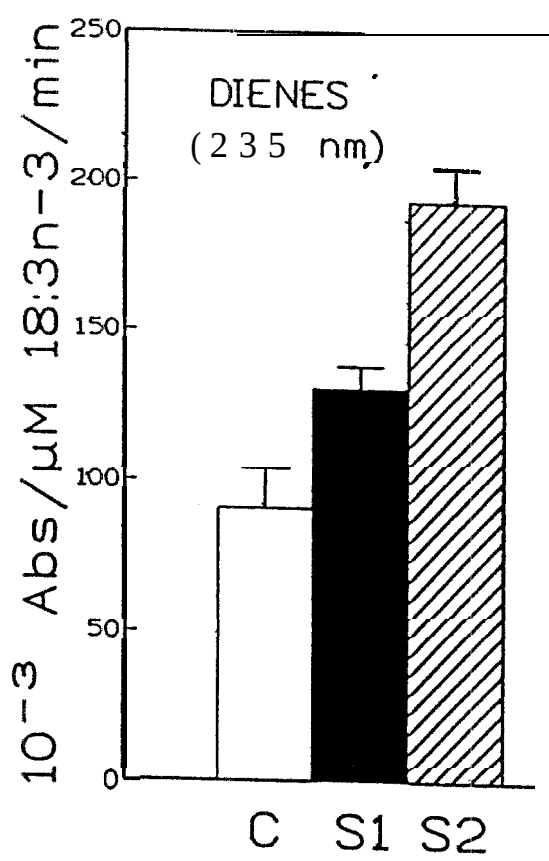
Fig. 4. Control plant TLLE absorbance spectra recorded between 190 and 690 nm. 200 μl aliquots were sampled in the photoperoxidation apparatus before (Czéro), 180 (C 180) or 360 min (C360) after the beginning of irradiation.

Peak A, 203 nm, non conjugated double bond structures (especially 18:3n-3); peak B, 235 nm, conjugated diene structures; peak C, 268 nm, conjugated triene structures; peak D, 410 nm, mTPP (the photosensitizer); peak E, 435 nm, peak F, 468 nm, carotenoids + chlorophylls; peak G, 663 nm, chlorophylls.

Fig. 5. Evolution of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid content during photoperoxidation of C, S 1 and S2 TLLE at 0, 30, 60 and 90 min after the beginning of irradiation. Results are expressed in mM as mean $\pm$ S.E. for triplicate.

Fig. 6. Xanthophyll cycle pigment composition in bean leaf extracts prior to (C) and following drought exposure (S1 and S2). Each value represents a mean of three separate samples taken from different leaves and different plants. Results are expressed in IM g^{-1} DW. V, Violaxanthin; A, Antheraxanthin; Z, Zeaxanthin.





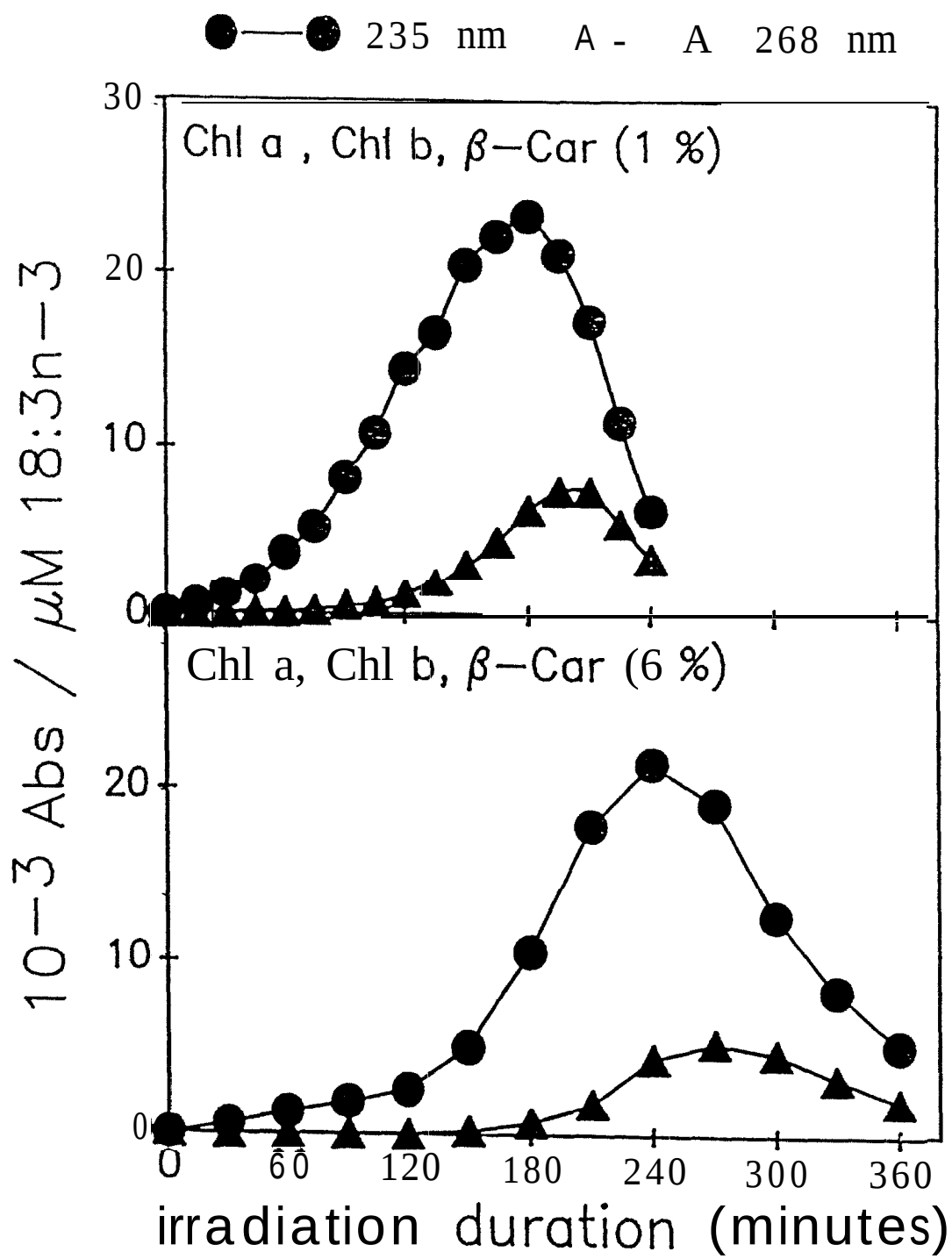


FIGURE 3

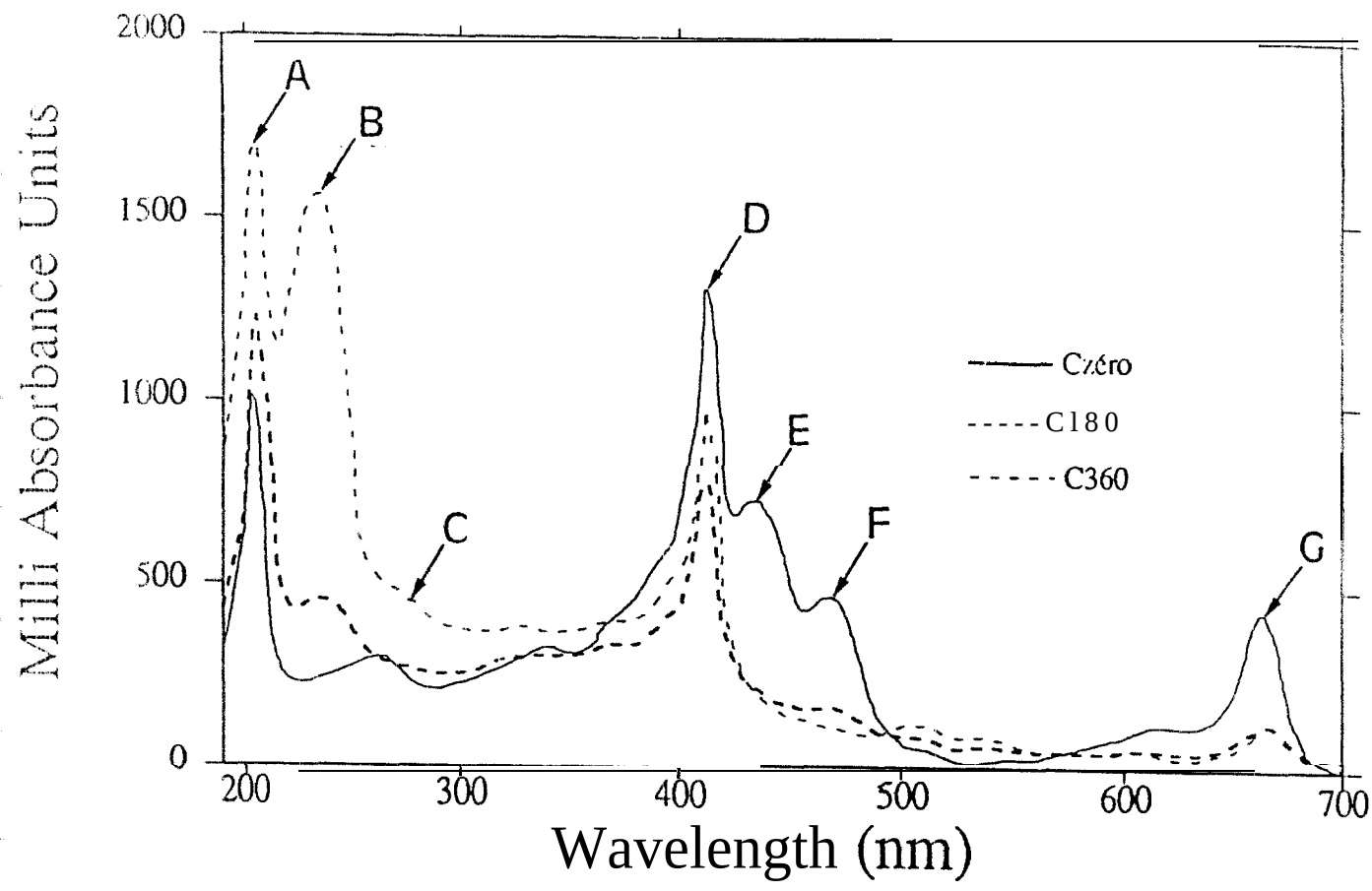


FIGURE 4

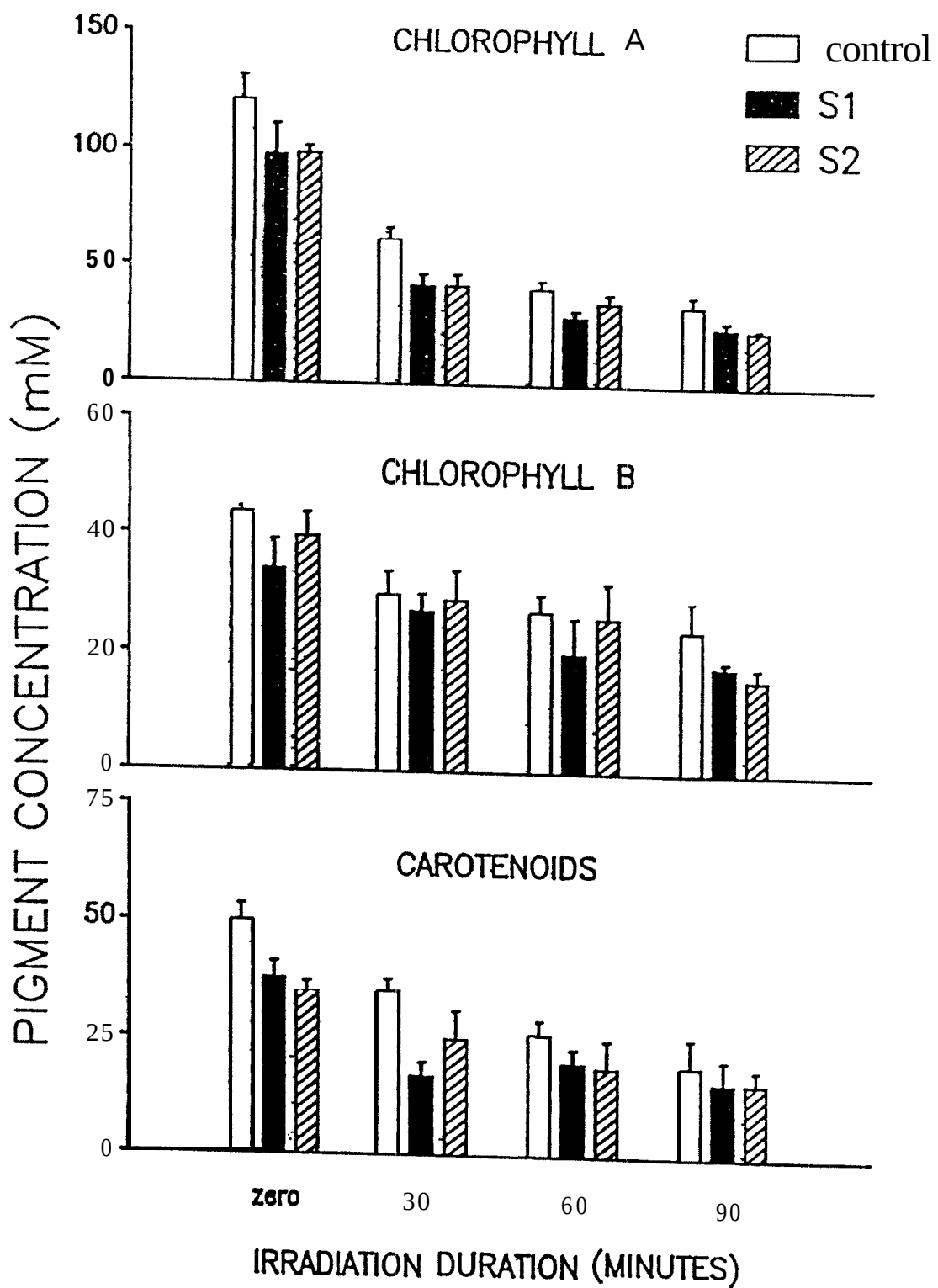


FIGURE 5

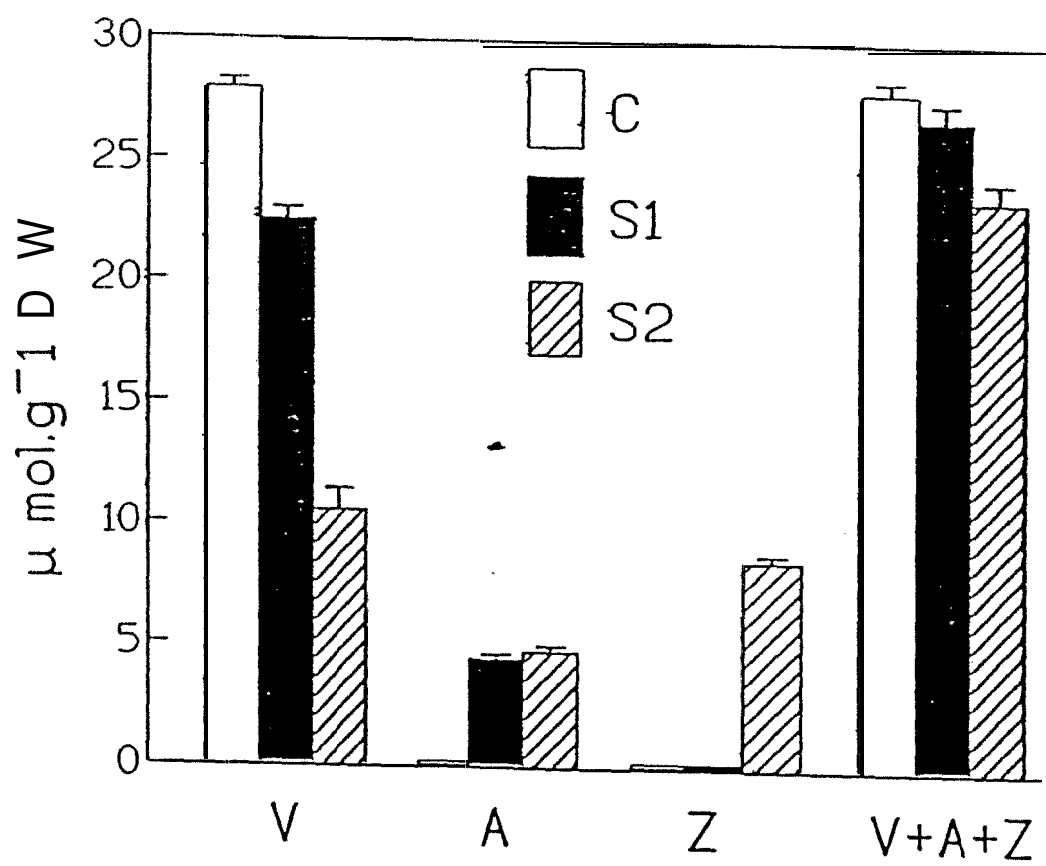


FIGURE 6

**Laboratoire de Physiologie Végétale
Université Libre de Bruxelles**

Rapport annuel 1994

**Adaptation à la sécheresse de plantes d'intérêt
économique en région tropicale**

**Responsable : Pr. Robert LANNOYE
(Physiologiste)**

Décembre 1994

**Laboratoire de Physiologie Végétale
Université Libre de Bruxelles
28, avenue Paul Héger CPI69
B-1050 BRUXELLES**

**Adaptation à la sécheresse de plantes d'intérêt économique en Région
Tropicale.**

contrat: CEE STD 3 (TS3 • CT93 • 0215)

Rapport d'activité.

**M.F. Scharl
R Lannoye**

OBJECTIFS

!Poursuite des recherches sur les désordres photosynthétiques provoqués par le stress hydrique et thermique en utilisant les techniques de fluorescence et de **photoacoustique**.

INTRODUCTION.

La fluorescence chlorophyllienne.

La fluorescence chlorophyllienne apparaît au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse. Elle intervient durant les transferts de l'énergie d'excitation entre les molécules de chlorophylle a. Elle contribue au processus de désactivation des pigments excités et son mécanisme est le mécanisme inverse de l'absorption. En effet, les molécules, après avoir été élevées jusqu'à leur état excité, retournent à leur état fondamental en émettant un quantum lumineux, correspondant à une partie de l'énergie libérée par la molécule. Cette transformation s'accompagne d'une perte d'énergie qui se traduit par l'augmentation de la longueur d'onde des photons émis par rapport à celle des photons absorbés.

Cette émission s'effectue dans la partie rouge du spectre visible entre 650 et 740 nm, et présente deux pics autour de 690 et 735 nm (Lichtenthaler, 1987). Bien qu'elle ne représente qu'une faible portion des quanta absorbés (de 0.5 à 3 % lorsque le transport d'électrons est optimal), son étude procure des informations sur la cinétique de dissipation de l'énergie dans les photosystèmes, en particulier par la voie photochimique. Ainsi, on observe, dans le photosystème II, une baisse de la fluorescence quand la photochimie augmente. Par contre, dans le photosystème 1, la fluorescence est indépendante du rendement photochimique

Mais surtout, la fluorescence chlorophyllienne présente l'intérêt principal d'être étroitement liée à l'activité photosynthétique des plantes vertes. En effet, la lumière absorbée par les pigments photosynthétiques est en majorité utilisée par la conversion photochimique de la photosynthèse (k_p), tandis qu'une faible portion est réémise sous forme de fluorescence rouge et proche-infrarouge (k_f : quelques %), ou est dissipée sous forme de chaleur (k_D : Papageorgiou, 1975). Lorsque le processus photosynthétique est ralenti par des stress de l'environnement (hydrique, déficience minérale,...), on observe une augmentation de la fluorescence chlorophyllienne et de la dissipation thermique. De même, lorsque le flux d'électrons est stoppé (par exemple, par un herbicide comme le DCMU), la réaction photochimique n'a plus lieu, ce qui entraîne une augmentation de la désactivation par production de chaleur et de fluorescence (Lichtenthaler, 1986, 1988). Le tableau ci-dessous illustre l'utilisation typique des quanta lumineux absorbés lorsque le transport d'électrons est optimal ou stoppé (Rosema & Verhoef, 1991).

Mécanisme	Transports d'électrons	
	optimal	bloqué
Photosynthèse	84	0
Chaleur	14	88
Fluorescence	2	12

En effet, la fluorescence est un processus qui entre en compétition avec la photochimie et la dissipation thermique pour la désactivation des molécules de chlorophylle excitées. L'équation générale de l'émission de fluorescence F, peut s'écrire sous la forme:

$$F = I_a k_f / \sum k_i \approx I_a k_f / (k_f + k_D + k_T + k_p)$$

où I_a : flux lumineux absorbé
 k_f : constante de désactivation radiative par la fluorescence

k_D : constante de désactivation par la dissipation thermique
 k_T : constante de désactivation par le transfert d'excitation du PSII au PSI (souvent négligée)
 k_p : constante de désactivation par la conversion photochimique (la plus forte)

Récemment, Strasser et collaborateurs ont proposé une théorie basée sur l'analyse des flux d'énergie entre les composants des photosystèmes (Havaux, Strasser & Greppin, 1991) (figure 1).

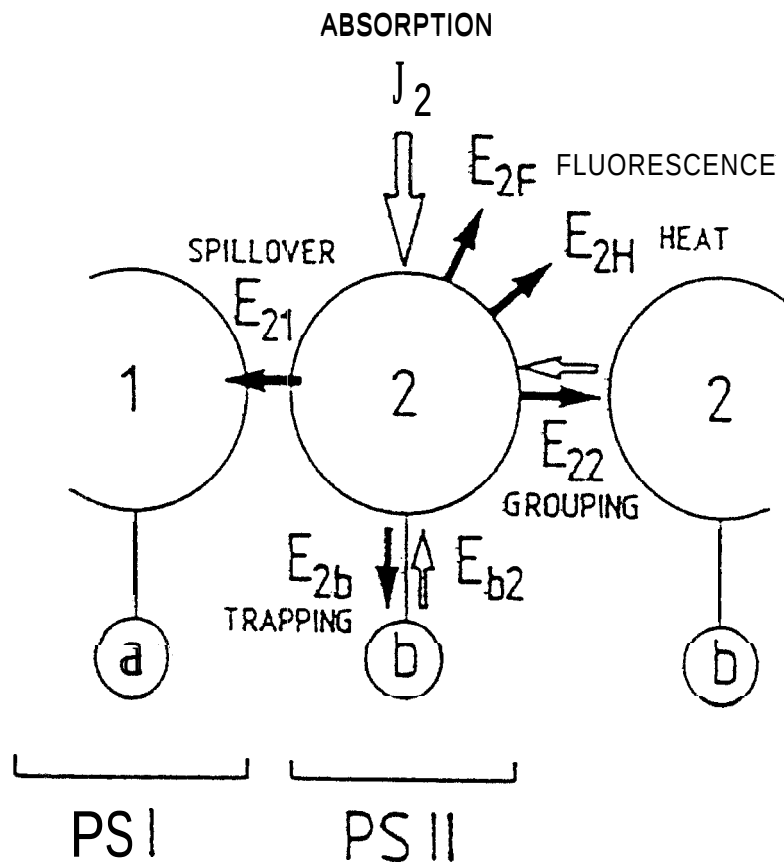


fig. 1. Modèle **schématisé** du groupement des photosystèmes. Les PSII sont représentés par un centre réactionnel (b) et un pool de chlorophylles antennes (2). Le flux d'énergie entrant dans un **système 2** (flèche ouverte) est constitué de l'énergie lumineuse absorbée (J_2) et de l'énergie migrant du centre réactionnel (E_{b2}) et des antennes voisines (E_{22}). Le flux **sortant** (flèche fermée) est constitué de l'énergie piégée par le centre (E_{2b}), de l'émission de fluorescence (E_{2F}), de la dissipation thermique (E_{2H}), du **transfert** d'énergie vers le PSI par spillover (E_{21}) et de l'échange d'énergie entre pools **antennaires** (E_{22}). Le PSI est représenté par son centre réactionnel (a) et son pool **antennaire** (1).

Cette théorie permet une analyse quantitative des processus photochimiques et non photochimiques, notamment le calcul, à partir des paramètres de fluorescence, des constantes de vitesse associées à ces processus:

$$k_N = k_F + k_D + k_T = 1/F_M (1, k_F)$$

$$k_F = (1/F_o - 1/F_M) (I_a k_F)$$

L'émission de fluorescence est donc affectée par divers types de processus: le plus important correspond à la conversion photochimique (k_P), et le second représente les processus non photochimiques (k_N).

La fluorescence peut être caractérisée par son rendement quantique Φ_F , qui est le quotient de l'énergie émise par la fluorescence, sur l'énergie lumineuse totale absorbée. Il est défini par:

$$\Phi_F = F/I, = k_F/(k_N + k_P)$$

De façon analogue, le rendement photochimique Φ_P est donné par

$$\Phi_P = k_P/(k_N + k_P)$$

A partir de cette définition, Duysens & Sweers (1963), puis Butler (1977, 1978) proposent une seconde formulation qui fait intervenir les rendements minimaux et maximaux de la fluorescence. Le rendement minimal, Φ_o , apparaît lorsque tous les centres réactionnels sont ouverts ($k_P \gg k_N$), alors que le rendement est maximal, Φ_{FM} , lorsque la constante de désactivation par voie photochimique est nulle ($k_P = 0$). Le rendement photochimique est dans ces conditions défini par:

$$\Phi_P = (\Phi_{FM} - \Phi_{Fo}) / \Phi_{FM} = (F_M - F_o) / F_M = F_v / F_M$$

où F_M est la fluorescence maximale, et F_v la variation maximale de l'émission de la fluorescence. Le rapport (F_v / F_M), qui est un paramètre facilement accessible par des mesures de contact, est maintenant largement utilisé pour caractériser l'état physiologique de l'appareil photosynthétique des plantes. En présence de stress qui affectent l'efficacité du PSII, le rapport (F_v / F_M) décroît.

Le développement croissant des technologies laser et des systèmes de détection sensibles est à l'origine de nombreuses techniques de mesure actives. En particulier, les caractéristiques mêmes de ce type de source d'excitation (divergence faible du faisceau émis et impulsions lumineuses fortement énergétiques) ont favorisé l'essor des techniques de détection à distance. La concentration de l'énergie dans une impulsion très courte (de l'ordre de la nanoseconde ou de la centaine de picoseconde) augmentant le rapport « fluorescence / lumière ambiante », il est plus facile de détecter la fluorescence induite. Cette fluorescence induite par laser (LIF: Laser Induced Fluorescence) peut ainsi être détectée au-delà d'une distance de quelques mètres à l'aide de télescopes.

Le spectre d'émission de la fluorescence permet de distinguer quatre longueurs d'onde principales correspondant aux pics de fluorescence bleue (440 et 520 nm) et de la fluorescence

chlorophyllienne (690 et 740 nm). Différents rapports d'intensité de fluorescence à ces longueurs d'onde ont été proposés comme indices de vitalité de la végétation.

Le rapport de fluorescence chlorophyllienne F690/F740

Le spectre d'émission de fluorescence chlorophyllienne est historiquement celui qui a été le plus anciennement utilisé. Défini comme un indice de vitalité des plantes terrestres (Lichtenthaler et al., 1986; Lichtenthaler & Rinderle, 1988; Rinderle & Lichtenthaler, 1988), il a été utilisé avec succès par différentes équipes pour suivre l'évolution de plantes stressées (Cecchi et al., 1985, 1986; Castagnoli et al., 1986.. 1988; Zimmerman & Günther, 1986; Rosema et al., 1988).

Cependant, l'utilisation du rapport F690/F740 pour caractériser l'état physiologique des végétaux est largement limitée par sa forte dépendance vis-à-vis de la concentration en chlorophylle de la cible. En effet, ce rapport des fluorescences chlorophylliennes est principalement influencé par des conditions de stress entraînant une diminution de la concentration chlorophyllienne et/ou par le déclin de l'activité photosynthétique (Lichtenthaler & Rinderle, 1988; Rinderle & Lichtenthaler, 1988). On observe une décroissance non linéaire du rapport F690/F740 lorsque la concentration en chlorophylle augmente. Cette relation s'explique par le fait que l'intensité de fluorescence à 690 nm décroît suite à une réabsorption préférentielle de la fluorescence émise à 690 nm par la chlorophylle in vivo.

Malgré ces réserves, la méthode recèle un intérêt certain. Le rapport F690/F740 peut être utilisé comme une mesure non destructive de la concentration en chlorophylle des feuilles. De plus, la croissance et le développement de cultures agricoles et des arbres forestiers, comme les effets de stress qui diminuent la concentration en chlorophylle, peuvent être suivis par la détermination du rapport des fluorescences chlorophylliennes F690/F740 (Hak et al., 1990, Rinderle et al., 1991).

Les rapports de fluorescence bleue, verte et rouge

L'un des objectifs des recherches concernant la fluorescence bleue et verte des plantes terrestres est l'utilisation de ces dernières comme indicateur de stress. Aujourd'hui, les variations de ces émissions bleue et verte de la fluorescence durant la phase de développement des végétaux, ou en présence de stress, ne sont qu'imparfaitement connues. Cependant, différentes approches ont montré un intérêt certain pour les rapports de fluorescence entre les émissions rouges, vertes et bleues (Lang & Lichtenthaler, 1991; Lang et al., 1991; Günther et al., 1991; Lichtenthaler et al., 1992).

Ces rapports, F440/F690 et F440/F530, présentent un intérêt évident pour le contrôle de l'état physiologique des végétaux. Cependant, tant que l'origine des fluorescences bleue et verte demeure imparfaitement connue, il est impossible d'interpréter correctement ces rapports.

Durée de vie de la fluorescence chlorophyllienne

Les recherches se sont tournées aussi vers la caractérisation de l'état physiologique des couverts à partir des mesures de la durée de vie de la fluorescence. Suite à une impulsion lumineuse d'excitation très courte (100-500 ps), une feuille verte émet un signal de fluorescence dont l'intensité décroît exponentiellement en fonction du temps. Le signal de fluorescence comporte une rapide phase de croissance, puis une phase de décroissance beaucoup plus lente qui correspond à la cinétique de la désactivation des états excités de la chlorophylle. Cette cinétique est caractérisée par une durée de vie moyenne τ qui correspond au temps moyen de l'émission.

Contrairement à l'intensité de la fluorescence, la durée de vie moyenne de la fluorescence est indépendante de la concentration en chlorophylle de la végétation observée. Cette caractéristique favorise de nouveau les mesures de la durée de vie par rapport aux mesures d'intensité pour la caractérisation de l'activité photosynthétique d'une plante.

La durée de vie de la fluorescence repose sur le phénomène suivant: une solution de chlorophylle excitée par une impulsion lumineuse de l'ordre de la centaine de picosecondes émet un signal de fluorescence, $F(t)$, dont la décroissance en fonction du temps suit une loi monoexponentielle (Moya et al., 1986). Ce phénomène peut être décrit par le modèle de Tumerman et Sorokin (1967). Ces auteurs ont mis en évidence la relation de proportionnalité qui existe entre la durée de vie moyenne τ et le rendement de fluorescence Φ_F pendant la fermeture des centres réactionnels. Cette relation leur a suggéré une description du phénomène où la désactivation des états singulet de la chlorophylle est interprétée comme un processus de premier ordre.

MATERIEL ET METHODES.

1. Matériel végétal.

Les résultats présentés dans ce rapport ont été obtenus sur des plantes de *Phaseolus vulgaris* L. cv. *carioquinha*, et de *Vigna unguiculata* L., cv. EPACE et TT-83D.

Ces plantes ont été soumises à un stress hydrique, soit par arrêt d'arrosage (huit jours>, qui porte leur potentiel hydrique à des valeurs de -1.2 Mpa (stress hydrique modéré), soit par dessiccation. Dans ce cas, des disques foliaires de 15 mm de diamètre sont prélevés sur des plantes bien irriguées (-0.2 Mpa) et déposés dans des boîtes de Pétri sur des papiers filtre secs. Ces disques sont maintenus à l'obscurité et laissés à dessécher à l'air libre (humidité relative: 50%) pendant 4 heures. Leur potentiel hydrique atteint alors de valeurs de l'ordre de -1.8 Mpa. Les potentiels hydriques ont été mesurés à la presse à membrane.

2. Analyse de la cinétique rapide de fluorescence.

Principe

L'illumination d'une feuille préalablement adaptée à l'obscurité, se traduit par une émission de fluorescence qui varie avec le temps d'illumination, phénomène connu sous le nom de « effet Kautsky ». En échelle semi-logarithmique, cette courbe d'induction de fluorescence présente les points caractéristiques suivants:

- F_0 : fluorescence initiale correspondant à la fluorescence des antennes avant tout processus photochimique,
- F_M : fluorescence maximale correspondant à la réduction maximale du pool de quinones, les points d'inflexion J (F_1) et T (F_2), correspondant à une réduction progressive du pool des quinones.

En pratique, on enregistre les cinétiques de fluorescence provenant de l'application de deux flash (temps de mesure: 2s) séparés d'une phase d'obscurité d'une durée de 10s. On obtient la représentation illustrée à la figure 2 permettant le calcul des paramètres F_v/F_M (1er flash) et F_v^*/F_M^* (2e flash).

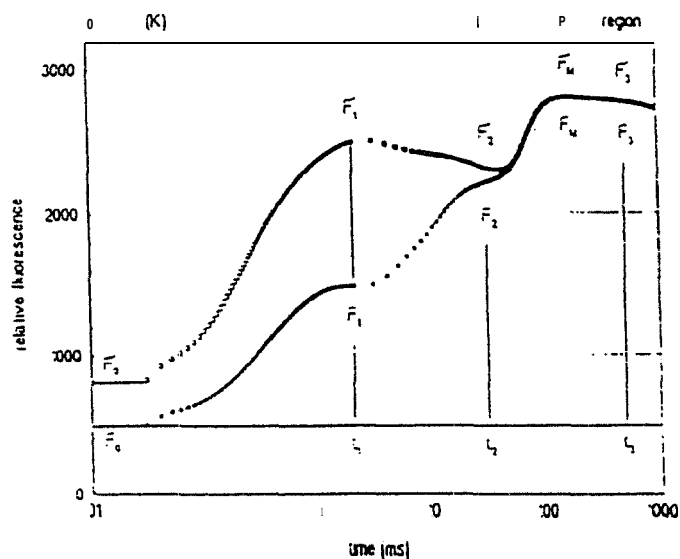


fig.2: Courbes d'inductions de fluorescence (* indique la courbe obtenue par une seconde illumination après une période d'obscurité de 10s).

Ces étapes d'induction ne sont acquises que par un instrument dépourvu d'obturateur mécanique pour le faisceau lumineux et muni d'un système intégré rapide d'acquisition des données, tel le « Plant Efficiency Analyser » ou « PEA ».

Description de l'appareil

Le « PEA » est un appareil portable, conçu aussi bien pour une utilisation sur le terrain, qu'en laboratoire. Il est doté d'une unité sensorielle qui illumine la feuille et détecte les signaux de fluorescence induits.

L'illumination est obtenue par une série de six diodes à émission de lumière à haute intensité (LED) focalisées sur la surface de la feuille. Elles émettent une lumière rouge (pic à 650 nm) d'intensité égale à 650 W/m^2 , préférentiellement absorbée par le photosystème II. Le détecteur est constitué d'une photodiode associée à un circuit amplificateur. Le système optique et filtrant assure une réponse maximale pour les longueurs d'onde caractéristiques de l'émission de fluorescence et il bloque les longueurs d'onde plus courtes de la source d'illumination réfléchi.

Une boîte de contrôle dotée d'un microprocesseur réalise les opérations de calcul et de stockage des données.

2. Mesures en fluorescence modulée.

Cette méthode est considérée aujourd'hui comme une technique de référence pour les mesures et les études de la fluorescence des végétaux. Elle s'appuie sur les travaux de Schreiber et de son équipe (Schreiber, 1983, 1986; Schreiber et al., 1986; Schreiber et Bilger, 1987), qui ont développé un prototype de fluorimètre modulé (PAM: Pulse Amplitude Modulation).

Cette technique consiste à mesurer la fluorescence des feuilles excitées par une faible lumière analytique pulsée (PL) (suffisamment faible pour ne pas provoquer de variations de l'état fluorescent), et à mesurer l'accroissement de ce signal analytique lorsqu'on lui superpose une forte lumière saturante (SP), et ce en fonction d'une lumière blanche actinique (AL) non modulée et d'intensité variable servant à induire la cinétique de fluorescence chlorophyllienne. En fin de mesure, la réoxydation complète des quinones est atteinte en imposant une lumière rouge-lointain (FR) excitant préférentiellement le PSI.

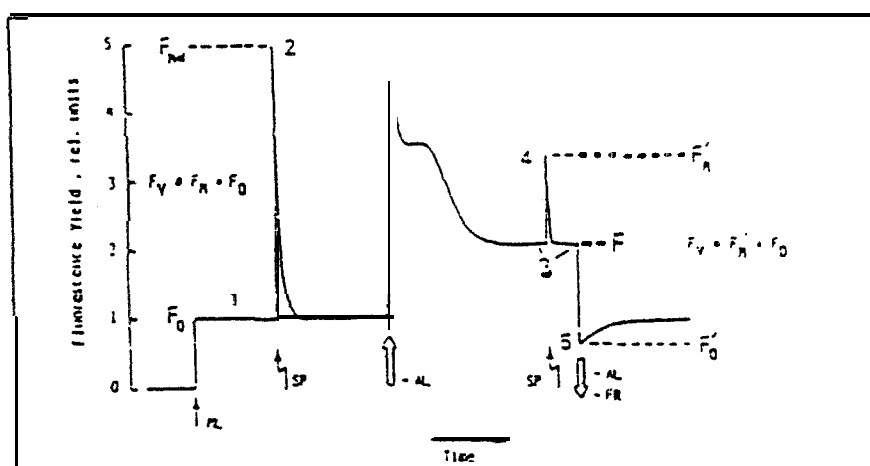


fig.3: Courbe-type de fluorescence chlorophyllienne obtenue par la technique de fluorescence modulée (PAM).

- F : intensité réelle de la fluorescence à n'importe quel moment
- F_o : intensité de la fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts
Il s'agit de la fluorescence minimale dans l'état adapté à l'obscurité.
- F_s : intensité de la fluorescence à l'état stationnaire (« steady state »). Cet état est défini comme la période durant laquelle l'intensité de la fluorescence ne change pas, alors que les circonstances externes restent constantes.
- F_{md} : intensité de la fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont fermés
Fluorescence maximale de l'état adapté à l'obscurité.
- F_o' : intensité de la fluorescence lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts à n'importe quel état adapté à la lumière.
- F_v : fluorescence variable maximale ($F_M - F_s$), état où tous les processus non photochimiques sont au minimum.

3. Le dispositif laser.

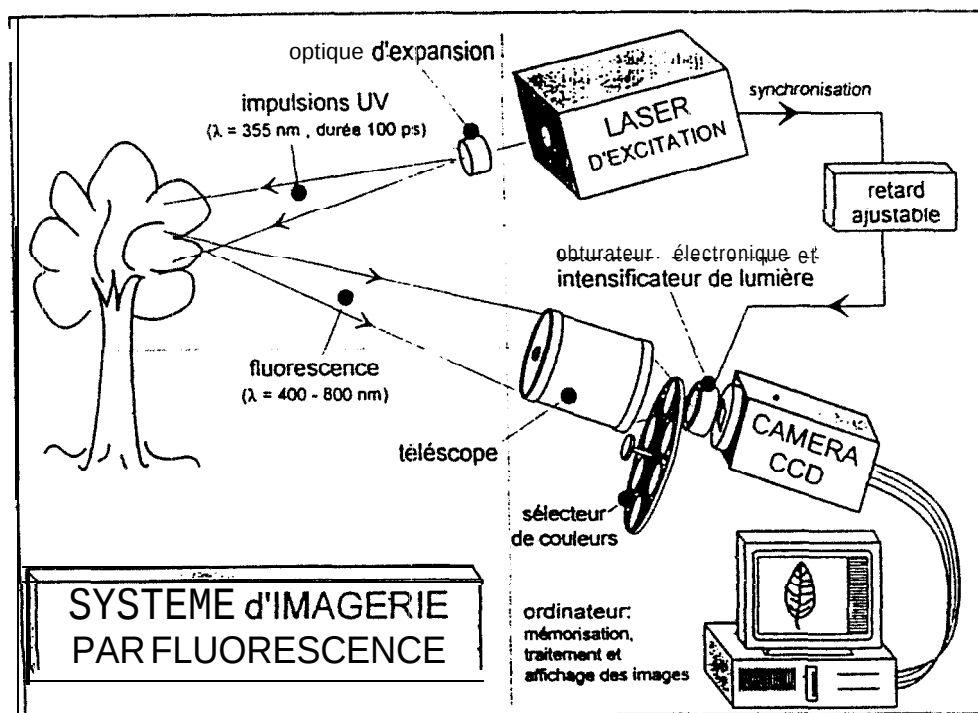


fig4.: Dispositif laser utilisé pour la mesure des spectres et des durées de vie moyenne de la fluorescence.

RESULTATS ET DISCUSSION.

1. La cinétique rapide de la fluorescence (figure 5).

A partir des cinétiques de fluorescence correspondant aux deux impulsions lumineuses successives, nous avons calculé les rapports F_v/F_M et F_v^*/F_M^* , sur des disques témoins et contraints par dessiccation.

Les représentations graphiques de F_v^*/F_M^* en fonction de F_v/F_M montrent qu'en situation normale (témoin) les points se répartissent sous forme d'un nuage homogène. L'application d'un stress amplifie généralement la variabilité du système.

Dans le cas de carioquinha, la population des points représentatifs des disques contraints se détache nettement de celle des disques témoin. Un comportement semblable peut être observé chez IT-83D. Par contre, chez EPACE les nuages restent **confondus** indiquant que disques, témoins et disques contraints présentent un comportement physiologique assez proche. On peut penser que la contrainte hydrique affecte peu l'activité **photosynthétique** de cette plante

2. La fluorescence modulée (figure 6).

Nous avons appliqué cette technique sur des plantes contraintes par arrêt d'arrosage. Les paramètres de fluorescence F_o' et F_M' ont été mesurés en fonction de l'intensité de la lumière (AL). Comme décrit dans l'introduction, ces paramètres permettent de calculer les constantes de vitesse des processus photochimiques et non photochimiques.

On observe que k_p reste relativement stable. Par contre, k_N dépend largement de l'intensité de la lumière actinique (AL).

Chez carioquinha, la contrainte hydrique **n'affecte** pas k_N , indiquant une stabilité des processus de dissipation non photochimique. La plante contrainte est donc incapable de dissiper des **excès** d'énergie en amplifiant les voies de désactivation non photochimiques. Cette situation dommageable pour l'intégrité des centres **réactionnels** du **PSII** est révélée par la forte différence observée pour les valeurs de k_p des plantes témoins et des plantes contraintes (ralentissement des processus photochimiques).

3.3. Imagerie de fluorescence.

Nous représentons ici (figures 7 et 8) l'image de fluorescence d'une feuille de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioquinha témoin et celle d'une feuille contrainte par arrêt d'arrosage ($Y = -1.2$ Mpa).

L'intensité de la fluorescence, révélée par la couleur rouge, décroît de l'extrémité de la feuille à sa base. Cette observation suggère qu'un stress **hydrique** ne se développe pas de manière uniforme au niveau de la feuille. Une très grande prudence s'impose donc lors du prélèvement d'un échantillon **foliaire** destiné à caractériser l'état physiologique d'une plante contrainte.

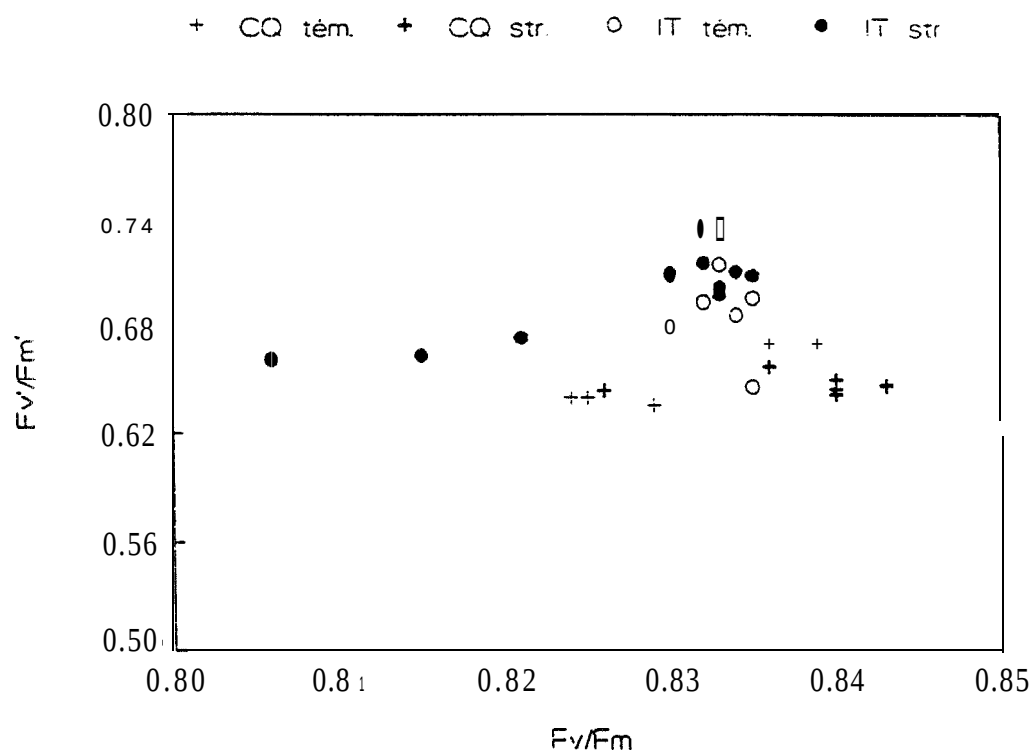
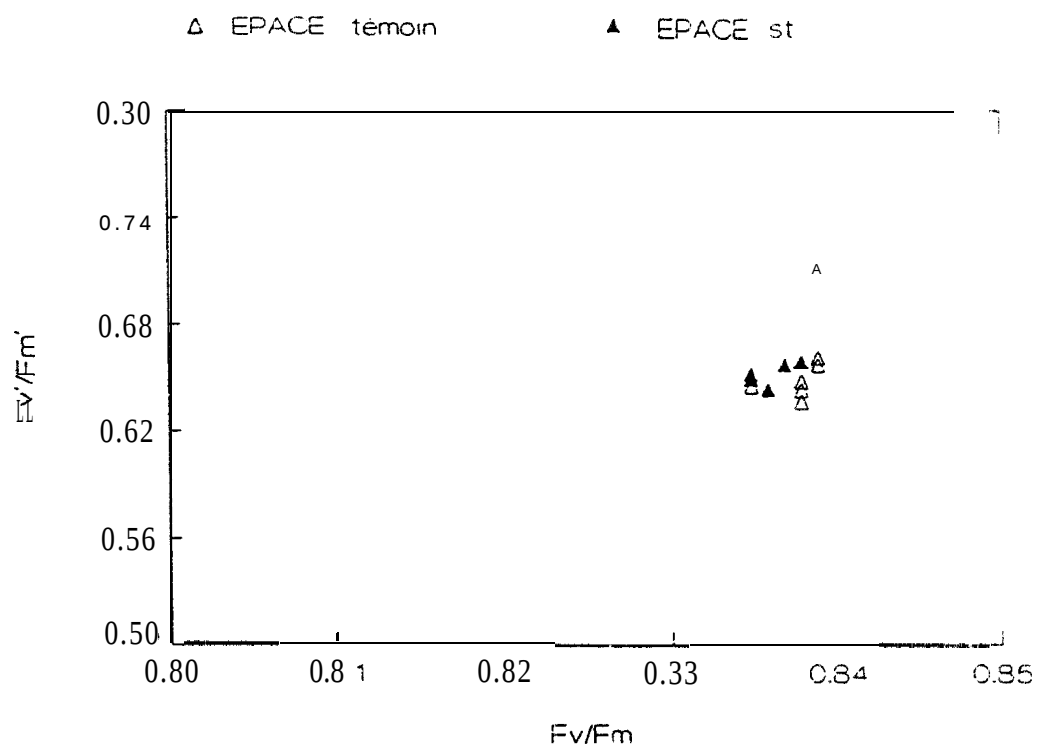
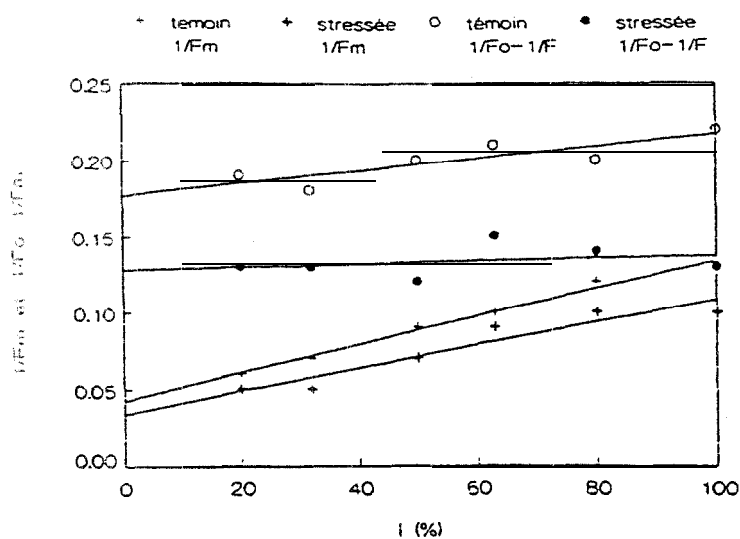
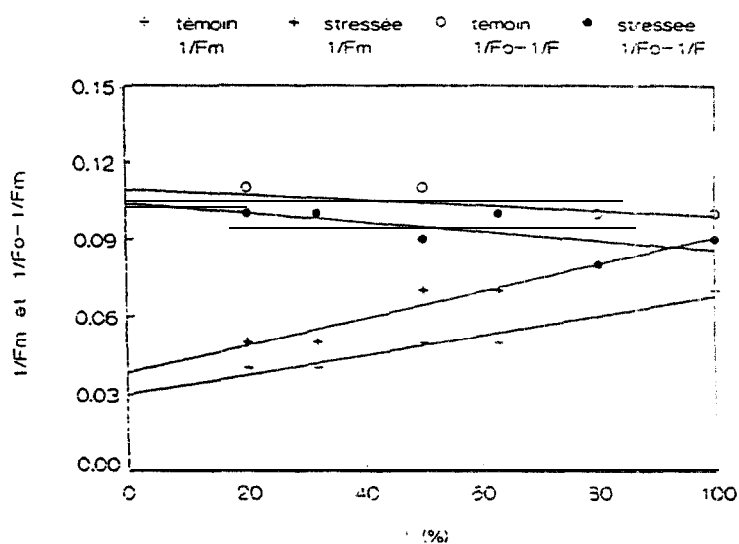


fig.5: Représentation graphique des rendements quantiques photochimiques F_v/F_m et F_v'/F_m' .

CQ



IT



Épave

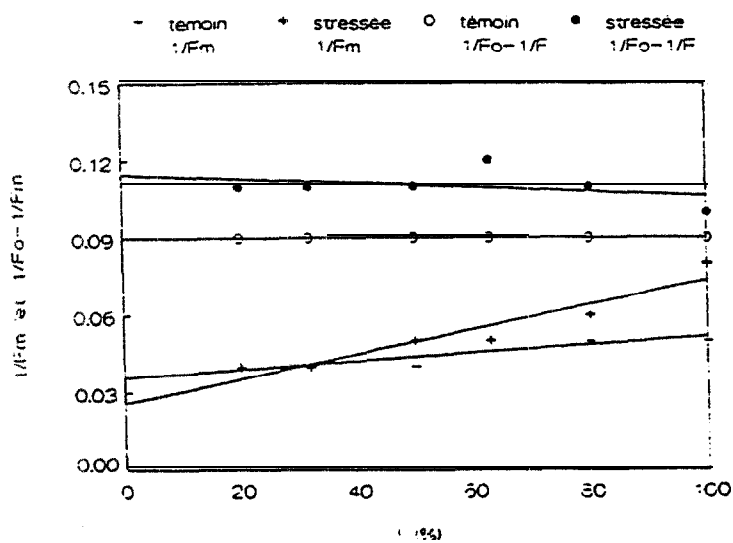


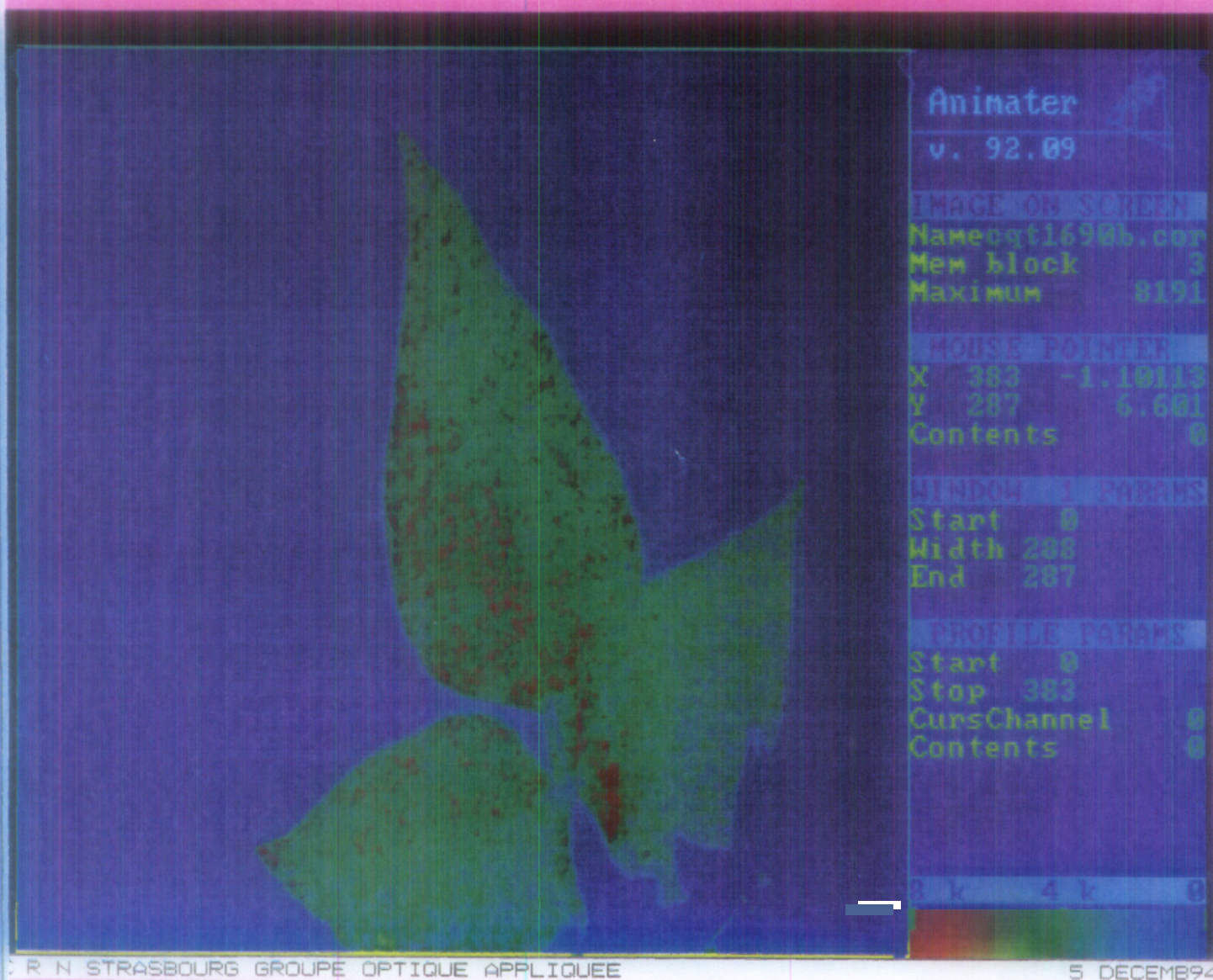
fig. 6: Représentation graphique des rapports $1/F_m$ et $(1/F_o - 1/F_m)$ en fonction de l'intensité lumineuse I (100 % = 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$).

Figure 6

STRESS HYDRIQUE

Fluorescence à 690 nm (exc. 355 nm)

Haricot vert - variété CQ (plante référence n° 2)



CRN STRASBOURG GROUPE OPTIQUE APPLIQUEE

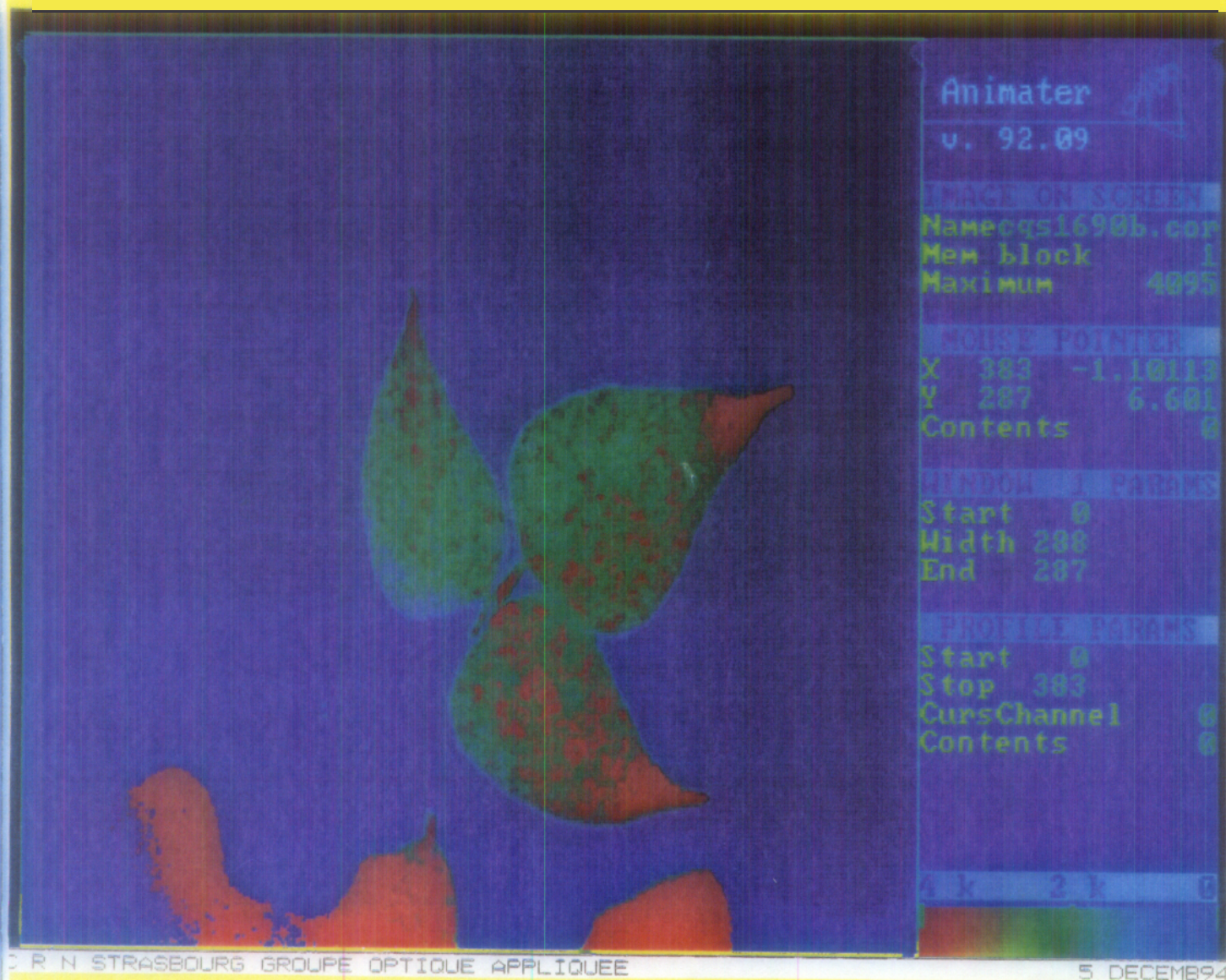
5 DECEMB94

Rapport d'intensité de fluorescence
pointe/milieu = $0.9 \div 1$

STRESS HYDRIQUE

Fluorescence à 690 nm (exc. 355 nm)

Haricot vert - variété CQ (plante stressée n° 1)



Rapport d'intensité de fluorescence
pointe/milieu = $1.6 \div 2$

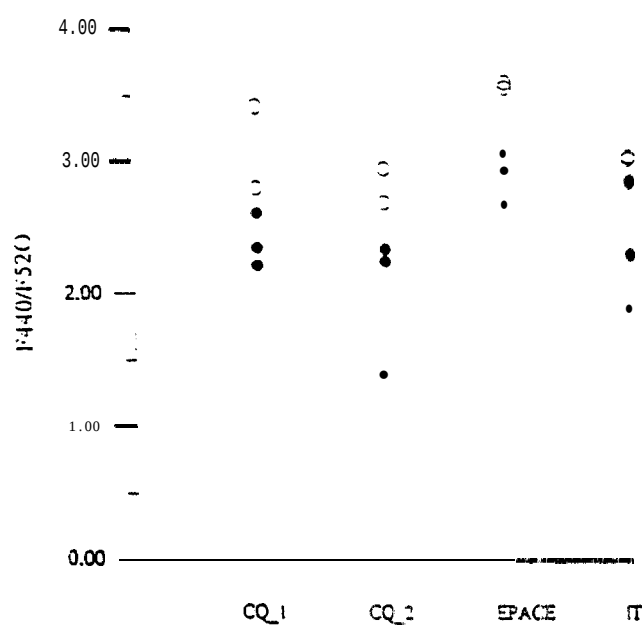
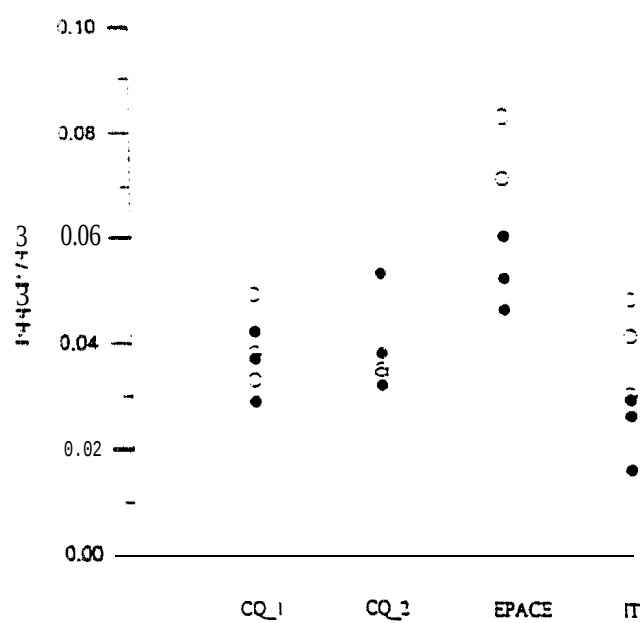
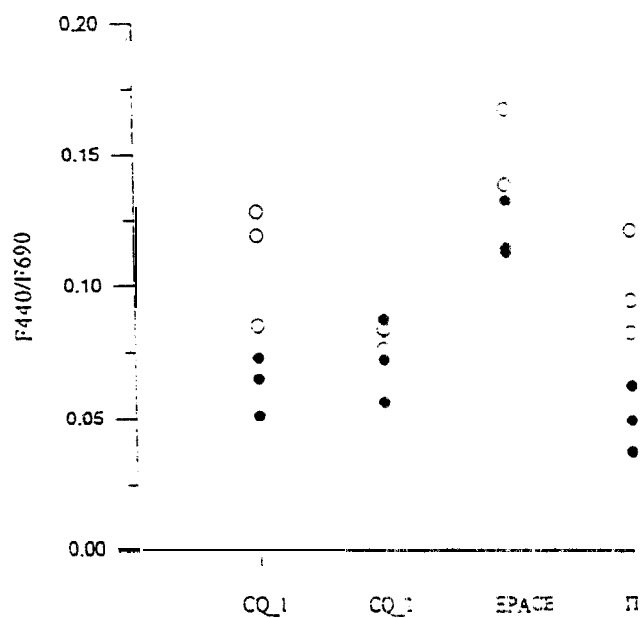
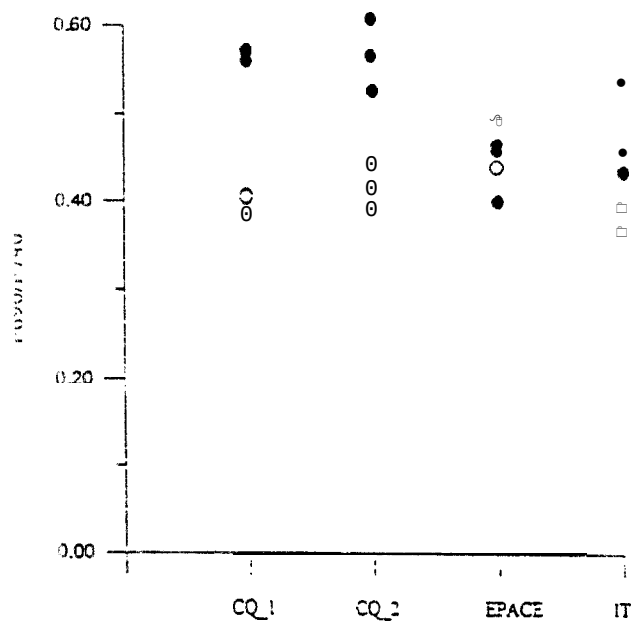


fig.9 Imagerie de fluorescence: valeurs des différents rapports de fluorescence déterminées par excitation à 355 nm sur plantes témoin (●) et sur plantes stressées (○).

4. Les rapports de fluorescence (figure 9).

F690/740 nous observons des variations d'autant plus importantes que la plante est stressée. C'est le cas des cultivars IT-83D et carioquinha, reconnus pour leur sensibilité au stress hydrique. Par contre dans le cas du cultivar EPACE, il n'y a apparemment pas de variation du rapport, EPACE étant reconnu comme une plante résistante à la sécheresse.

Les autres rapports démarquent toujours EPACE par rapport aux autres cultivars, mais les variations sont plus complexes à interpréter.

5. Les mesures de durée de vie de la fluorescence.

Les mesures ont été réalisées sur l'extrémité des feuilles (excitation à 355 nm, mesure à 690 nm, valeurs moyennes en ns, n=3)

	Témoin	Stressé
carioquinha	0.36	0.62
IT-83D	0.49	0.56
EPACE	0.48	0.46

Un stress hydrique allonge la durée de vie moyenne d'autant plus que la plante est sensible.

CONCLUSIONS.

Le diagnostic par fluorescence d'une plante permet de décrire son activité photochimique

Grâce à la sensibilité de ces techniques, de petites variations du comportement physiologique et énergétique de la plante peuvent être détectées bien avant l'extériorisation de symptômes visibles. Ainsi, la détection précoce d'une situation de stress devient mesurable

En outre, ces informations sont des guides particulièrement utiles aux recherches biochimiques, dans le but d'identifier les cibles affectées et les mécanismes de protection développés par la plante.

Nous avons démontré les potentialités discriminantes de ces techniques dans deux situations de stress hydrique. L'espèce la plus sensible a pu être identifiée.

Nous pensons pouvoir présenter d'ici peu une méthodologie de mesures et de traitement des signaux de fluorescence particulièrement bien adaptée aux criblages rapides de lignées de cultivars

BIBLIOGRAPHIE.

Chlorophyll, fluorescence: a probe for electron transfer and energy transfer. In *Encyclopedia of plant physiology*, A. Trebst & M. Avron Ed., Spiger Verlag, Berlin, 5, 149-167.

Butler W.L.. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of Photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29, 345-378.

Castagnoli F., Cecchi G., Panatani L., Pippi L., Radicati B. and Mazzinghi P., 1986. A fluorescence LIDAR for land and sea remote sensing, *Laser Technol. Appl. SPIE*, 663, 212-216

Castagnoli F., Cecchi G., Panatani L., Radicati B. and Mazzinghi P., 1988. A system for applications over land and sea. In *Proc. 4th Int. Coll. Spectral Signatures of Objects in Remote Sensing*, Aussois-Modane (France), T.D. Guyeme and J.J. Hunt Ed., ESA-SP 287, 239-343.

Cecchi G., Panatani L. and Pippi L., 1986. LIDAR remote sensing of vegetation. In *Physics in Environmental and Biomedical Research*, World Scientific, Singapore, 375-378.

Cecchi G., Panatani L., Magli R. and Mazzinghi P., 1985. Vegetation remote sensing: a new field for LIDAR applications. *ECOOSA 84, SPIE*, 492, 180-185.

Duvsens L.N.M. and Sweers H.G., 1963. Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In *Studies on microalgae and Photosynthetic Bacteria*, Ashida E. Ed., University of Tokyo Press, 539-583.

Günther K.P., Lüdeker W. and Dahn H.-G., 1991. Design and testing of a spectral-resolving fluorescence LIDAR system for remote sensing of vegetation. In *Proc. 5th International Coll. on Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing*, Courchevel (France), ESA Publications Division, Noordwijk, The Netherlands, 723-726.

Hak R., Lichtenthaler H.K. and Rinderle U., 1990. Decrease of the chlorophyll fluorescence ratio F690/F730 during greening and development of leaves. *Radiat. Environ. Biophys.*, 29, 329-336.

Havaux M., Strasser R.J. and Greppin H., 1991. A theoretical and experimental analysis of the q_p and q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. *Photosynth. Res.*, 27, 41-55.

Lang M. and Lichtenthaler H.K., 1991. Changes in the blue-green and red fluorescence emission spectra of beech leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *J. Plant Physiol.*, 138, 550-553.

Lang M., Stober F. and Lichtenthaler H.K., 1991. Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiat. Environ. Biophys.*, 30, 333-347.

Lichtenthaler H.K., 1986. Laser-induced chlorophyll fluorescence of living plants. In *Proc. IGARSS'86*, Zürich (Switzerland), ESA SP-254, vol. III, 1571-1579.

Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown. *J. Plant Physiol.*, 131, 101-110.

Lichtenthaler H.K., 1988. In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In *Applications of chlorophyll fluorescence*, H.K. Lichtenthaler Ed., Kluwer Academic, Dordrecht, 1988, 129-142.

Lichtenthaler H.K. and Rinderle U., 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 19 (suppl. D), 29-85.

Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Rinderle U. and Schmuck G., 1986. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. *Radiat. Environ. Biophys.*, 25, 297-308.

Lichtenthaler H.K., Stober F. and Lang M., 1992. The nature of the different Laser-induced fluorescence signatures of plants. *EARSeL Advances in Remote Sensing*, vol. I, No 2-II, 20-32.

Moya I., Sebban P. and Haenhel W., 1986. Lifetime of excited states and quantum yield of chlorophyll *a* fluorescence in vivo. In *Light Emission by Plants and Bacteria*, E. Govindjee, I. Amez and D.C. Fork Ed., Academic Press, New York (USA), 161-190.

Papageorgiou G., 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In *Bioenergetics of Photosynthesis*, Govindjee Ed., Academic Press (New York), 319-371

Rinderle U. and Lichtenthaler H.K., 1988. Chlorophyll fluorescence ratio as a possible stress indicator. In *Applications of Chlorophyll Fluorescence*, H.K. Lichtenthaler Ed., Kluwer Academic, Dordrecht, 1988, 189-196.

Rinderle U., Schindler C. and Lichtenthaler H.K., 1991. The laser-induced chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 of spruce needles and beech leaves during the course of the year. In *Proc. 5th International Coll. on Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing*, Courchevel (France), ESA Publications Division, Noordwijk, The Netherlands, '73 1-734.

Rosema A. and Verhoef W., 1991. Modeling of fluorescence light-canopy interaction., In *Proc. 5th International Coll. on Physical Measurements and Signatures in Remote Sensing*, Courchevel (France), ESA Publications Division, Noordwijk, The Netherlands, 743-748.

Rosema A., Cecchi G., Panatani L., Radicati B., Romuli M., Mazzinghi P., Van Kooten P. and Kliffen C., 1988. Results of the « LIFT » project: Air pollution effects on the fluorescence of douglas fir and poplar. In *Applications of chlorophyll fluorescence*, H.K. Lichtenthaler Ed., Kluwer Academic, Dordrecht, 1988, 307-317.

Schreiber U., 1983. Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology : I The measuring system. *Photosynth. Res.*, 4, 361-373.

Schreiber U., 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.*, 9, 261-272.

Schreiber U. and Bilger W., 1987. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In *Plant Response to Stress*. J.D. Tenhunen et al. Ed., NATO-ASI, Ser.G.15 Springer, Berlin, 27-53.

Schreiber U., Bilger W. and Schliwa U., 1986. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, 10, 51-62.

Tumerman L.A. and Sorokin E.M., 1967. The photosynthetic unit: a physical or statistical model? *Mol. Biol. USSR (English Transl.)*, 1, 527-535.

Zimmermann R. and Günther K.P., 1986. Laser-induced chlorophyll a fluorescence of terrestrial plants. In *Proc. IGARSS'86, Zürich (Switzerland)*, ESA SP-254, vol. III, 1609-1613.

Département de Physiologie Végétale
Estação Agronômica Nacional

Rapport annuel 1994

Responsable : Dr. Maria do Céu MATOS
(Physiologiste)

Décembre 1994

**1er Rapport d'activités du contrat
TS3-CT93-0215**

Resumé

Le présent rapport d'activités porte sur les travaux développés dans le cadre: du projet intitulé "Physiologie de l'adaptation à la sécheresse et création variétale pour les régions sèches".

Les actions de recherche ont été menées aux laboratoires et serres du Département de Physiologie Végétale de l'EAN, Laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale - Univ. Paris VII (stage de formation d'une thésarde déroulée entre le 31 Mai et le 3 Juillet sous l'orientation de Dr. Anh Thu Pham Thi) et les travaux au champ à la Direcção Regional de Trás-os-Montes (NE Portugal). On a continué les travaux sur la résistance protoplasmique à la sécheresse de *Vigna* qui constituent l'objet d'une thèse de doctorat. On a étudié *Vigna glabrescens* (résistante) et les cultivars de *Vigna unguiculata*: Epace (résistante), 1183 (sensible) désigné avant par Vu3, IT-83D (demi-résistante) et Lagoa (sensible). L'étude de l'activité des galactolipases LAH (acyldrolases lipidiques) a été abordée par: 1- L'étude du traitement de sécheresse sur la fraction membranaire et soluble des enzymes. 2- Par utilisation du ^{14}C -MGDG et ^{14}C -DGDG (deux substrats différents, préalablement obtenus par marquage des feuilles des plantes avec ^{14}C -acetate et en suite avec purification par chromatographie en couche mince, à partir de l'extrait brut des feuilles). Ce travail a été présenté au cours du 11th International Meeting on Plant Lipids, qui s'est déroulé à Paris, du 26 Juin au 1er Juillet 1994.

On a vu l'effet du déficit hydrique sur la photosynthèse, composition lipidique des membranes et les teneurs endogènes en acide abscisique. En ce qui concerne les travaux aux champs on a essayé variétés d'origines diverses de *Vigna* concernant le rendement en gousses, fanes et protéine brute/matière sèche sous les conditions naturelles du NE caractérisé par un climat de caractéristiques méditerranéennes et sous irrigation.

On a essayé aussi trois variétés de *Pachyrhizus aipa* en ce qui concerne la production de tubercules, avec et sans floraison (par ablation des fleurs manuellement ou par application de 2-4D).

Maria do Céu Matos
Paula Scotti Campos Afonso

1 ° Relatório do Projecto TS3-CT93-0215

Resumo

Mo âmbito deste projecto continuaram-se a desenvolver os trabalhos respeitantes a uma tese de doutoramento no domínio da resistência protoplásmica à seca no género *Vigna*. Deu-se continuidade aos trabalhos no campo, onde se fez a testagem de variedades de diferentes origens incluindo portuguesas, no Nordeste de Portugal, zona que como tem sido referido em projectos anteriores, apresenta um clima de características mediterrânicas.

Uma parte dos trabalhos laboratoriais foi realizada no nosso laboratório em Oeiras e outra fez parte de um estágio que Paula Scotti Campos realizou no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Adaptação Vegetal da Univ. de Paris VII, de 31 de Maio a 3 de Julho do ano corrente, sob a orientação da Dra. Anh Thu Pham Thi. Foram estudadas *Vigna glabrescens* (resistente) e as cultivares de *Vigna unguiculata* : Epace (resistente), 1183 (sensível) até aqui designada por Vu3, a IT-83D (medianamente resistente) e a Lagoa (sensível).

Foi feito o estudo da actividade das galactolipases LAH (acilidrolases lipídicas) :

1-Analizando o efeito do tratamento de seca na fracção membranar e solúvel das enzimas.
2-Utilizando ^{14}C -MGDG e ^{14}C -DGDG (dois substratos diferentes, previamente obtidos por marcação das folhas das plantas em estudo com ^{14}C -acetato e subsequente purificação por cromatografia em camada fina, a partir do extracto bruto das mesmas). Este trabalho foi apresentado no decorrer do 11th International Meeting on Plant Lipids, que decorreu em Paris, de 26 de Junho a 1 de Julho de 1994.

Viu-se ainda o efeito do défice hídrico na fotossíntese, composição lipídica das membranas e teores endógenos de ácido abscísico.

Foram ainda testadas em Oeiras três variedades de *Pachyrhizus aipa* quanto à produção de tubérculos, de plantas às quais foi permitida floração normal e noutras às quais foram retiradas as flores manualmente ou por aplicação de 2-4D.

EFEITO DO DÉFICE HÍDRICO NA FOTOSSÍNTESE, COMPOSIÇÃO LÍPIDICA DAS MEMBRANAS

Da análise lipídica em plantas bem regadas, o teor total em ácidos gordos (TFA) parece ser menor nas cultivares Vg e Lagoa (ca 25 mg/g peso seco) que nas Vu3 e Epace (ca 30 e 32.5 mg/g peso seco, respectivamente) (Fig. 1). Sob condições de desidratação, os teores totais de ácidos gordos (TFA) decrescem rapidamente em Vu 3 (Fig 1). Em Vg e observado primeiro um aumento, atingindo valores de 40 mg/g peso seco a valores de potencial hídrico que rondam os -1.1 MPa seguido por um rápido decréscimo até aproximadamente 10 mg/g de peso seco que a valores de potencial de -2 MPa (Fig 1). Na Epace os teores de TFA sofrem um ligeiro decréscimo durante o período de stress (Fig 1). Os teores de TFA em Lagoa parecem não ser afectados pelo aumento de níveis de seca (Fig 1). Nesta cultivar, contudo, não foi possível analisar os teores de TFA ou a percentagem de ácido linolénico (18:3) a valores baixos de potencial.

Em plantas bem regadas, a percentagem de 18:3 é notavelmente estável em todas as espécies e variedades (Fig 2). Durante o tratamento de desidratação, a percentagem de 18:3 para Epace e Lagoa não parece ser afectada. Na Vu3 esta percentagem mantém-se estável até cerca de -1.5 MPa, depois da qual é observado um decréscimo em ambas as espécies

No que respeita ao efeito de seca na fotossíntese, verificou-se que a Amax é muito semelhante para a Vg e para as três cultivares de Vu, que frequentemente assumem valores entre 23 e 26 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig 3). Os máximos valores foram obtidos para Epace (31 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Contudo, com o decréscimo do potencial hídrico durante o período de stress, a Vg parece ser capaz de manter uma maior actividade fotossintética do mesófilo de que as outras, apresentando os mais baixos valores (2.0 $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de Amax a valores mais baixos de potencial hídrico (-1.9 MPa) que a Vu3, Epace e Lagoa que apresentam os seus mínimos a valores de potencial não inferiores a -1.5 MPa (Fig 3). Entre as cultivares de *Vigna unguiculata*, a Epace parece ser a que apresenta maiores valores de Amax durante os níveis iniciais de desidratação até -1.0 MPa, mostrando contudo uma dramática queda a teores de défice hídrico mais acentuados (Fig 3). A c.v. Lagoa é aparentemente a mais sensível à seca apresentando uma queda de cerca de 50% na Amax a -0.8 MPa (Fig 3). Nesta cultivar não foi possível medir o potencial hídrico a valores inferiores a -1.2 MPa dado que as folhas ficaram senescentes muito rapidamente

EFEITO DE STRESS HÍDRICO NOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE ÁCIDO ABCÍSICO.

No que diz respeito aos níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) (Fig 4) em plantas bem regadas a Vu 3 apresentou as médias mais elevadas (4057 mg/g peso seco), seguida da Lagoa (3039 mg/g peso seco) e Epace (1556 mg/g peso seco) cujos resultados foram semelhantes a Vg (1421 mg/g peso seco); estas foram de todas as cultivares as que mostraram os Nveis mais baixos de ABA. Com o desencadear da seca, as cultivares de Vu mostraram respostas diierentes para um estado de desidratação intermédio (75-85% RWC), apesar de os valores de ABA serem idênticos para as três cultivares de Vu (à volta de 4000 mg/g de peso seco). A variação em relação a condições de boa disponibilidade hídrica (85-95% RWC) foi muito diferente para cada uma delas. Enquanto a Vu3 não apresentou qualquer variação significativa (redução de 6%), Epace sofreu um forte aumento (170%) e a Lagoa mostrou teores de ABA superiores (38%). Para este nível de desidratação a Vg não mostra quaisquer diferenças comparadas com as plantas a plena hidratação, mantendo os valores mais baixos de todas as cultivares (cerca de 400 mg/g peso seco) (Fig 4).

Quando a seca se acentuou (65-75%), foi observado que na Vu3 os níveis de ABA aumentaram 42%, o que não aconteceu até este nível de desidratação. Pelo contrário, Lagoa e Epace parecem manter os seus teores de ABA relativamente aos níveis de stress anteriores, dado que não apresentam quaisquer diferenças significativas Na que diz respeito à Vg, apresenta um aumento de 60% do teor de ABA, mostrando uma tendência idêntica à do Vu3 ao longo do período de seca.(Fig 5).

ENSAIO DE CAMPO

Viu-se o efeito do tratamento de rega na produção de grão, da matéria sec-a e proteína bruta de seis variedades de *Vigna* nomeadamente (Lagoa, Frade grado, Frade miúdo, 504, Black eye e B21).

Na primeira colheita vê-se que apenas a variedade local "Lagoa" e a importada da Califórnia " Black Eye" tiveram produções significativas de grão.

Em relação à segunda colheita a produção foi nestas variedades muito inferior. É de salientar o comportamento destas variedades em relação à disponibilidade hídrica do solo

A rega não beneficiou a produção de grão, verificando-se que na maioria das variedades estudadas não aumentou a produção em relação às condições naturais (sequeiro)

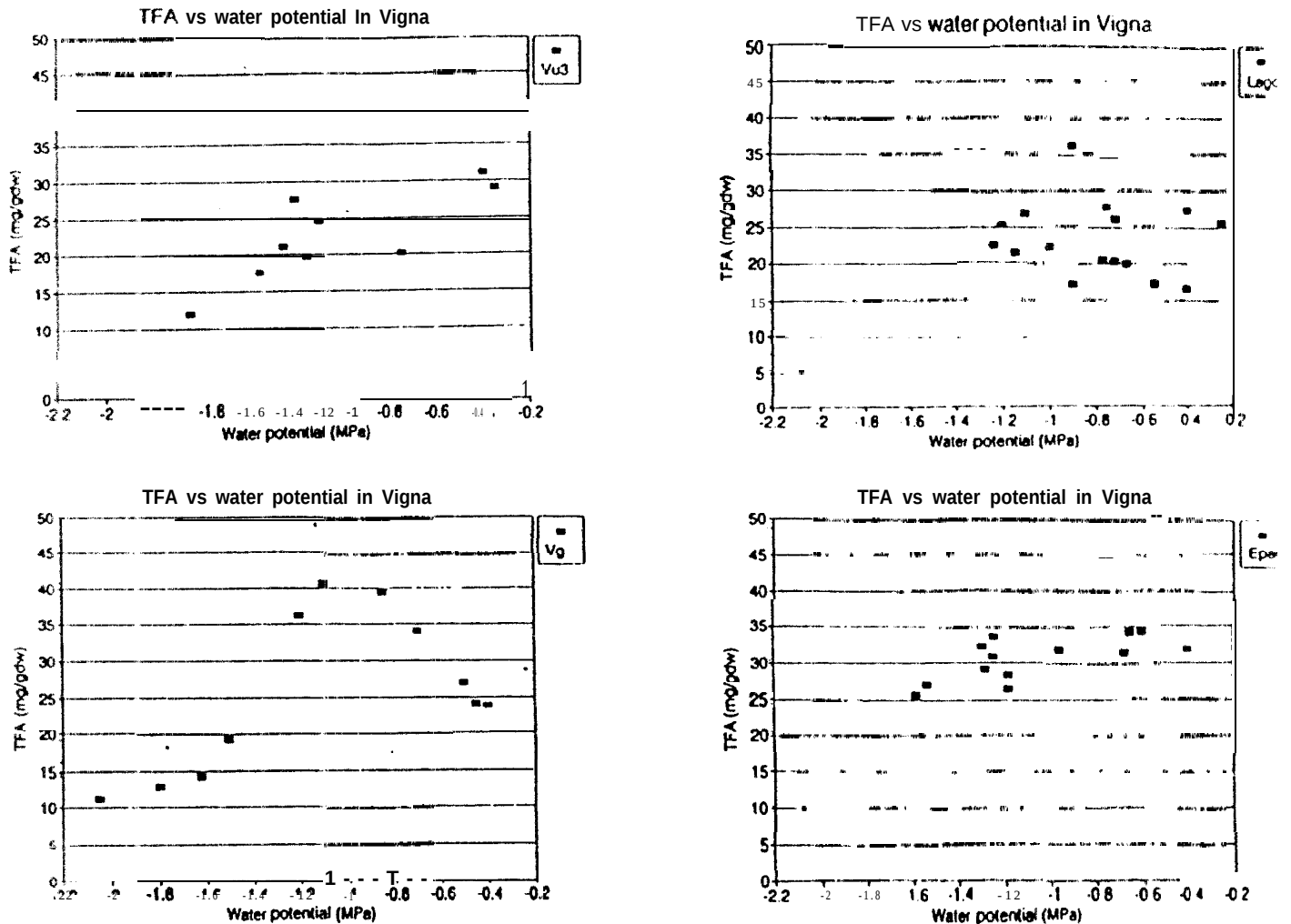


Figura 1: Efeito do déficit hídrico na fotossíntese, composição lipídica das membranas de *Vigna glabrescens* e três variedades de *Vigna unguiculata* (Vu3, Epace e Lagoa).

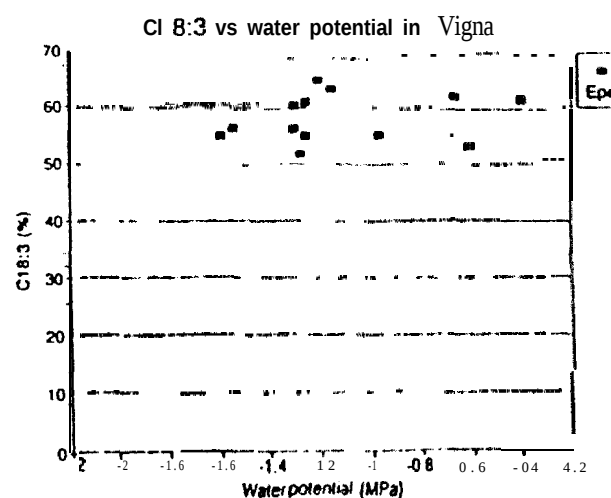
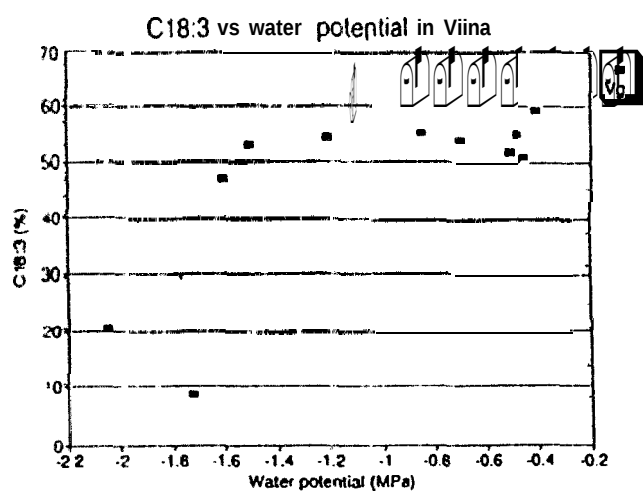
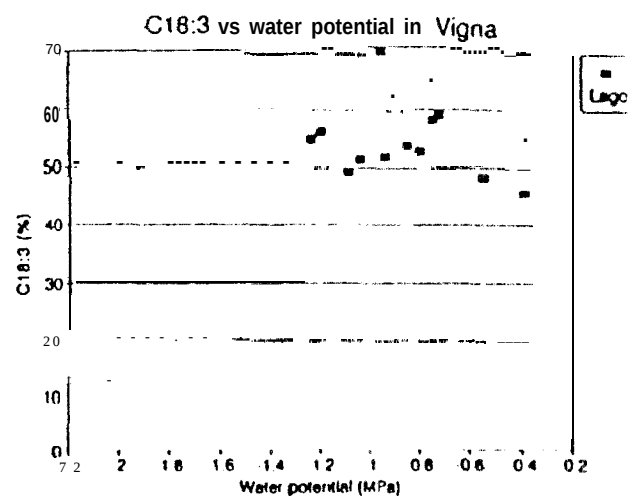
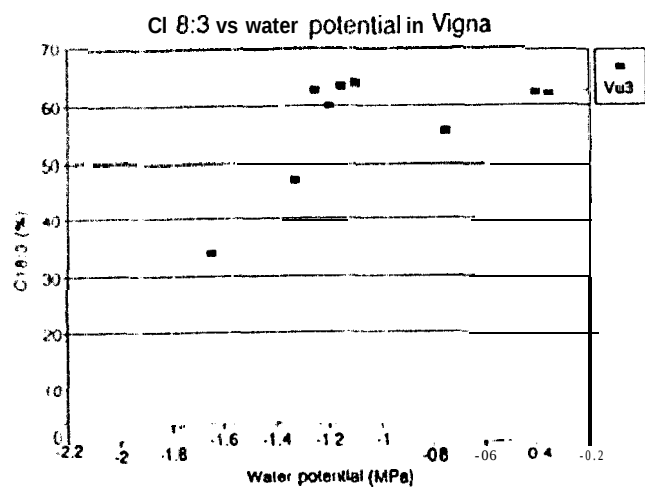


Figura 2: Efeito do déficit hídrico no teor de ácido linolénico (18:3) de *Vigna glabrescens* e três variedades de *Vigna unguiculata* (Vu3, Epace e Lagoa).

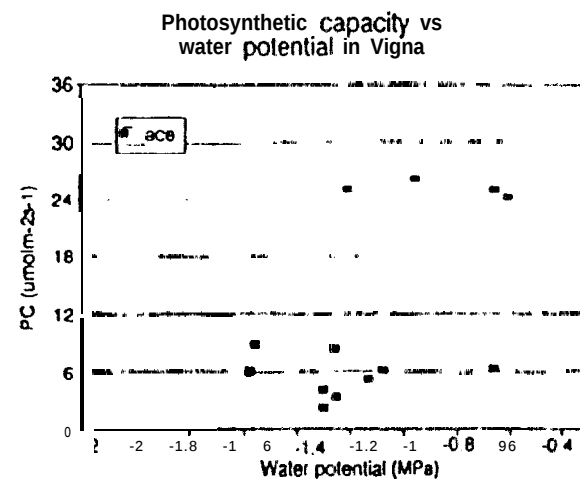
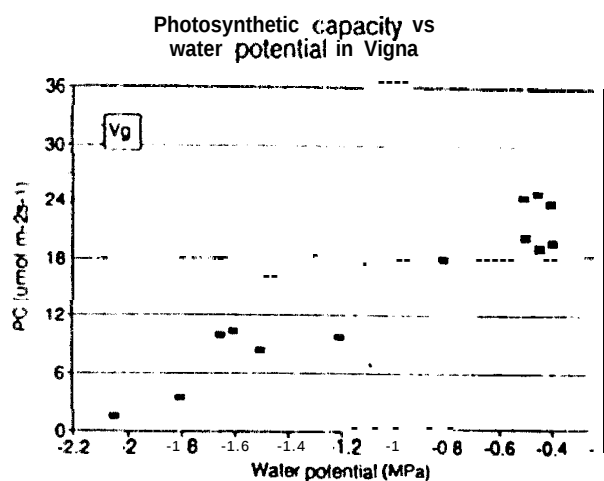
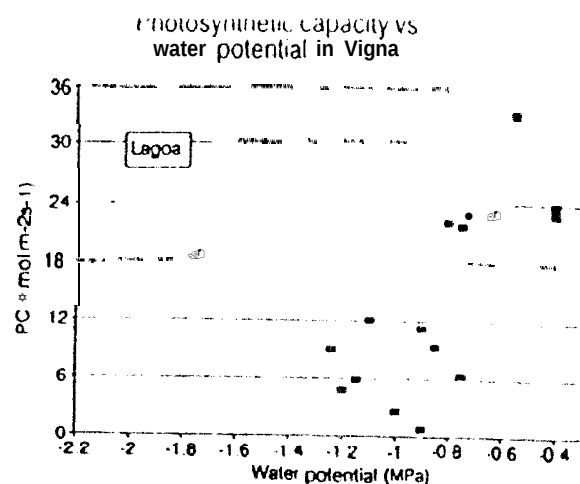
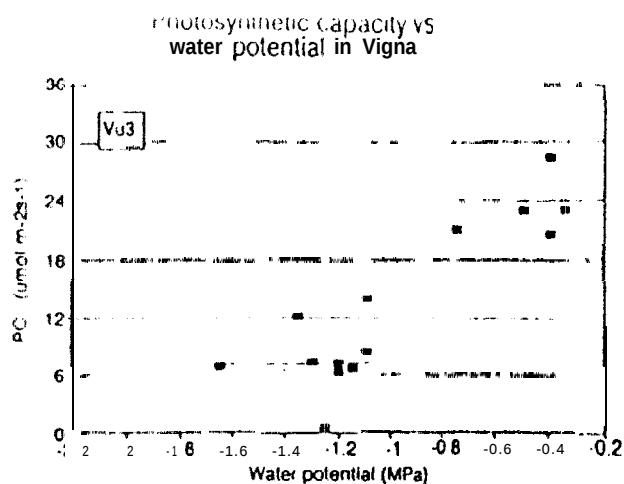


Figura 3 : Efeito de déficit hídrico na capacidade fotossintética de *Vigna glabrescens* e três variedades de *Vigna unguiculata* (Vu3, Epace e Lagoa).

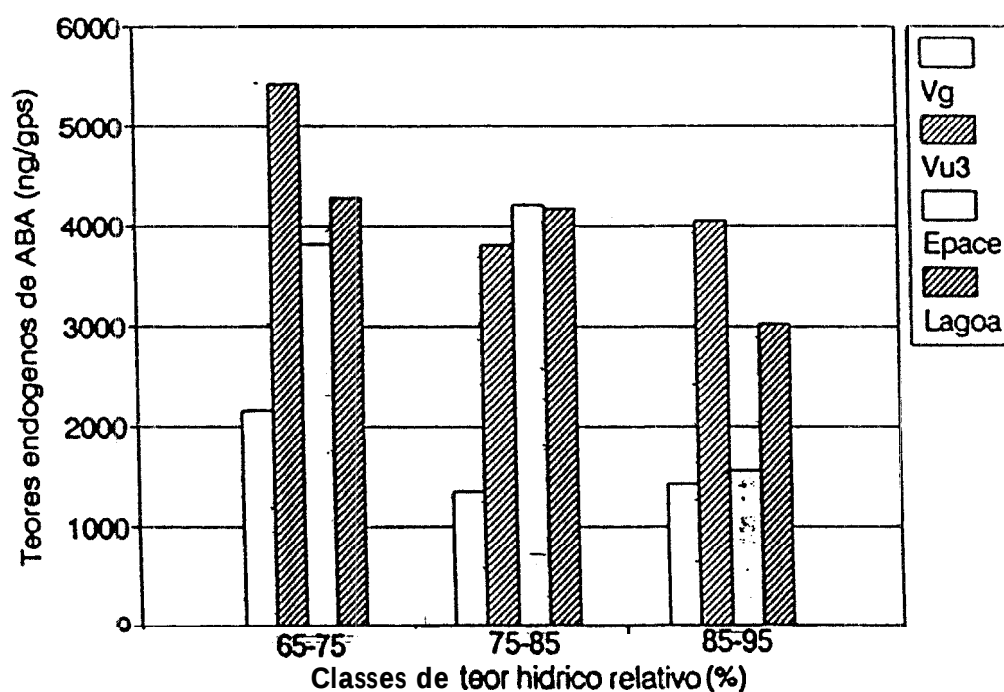


Figura 4: Efeito de stress hídrico nos níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) de *Vigna glabrescens* e três variedades de *Vigna unguiculata* (Vu3, Epace e Lagoa)

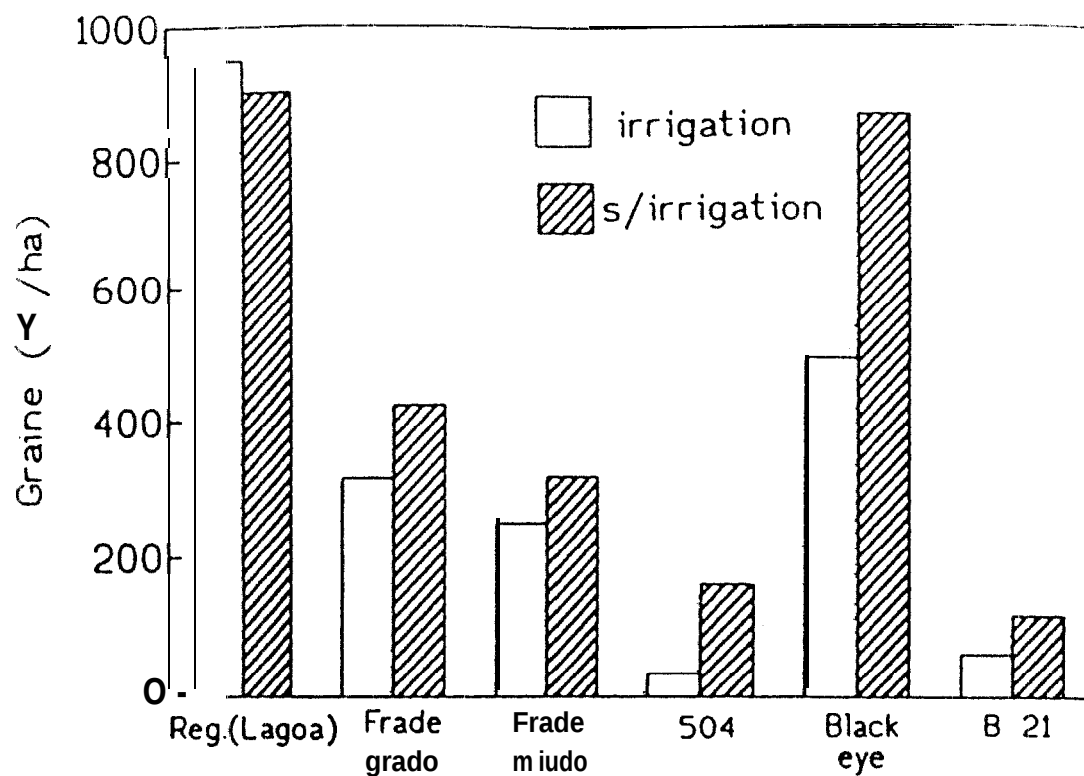


Figura 5. Efeito da rega na produção de grão de diferentes cultivares de *Vigna* (Quinta do Valongo -NE Portugal, 1ª colheita)

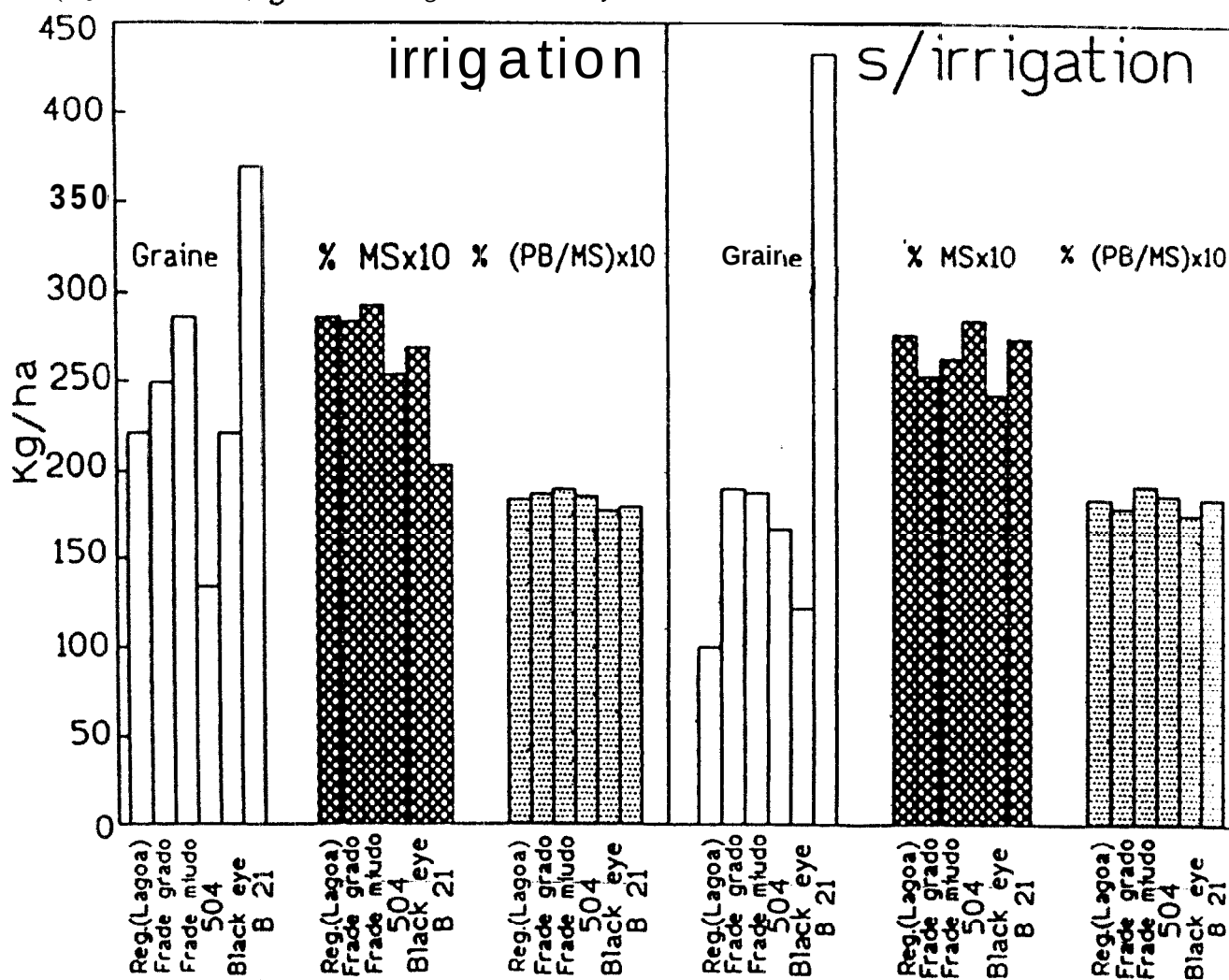


Figura 6: Produção de grão, percentagem da matéria seca e de proteína bruta/matéria seca de cultivares de *Vigna* cultivadas na Quinta do Valongo.

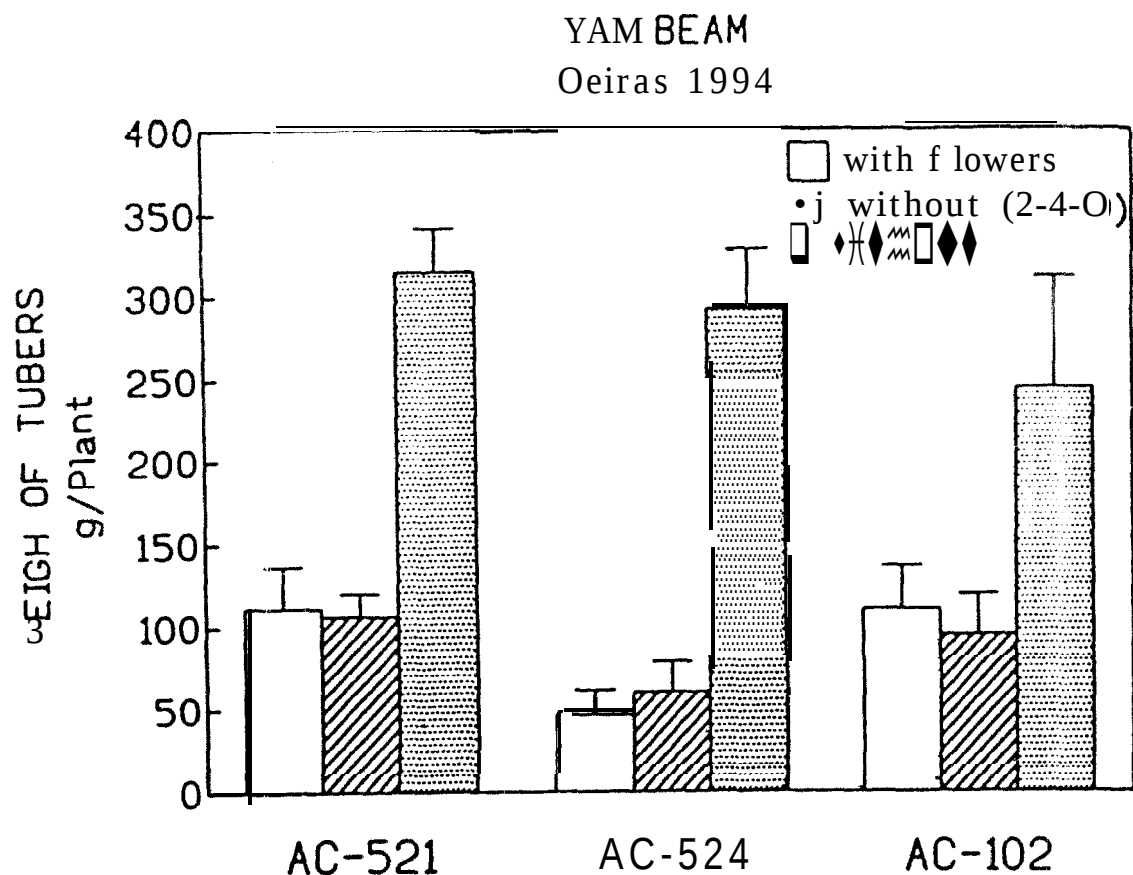


Figura 7- Produção de tubérculos/planta de *Pachyrhizus aipa* de plantas cultivados em vaso, em estufa em Oeiras, às quais foi permitida floração normal e noutras a que foram retiradas as flores, manualmente ou por aplicação de 2-4D.

PARIS, June 26 - July 1, 1994

EFFECTS OF DROUGHT STRESS ON ENZYMATIC BREAKDOWN OF
GALACTOLIPIDS IN COWPEA (*Vigna unguiculata* L.) LEAVES

Campos Paula¹ and Anh Thu Pham Thi^{2*}

1: Dep.Fisiologia Vegetal, Estação Agronômica Nacional, 2780 Oeiras, Portugal,

2. Laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale, Université Paris 7
Denis Diderot, 2 Place Jussieu, F-7524 1 Paris Cedex 05, France

• ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ URA ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

Lipidic composition seems to be **one** of the main factors **related** to membrane **resistance** under water stress. **Drought** provokes a decrease in polar lipid content of **Cotton** leaves, the galactolipids (**GL**) being more **affected** than the **phospholipids** (**PL**) (Pham Thi *et al.*, 1985). The decrease in **GL** content **could** be due to an increase in **galactolipase** activities **and/or** to a decrease in galactolipid biosynthesis. Studying two cultivars of *Vigna unguiculata*, Monteiro de Paula *et al.* (1993) demonstrated that water stress stimulated the catabolism of galactolipids. These authors **also** found that changes in biosynthesis and degradation rates of leaf polar lipids were less **pronounced** in the drought **tolerant** cultivar, possibly indicating a more stable **cell** membrane.

Lipolytic acyl-hydrolases (**LAH**) and phospholipases play a major role in plant polar lipid degradation (**Galliard**, 1975). Fatty **acids** (**FA**) resulting from **LAH** activity are the starting point for lipid peroxidation **phenomena**, which **can** in turn cause oxidation of membrane **proteins** and have damaging **effects** on the structure and **function** of the membrane. **El-Hafid et al.** (1989) demonstrated **that**, in **Cotton** leaves, **LAH** activities for ¹⁴C-MGDG increased under water stress.

In this study we investigated changes in MGDG- and DGDG- **LAH** activities, in two cultivars of *V. unguiculata* submitted to **drought** and differing in **their** degree of **tolerance** to water stress. A mild and severe **level** of stress were **obtained** by withholding irrigation for 7 to 12 days, in four weeks-old plants **grown** under **natural light** conditions. ¹⁴C-MGDG and ¹⁴C-DGDG used as **LAH** substrates were **obtained** supplying leaves with ¹⁴C-acetic acid, for 24h. **LAH** activity was measured as ¹⁴C free FA. **Results** will be discussed in order to detect if **LAH** activity for **GL** is somehow **enhanced** in the susceptible cultivar. Attention **will** be **given** to **any** changes which might occur in **LAH** activities **both** in soluble and in membranous fractions.

References

El-Hafid L., **Pham Thi A.T.**, **Zuily-Fodil Y.** and **Vieira da Silva J.**, 1989. Plant Physiol.Biochem. 27 : 495-502.

Galliard T., 1975. in **Recent advances** in the **Chemistry and Biochemistry** of Plant Lipids, Academic Press, New-York, pp 3 19-3 57.

Monteiro de **Paula F.**, **Pham Thi A.T.**, **Zuily-Fodil Y.**, **Ferrari-Iliou R.**, **Vieira da Silva J** and **Mazliak P.**, 1993. Plant Physiol.Biochem. 3 1: 705-715.

Pham Thi A.T., **Borrel-Flood C.**, **Vieira da Silva J.**, **Justin A.M.** and **Mazliak P.**, 1985 Phytochem 24: 723-727.

EFFECTS OF DROUGHT STRESS ON ENZYMATIC BREAKDOWN OF GALACTOLIPIDS IN COWPEA (*Vigna unguiculata* L.) LEAVES

Campos Paula¹ and Pham Thi Anh Thu²

1 : Dep.Fisiologia Vegetal, Estação Agronômica Nacional, 2780 Oeiras, Portugal, 2: Laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale, Université Paris 7 Denis Diderot, 2 Place Jussieu, F-75241 Paris Cedex 05, France, CNRS, URA 1180

Lipidic composition seems to be one of the main factors related to membrane resistance under water stress. Drought provokes a decrease in polar lipid content of leaves, the galactolipids (GL) being more affected than the phospholipids (PL) [1,2]. The decrease in GL content could be due to an increase in galactolipase activities and/or to a decrease in galactolipid biosynthesis. Studying two cultivars of *Vigna unguiculata*, Monteiro de Paula *et al.* [3] demonstrated that water stress stimulated the catabolism of galactolipids. These authors also found that changes in biosynthesis and degradation rates of leaf polar lipids were less pronounced in the drought-tolerant cultivar, possibly indicating a more stable cell membrane. Lipolytic acyl-hydrolases (LAH) and phospholipases play a major role in plant polar lipid degradation. Fatty acids (FA) resulting from LAH activity are the starting point for lipid peroxidation phenomena, which can in turn cause oxidation of membrane proteins and have damaging effects on the structure and function of the membrane. El-Hafid *et al.* [4] demonstrated that, in cotton leaves, LAH activities for ¹⁴C-MGDG increased under water stress.

In this study we investigated changes in MGDG- and DGDG- LAH activities, in soluble and membrane fractions of leaf extracts prepared from three cultivars of *V. unguiculata* submitted to drought and differing in their degree of tolerance to water stress.

Materials and methods.

Three cultivars of *V. unguiculata* (cv. 1180, drought-sensitive, cv. EPACE and IT-83D, drought-resistant), were grown in previously described conditions [1]. Drought was imposed by withholding irrigation for a period of 6 to 10 days. ¹⁴C galactolipids used as LAH substrates were obtained supplying leaves with ¹⁴C acetic acid, sodium salt, for 36h. They were subsequently extracted and purified according to [1]. Water potential (Ψ) was followed with a pressure chamber [5]. 4-5g fresh weight leaves were fixed in liquid nitrogen and homogenized in 0.1M MES buffer, pH 6.5, containing 1mM EDTA, 1mM cysteine, 5mM sodium metabisulfite, 5mM DTT and 0.5mM PMSF. After centrifuging, the supernatant was used as soluble enzymatic fraction. The pellet was resuspended in the same buffer containing 0.1M Triton X-100, and left for 15min for solubilizing the membrane proteins, recovered after centrifuging ¹⁴C-MGDG- and ¹⁴C-DGDG-LAH activities were measured according to [4]

Results

Figures 1 and 2 present the LAH activity in the soluble (A) and membrane (B) fractions of leaf extracts. Activity levels for membrane enzyme are generally higher than those found for the soluble enzyme, in the 3 cv. under study. For both DGDG and MGDG-LAH activities, the 2 resistant cv. (EPACE and IT-83D) showed significant lower values than the sensitive cv. (1183), at all water potential values. Apart from the soluble MGDG-LAH activity (fig. 1A), in all other cases, LAH activities drastically increased

Fig.1 : Effect of water stress on the activity of MGDG-LAH in soluble (A) and membrane (B) fractions from *Vigna unguiculata* leaf extracts

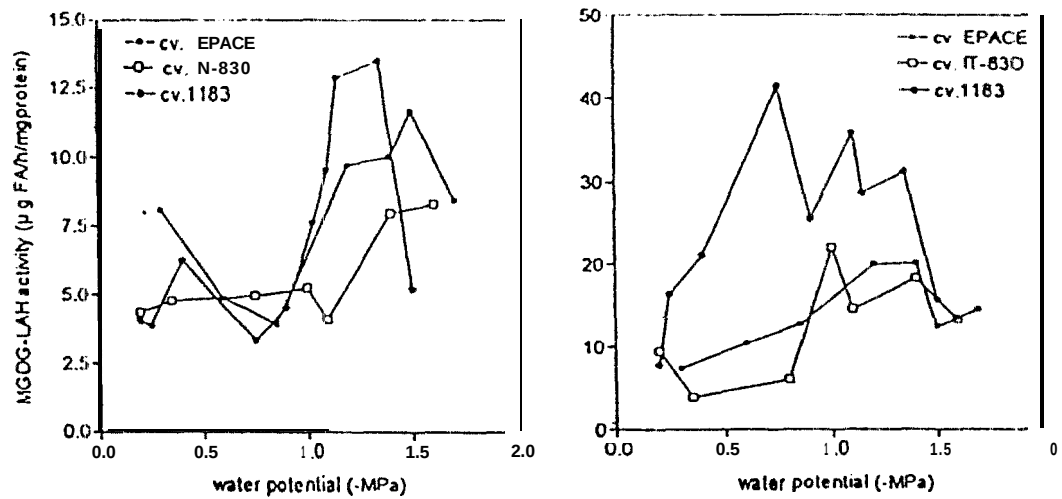
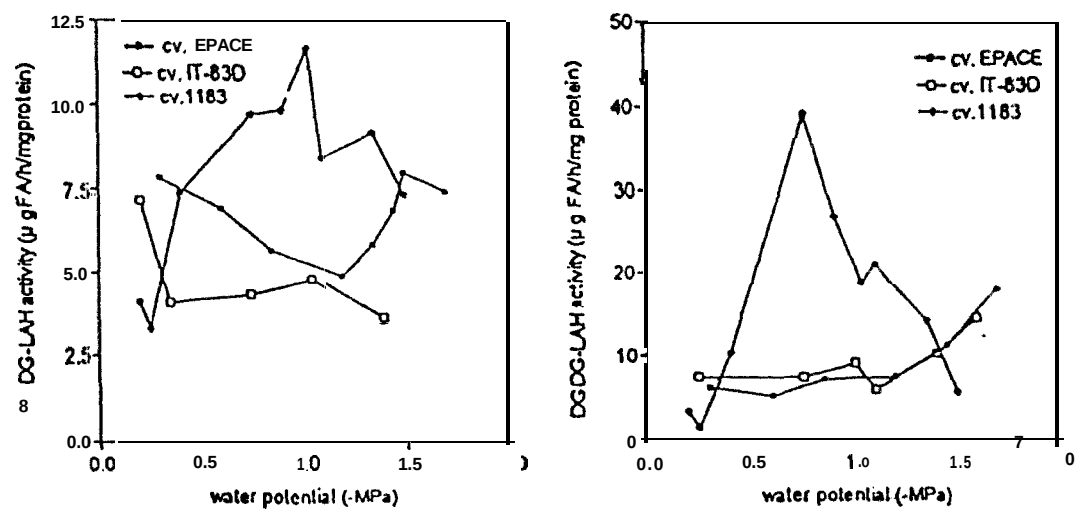


Fig.2 : Effect of water stress on the activity of DGDG-LAH in soluble (A) and membrane (B) fractions from *Vigna unguiculata* leaf extracts



from the earliest stages of drought treatment in the sensitive cv. At the most severe water deficits, LAH activities decreased sharply in this cv., contrarily to the 2 more resistant cultivars. The sensitive cv. 1180 also presented the highest stimulation of the LAH activity, being 5 to 10-fold higher than the controls. Furthermore, those maximum values were reached at rather moderate water deficits (-0.7MPa). In the 2 resistant cv. EPACI and IT-83D, LAH activities did not vary to a great extent, the most significant change being observed only for soluble MGDG-LAH activity.

Conclusion

It has been referred that in *Vigna unguiculata*, degradative phenomena in leaves submitted to dehydration are of the greatest importance, especially in species susceptible to drought [3]. An increase of LAH activities as well as a higher susceptibility of leaf lipid extracts to peroxidation may be at the basis of membrane disfunctions occurring under water stress [4,6]. In this study we observe that the activation of this enzyme, under water stress conditions, is different for the membrane or the soluble form of the enzyme. This is particularly evident in the sensitive cv. 1180.

In previous studies, we have demonstrated that drought susceptible *Vigna* species present higher 18:3-MGDG content of their leaf membranes [7]. On the other hand, LAH preferentially degrades polyunsaturated MGDG molecular species [3,4]. It could therefore be expected that LAH activity causes more damage to membranes of sensitive cv., which seems to be the case from the present results.

References

- 1 Pham Thi AT, Borrel-Flood C, Vieira da Silva J, Justin AM and Mazliak P. Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochem* 1985,24:723-727.
- 2 Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Vieira da Silva J, Justin AM, Demandre C, Mazliak P. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Sci* 1990,66:185-193.
- 3 Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y, Ferrari-Iliou R, Vieira da Silva J, Mazliak P. Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol Biochem* 1993;31:707-715.
- 4 El-Hafid L, Pham Thi AT, Zuily-Fodil Y, Vieira da Silva J. Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under stress; degradation of monogalactosyl-diacylglycerol. *Plant Physiol Biochem* 1989,27:495-502.
- 5 Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. Sap pressure in vascular plants. *Science* 1965,148:339-346.
- 6 Ferrari-Iliou R., d'Arcy-Lameta A, Iliou JP et al. In vitro photodynamic lipid peroxidation of total lipophilic extracts from leaves of bean plants. *Biochim Biophys Acta* 1993,1166:48-54.
- 7 Campos P, Pham Thi AT. Drought resistance and membrane lipids in *Vigna* sp. *Physiol Plant* 1990, 79:A113.

**Institut du Sahel
IN.SAH. (CILLS, Bamako)**

Rapport annuel 1994

**Responsable : Dr. Laemobaio NETOYO
(Agronome/Economiste)**

Décembre 1994

APPUI COORDINATION R3S AU CERAAS

JANVIER - DECEMBRE 1994

L'appui de la coordination du réseau R3S au Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (CERAAS) durant l'année 1994 se résume essentiellement au montage institutionnel de la phase II du projet (renforcement).

Mars 1994 Le financement de la phase de renforcement du CERAAS a été notifié en fin d'année 1993. La coordination du Réseau a fait une présentation officielle de cette phase à la VIIème Réunion Plénière qui a lieu à Banjul en mars 1994.

Avril 1994 La même démarche a été entreprise à la 27ème session du Conseil des Ministres des Pays membres du CILSS en Avril 1994 à Praia (Cap-Vert). A cette il a été notifié aux instances du CILSS que le financement actuel ne couvre pas totalement les besoins exprimés par le CERAAS pour sa phase de renforcement. La nécessité d'un financement complémentaire s'impose pour rendre réellement opérationnel le CERAAS. La coordination du Réseau a donc inscrit cette demande dans le Plan Triennal du CILSS.

Ces deux démarches avaient pour but de faire connaître l'évolution du CERAAS par ces instances politiques qui sont le CILSS et la CORAF.

Juin 1994 : En rapport avec le Chef de Projet, la coordination du Réseau a élaboré les ébauches du document de base pour la mise à disposition d'Experts Régionaux devant appuyer le Centre dans les travaux de Recherche et de Formation pour les quatre ans à venir. A cet effet des contacts avec les deux institutions impliquées dans la gestion du **CERAAS** ont été contactées. Il s'agit de l'ISRA où est basé le Centre et l'Institut du Sahel siège de la coordination du **R3S**.

Juillet 1994 : La rédaction des documents devant régir la gestion scientifique et administrative du Centre ont été affinés et présentés au Directeur Général de l'ISRA et au Secrétaire Exécutif de la CORAF. Le Directeur Général de l'ISRA nous donne l'assurance que désormais les contacts pour le fonctionnement futur du Centre se feront avec la Direction scientifique de l'ISRA s'il ne se pose pas d'autres problèmes entravant le bon fonctionnement du CERAAS.

A l'INSAH la philosophie de la future gestion scientifique et administrative du CERAAS a été exposée au Directeur Général de cette institution.

Août 1994 : Le coordonnateur s'est rendu à Dakar pour la finalisation des différents textes juridiques :

1. « Protocole de Mise à Disposition d'Experts Régionaux.
2. « Conseil Scientifique et Technique du CERAAS.

Ces textes sont actuellement approuvés par la CORAF, l'Institut du Sahel et l'ISRA

Novembre 1994 : Une mission conjointe Coordination et Chef de Projet CERAAS a été organisée et s'est rendue en Sierra Leone.

L'objectif était de discuter les modalités de mise à disposition de l'Expert Sierra Léonais pour un appui au montage et fonctionnement d'un laboratoire de Biochimie. Cette mission nous a permis de tester l'applicabilité du Protocole élaboré en Août 1994.

Décembre 1994 Dans la nouvelle organisation du CILSS il a été mis en place un organe régional de programmation qui a la responsabilité de la planification des activités de l'ensemble du système CILSS. Cet organe a tenu sa première réunion en Décembre 1994. La coordination du Réseau a présenté la phase du renforcement du CERAAS à la réunion préparatoire qui a eu lieu à l'INSAH en novembre.

ANNEXES

Décembre 1994

Institut du Sahel
IN.SAH. (CILSS, Bamako)

Rapport mission

Appui institutionnel **pour** la mise en place de la phase de
renforcement du Ceraas

Responsable : Dr. Laemobaio NETOYO
(Agronome/Economiste)

Décembre 1994

RAPPORT DE MISSION NO.4

Objet : Appui institutionnel pour la Mise en Place
de la Phase de Renforcement du CERAAS.

LIEU : Dakar et Bambey (SENEGAL)

PERIODE : 27 juillet 03 Août 1994

L. NETOYO

Bamako, Août 1994

CONTEXTE

Les infrastructures, les équipements et le personnel scientifique disponibles au CERAAS dès sa création en 1989 ne répondent plus aux besoins croissants exprimés par les chercheurs des SNRA et les autres partenaires qui participent à l'animation de ce laboratoire.

Face aux résultats encourageants obtenus en 2 ans et demi par le CERAAS, et devant la nécessité du maintien de la dynamique créée par l'équipe y travaillant pour le développement d'une communauté scientifique sur le thème "physiologie et génétique pour l'adaptation des plantes à la sécheresse", une phase de renforcement du centre s'impose pour répondre aux nombreux défis.

La requête de financement du renforcement du CERAAS a été introduite en 1991 auprès de l'Union Européenne et à deux de ses guichets.

Pour le volet "prise en charge des coûts de la recherche" conduite au CERAAS, la DGXII dans le cadre de son programme STD3 a été sollicitée. Le montant accordé en 1994 est de 850.000 ECU étalés sur 4 ans.

- Pour le volet renforcement qui couvre les coûts de la formation, d'investissements et d'infrastructures, la DGVIII a accordé en juin 1994 un financement d'un montant de 1.700.000 ECU pour une période de deux ans.

Une deuxième phase de consolidation du dispositif est nécessaire. A cet effet une proposition de financement complémentaire a été soumise à la même DGVIII pour un montant de 2.800.000 ECU.

La mise en oeuvre de cette phase de renforcement du CERAAS a des implications institutionnelles qui dépassent le cadre de la structure hôte qu'est l'ISRA. Pendant le montage du projet de renforcement, des discussions préliminaires ont été entamées avec les différents partenaires du CERAAS (SNRA, CORAF, INSAH) pour obtenir la garantie de leur disponibilité à faciliter leur contribution à la réussite de cette phase.

La coordination du réseau R'S jouera un grand rôle dans la formalisation du cadre institutionnel et scientifique du Centre.

C'est, dans ce contexte que, le coordonnateur du réseau R'S dégagera une partie importante de son temps pour appuyer le CERAAS à finaliser ce cadre institutionnel et scientifique. La première mission d'appui s'est déroulée du 27 juillet au 03 août 1994.

POINTS DISCUTES DU 27 JUILLET AU 03 AOUT

1. Elaboration des textes institutionnels.

Le chef du projet CERAAS et le coordonnateur du réseau R'S ont fait deux propositions de textes institutionnels à soumettre à l'avis des instances de tutelles que sont :

La CORAF et l'INSAH pour le volet régional

et l'ISRA pour la partie nationale.

1.1 Protocole d'accord pour la mise à disposition d'un expert régional au CERAAS

L'équipe qui assure l'animation scientifique au CERAAS ne dispose pas de compétences dans toutes les disciplines traitées. Dans le montage du projet de renforcement soumis aux bailleurs de fonds, cette contrainte a été prise en compte dans le plan de travail du CERAAS.

En outre, conformément aux approches dégagées dans les fora de réflexion sur la redynamisation de la recherche agronomique en Afrique au sud du Sahara, la notion de mobilité des chercheurs des SNRA a fait l'objet d'un large consensus :

1. au niveau de la CORAF :

Le renforcement des capacités de recherche des SNRA prévu dans les "Actes de la VI^è Plénière de la CORAF" en Mars 1993 et approuvé par les membres a mis l'accent sur cet aspect de mobilité des chercheurs. Le CERAAS a été cité en exemple comme point de départ concret de ce renforcement.

2. au niveau de l'INSAH :

Dans la mise en oeuvre du cadre d'action INSAH/SPAAR, 3 éléments viennent conforter cette notion de mobilité et disponibilité des chercheurs au profit d'un pôle de recherche (équivalent d'une base centre CORAF) :

- a - Le pôle de recherche est défini comme un programme régional ouvert à la coopération régionale. Ce programme devra alors être renforcé afin d'assumer pleinement sa mission de rayonnement régional.
- b - Les actions de recherche définies dans le cadre du pôle concernent l'ensemble des SNRA des pays membres du CILSS. Ce pôle doit constituer un point d'épanouissement des chercheurs des autres SNRA.
- c - Le pôle de recherche servira également de point de rencontre des chercheurs de la sous-région travaillant dans les mêmes domaines.

En application de ces différentes dispositions institutionnelles, il a été proposé aux SNRA (CORAF et CILSS) partenaires du CERAAS un "PROTOCOLE D'ACCORD POUR LA MISE A DISPOSITION D'UN EXPERT REGIONAL AU CERAAS".

Ce protocole doit être négocié à 2 niveaux :

1. Entre la CORAF, l'ISRA et le SNRA d'origine de l'expert à mettre à la disposition du CERAAS pour les SNRA dont les pays ne sont pas membres du CILSS.
2. Entre l'INSAH, l'ISRA et le SNRA d'origine de l'expert à mettre à la disposition du CERAAS pour les SNRA dont les pays sont membres du CILSS.

Il comporte neuf points de propositions pour la gestion de ce protocole. (cf. projet de protocole).

Ce projet de protocole a déjà été soumis au Secrétaire Exécutif de la CORAF qui a apporté les amendements nécessaires. Il reste à recueillir les avis des Directeurs Généraux de l'ISRA et de l'INSAH. Les discussions de l'application de ce protocole par les SNRA se feront après approbation de l'ISRA et de l'INSAH lors d'une mission tournante auprès des partenaires africains (SNRA).

1.2. Conseil Scientifique et Technique du Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse (CST-CERAAS)

Le CERAAS est une partie intégrante des programmes de l'ISRA. De ce fait il est soumis aux modalités de contrôle, de suivi et d'évaluation au même titre que les autres programmes de l'ISRA. Cette disposition lui confère d'abord le caractère national. Cependant, sa mutation en base-centre (ou pôle de recherche) lui donnant le mandat régional impliquant d'autres SNRA et structures régionales (CORAF et CILSS) nécessite qu'un cadre de même nature, c'est à dire de contrôle, de suivi et d'évaluation scientifique soit mis en place de façon consensuelle pour garantir sa crédibilité sur le plan régional et international.

A cet effet, il a été proposé en plus des organes de contrôle de l'ISRA, de l'Assemblée générale et du comité Directeur du réseau R'S, un conseil scientifique et technique qui aura pour tâche essentielle d'exercer un contrôle plus rapproché et un suivi régional des activités du CERAAS. Ce conseil scientifique et technique ne constitue pas un organe décisionnel, mais assiste et aide le responsable du projet CERAAS à assurer la cohérence des activités scientifiques et leur programmation avec une vision régionale. Sa constitution suit les procédures classiques de mise en place des conseils scientifiques des structures de recherche, (cf. projet).

2. Etat d'avancement de la mise en place du projet CERAAS au 31 juillet 1994

1.1 Administration et finances

Le démarrage de la phase de renforcement du CERAAS coïncide avec une période de restructuration de la gestion de l'ISRA. Cet événement a ralenti la mise en place des dispositions institutionnelles devant régir le projet.

Grâce à la compréhension des autorités de l'ISRA, des dispositions transitoires ont été prises pour ne pas retarder les activités du projet dont le financement pour le volet recherche et formation est disponible depuis le 1er trimestre 1994.

Un mémorandum du 20 juillet 1994 du Directeur Général de l'ISRA autorise le Directeur des Recherches sur les Cultures et Systèmes Pluviaux et le responsable du projet CERAAS à exécuter les dispositions transitoires permettant d'assurer le démarrage du projet. Ces dispositions traduisent la volonté de la Direction Générale de l'ISRA d'accorder une autonomie de gestion au projet pour réduire les éternels et inévitables problèmes de lenteur administrative qui pénalise le plus souvent l'efficacité recherchée dans l'exécution des activités spécifiques comme celles prévues dans la phase de renforcement du CERAAS. Ainsi, dans les dispositions prévues pour la restructuration de la gestion de l'ISRA, le projet fonctionnera comme un centre

décentralisé relié à la gestion centrale de l'ISRA.

Un premier virement de 25.000.000f cfa est opéré par la Direction Générale de l'ISRA, et sera géré selon les modalités des dispositions transitoires en attendant la finalisation du cadre général de gestion de l'ISRA.

1.2. Volet Scientifique

Les activités scientifiques du CERAAS sont ralenties depuis la fin du financement STD2. Les responsables du projet consacrent la plus grande partie de temps au montage de la phase de renforcement. Parallèlement à cela, le CERAAS continue sa mission de formation et de recherche.

A. Formation

- 2 stagiaires tchadiens de l'Ecole des Cadres Ruraux de Bambey en fin de cycle effectuent actuellement leur stage au centre.
- une étudiante de l'ORSTOM et une de l'ENSAM France séjournent également au CERAAS en ce moment.

B. Recherche

Une douzaine d'essais sont actuellement en cours d'exécution par le CERAAS. La majorité de ces essais sont menés par les chercheurs de l'ISRA, car les moyens de séjour des chercheurs des autres SNRA de la sous-région sont épuisés depuis la fin de financement STD2.

Il est prévu l'arrivée d'une stagiaire argentine de l'INTA de CORDOBA et d'un chercheur Togolais de l'INCV (DRA) en début octobre 1994, sur le financement STDIII (phase de renforcement).

Pour ce qui est de la mise à disposition d'expertise régionale, en attendant de finaliser le protocole d'accord et de le faire approuver par les SNRA partenaires du CERAAS, deux candidatures ont été identifiées. Les négociations sont actuellement en cours avec leurs institutions d'origine pour leur mise à disposition.

Il faut signaler que c'est une procédure exceptionnelle qui sera appliquée pour le maintien de leur candidature (consultation), faute de cadre institutionnel approuvé. Il s'agit :

d'un Sierra Léonais : ROY MACAULEY Harold, Docteur en biologie végétale tropicale qui apportera un appui au CERAAS sur les aspects biochimiques: Sécheresse et protéines ;

et d'un Nigérian:: NWALOZIE, biophysicien qui traitera pendant son séjour des relations de la dynamique de la photosynthèse et échanges gazeux.

L'équipe scientifique qui coordonne les activités du CERAAS ne dispose pas d'agronome qui aura en charge le pilotage des essais et expérimentations, Il faudrait envisager dans cette nouvelle phase combler ce vide.

. DISCUSSIONS AVEC LE CABINET D'AUDIT ENRST ET YOUNG

Le cabinet d'audit (comptable; ENRST et Young est entrain de finaliser les conclusions de son étude sur la restructuration de la gestion de l'ISRA. Nous avons jugé nécessaire de discuter avec les auditeurs de ce cabinet pour avoir une idée de leur perception sur le dispositif CERAAS au sein de l'ISRA. Cette rencontre a été l'occasion de fournir les plus amples informations sur :

- la redynamisation de la recherche agricole en Afrique au sud du sahara ;
- la notion de pôle de recherche et de base-centre ;
- la responsabilisation et l'engagement des SNRA dans la gestion scientifique, technique, administrative et financière de ces pôles et bases-centres.
- et la mobilité des chercheurs des SNRA.

Nous avons retenu à l'issue de cette rencontre que la place du CERAAS au sein de l'ISRA est mieux comprise: c'est un programme de l'ISRA qui tire part de ses avantages comparatifs dans le domaine de la physiologie et de la génétique pour l'adaptation à la sécheresse est ouvert à une coopération régionale. Il devient de ce fait un programme à vocation régionale. Le cabinet pense que c'est une approche pertinente qui contribuera à renforcer nos SNRA, la coopération et de l'intégration régionales en matière de recherche agricole.

, VISITE A LA DIRECTION GENERALE DE L'ISRA

Nous avons rencontré les responsables de l'UIG (Unité Informatique de Gestion) de l'ISRA, qui ont fourni des informations sur les procédures d'intégration du projet à l'unité centrale de gestion de l'ISRA.

Pour garantir la compatibilité de la gestion du projet CERAAS par rapport à la gestion centralisée de l'ISRA, il est prévu que le projet se dote du même matériel informatique dont la grande capacité permettra au CNRA de Bambey d'expérimenter la gestion d'un centre décentralisé relié à la gestion centrale.

La rencontre avec le Directeur Général de l'ISRA avait pour but; de faire le point sur la mission du coordonnateur. Il nous a rassuré que toutes les dispositions sont prises pour assurer la bonne exécution du projet, malgré les lenteurs liées aux procédures administratives.

Pour le suivi des activités courantes du CERAAS, il n'est pas nécessaire d'interpeller le Directeur Général à chaque mission du coordonnateur. Les mécanismes de gestion de ce projet ont fait l'objet d'un consensus au niveau de l'ISRA. Le Directeur Scientifique est en mesure de satisfaire les préoccupations exprimées par le projet. La coordination du réseau a pris note de cette bonne disposition qui contribue à la bonne exécution des activités du CERAAS.

RENCONTRE AVEC, LE SECRETAIRE EXECUTIF' DE LA CORAF

s projets de cadres institutionnels, (le protocole d'accord et le Conseil Scientifique et Technique) ont été présentés au Secrétaire Exécutif de la CORAF qui y a apporté ses amendements. Un compte-rendu des différents points traités pendant la mission a été fourni au Secrétaire Exécutif.

Nous avons profité de cette rencontre pour informer le Secrétaire Exécutif que les fonds alloués pour le volet experts régionaux seront versés par son Secrétariat. Cette disposition qui évitera des transferts de fonds de Dakar à Bamako, puis de Bamako à Dakar a été proposée par l'INSAH qui délègue ainsi ses pouvoirs de gestion à la CORAF.

CONCLUSION

La réorganisation de la recherche agricole en Afrique au sud du Sahara constitue ces dix dernières années la préoccupation principale des hauts responsables de ce secteur. Cette prise de conscience a conduit à une approche qui prend plus en compte les besoins exprimés par les SNRA et intègre la dimension de coopération régionale entre eux en matière de recherche agricole.

Cette dynamique a été à l'origine de la création de la CORAF qui dans son évolution à travers les réseaux qu'il pilote a préconisé la notion de base-centre. A une dimension géographique plus réduite les pays du Sahel regroupés au sein du CILSS ont adopté une démarche similaire qui a abouti à la notion de pôle de recherche.

Le CERAAS situé à l'intersection de ces deux démarches qui ont pour ambition le renforcement et la responsabilisation dans la gestion scientifique et Technique des SNRA, constitue un bon exemple de concrétisation de ces notions. Il constitue en outre le seul exemple de base-centre ou pôle de recherche qui est né des critères d'éligibilité établis par la CORAF et le CILSS/INSAH.

L'ISRA a joué un rôle de précurseur en menant à terme la première phase des activités du CERAAS. Il consolidera sa position de leader en la matière dans cette seconde phase par la mise en place d'un cadre institutionnel de gestion du CERAAS, répondant aux préoccupations contenues dans les notions évoquées plus haut. Le succès de la phase de renforcement constituera une preuve de la capacité de nos SNRA de s'adapter au contexte de l'évolution scientifique et d'amorcer une véritable coopération régionale entre eux et les autres structures de recherche opérant dans la région.

**CONSEIL SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DU
CENTRE D'ETUDE REGIONAL POUR L'AMELIORATION DE
L'ADAPTATION A LA SECHERESSE (CST - CERAAS)**

I. DEFINITION

Le Conseil Scientifique et Technique du CERMS est un organe régional conçu et mis en place pour aider au suivi scientifique et technique des activités de recherche et de gestion du CERMS, il se distingue à ce titre des organes de suivi et de contrôle statutaires de l'ISR A Institution hôte

II. ROLE

Il apprécie la cohérence des activités scientifiques du CERMS avec la problématique définie par le réseau R3S et la conformité avec les priorités retenues par l'Assemblée Générale du réseau.

Il assiste le responsable du projet CERMS pour le suivi scientifique, la programmation des activités régionales et la gestion technique, financière et administrative

III. COMPOSITION

Le CST . CERAAS est composé de personnalités scientifiques et techniques indépendantes, choisies pour leur compétence dans le domaine d'activités du CERAAS, pour leurs expériences dans la gestion de la recherche agricole au niveau régional, dans le transfert de technologies générées et dans la gestion administrative et financière des fonds régionaux

Il est constitué de

1. Un (1) représentant des SNRA membres de la CORAF/CILSS, désigné sur proposition conjointe de la CORAF et du CILSS/INSAH et obéissant aux critères de désignation des membres du comité.

2 Deux (2) représentants des Universités des pays du Nord pour le renforcement de la coopération existant entre le CERMS et ces établissements.

3. Un (1) représentant du CIRAD, comme membre associé de la CORAF ayant la plus grande implication scientifique dans les domaines de recherches traitées au CERMS

4. Un représentant des CIRA (Centres Internationaux de Recherche Agricole), pour veiller à la complémentarité et consolider les aspects de collaboration

5. Un (1) représentant des organismes de développement agricole désigné sur proposition conjointe de la CORAF et de CILSS/INSAH, veillant aux aspects de transfert de technologies.

6 Deux (2) représentants de bailleurs de fonds principaux

7 Le responsable du projet CERAAS assurant le secrétariat du Comité

Le Directeur Scientifique de l'ISR A et le Coordonnateur du réseau R3S participent à ce comité en tant qu'observateurs permanents

IV . FONCTIONNEMENT

Le CST CERAAS se réunit sur convocation de son Président une fois l'an et à l'initiative du responsable du projet CERAAS en accord avec les instances de tutelle CORAF CILSS-ISRA et la coordination du réseau R3S.

Le calendrier et l'ordre du jour des séances du CST seront établis par le responsable du projet CERAAS.

Le CST peut se réunir en session extraordinaire dans l'année à la demande des 2/3 de ses membres.

Ses réunions ne peuvent se tenir que lorsque les 2/3 de ses membres sont présents

La durée du mandat des membres du CST est de deux ans renouvelable une fois, à l'exception de ceux désignés conjointement par la CORAF et le CILSS Ces derniers ont un mandat de un (1) an non renouvelable. Cette **exception** offre la possibilité d'une plus large participation des SNRA membres de la CORAF et du CILSS

Les bailleurs de fonds et le responsable du projet CERAAS siègent de **manière permanente** au CST

Le renouvellement des membres du CST à l'exception des bailleurs de fonds et du responsable du projet CERAAS se fera tous les 2 ans au 1/3 de ses membres

Les membres du CST éliront en leur sein un président.

Le CST peut élaborer un **règlement intérieur** qui régira son **fonctionnement**

Le responsable scientifique du **projet CERAAS**, membre du CST assurera le secrétariat du conseil et sera chargé en rapport **avec** le président du CST de l'**élaboration** et de la finalisation du rapport des réunions du conseil

Protocole d'accord pour la mise à disposition d'un expert régional au CERAAS

Entre

- L'INSAH ou la CORAF
- L'ISRA/CERAAS

et

- le SNRA d'origine de l'expert

Il est convenu ce qui suit

1. Cadre

Le CERAAS, base-centre du R3S, et laboratoire national à vocation régionale de l'ISRA, ouvre son expertise en confiant la conduite d'une partie de ses activités de recherches à des chercheurs des SNRA

Cette ouverture contribuera à rationaliser l'utilisation des compétences régionales telle qu'elle est contenue dans la notion de base-centre (CORAF) et de pôles de recherche (CILSS)

En retour l'expert régional bénéficiera de l'environnement scientifique et technique propre à lui permettre d'augmenter le niveau de son expertise et de l'exploiter à la fin de son séjour dans la conduite des programmes de recherche menés dans son institution d'origine

2. But

Ce protocole définit les conditions de la mise à disposition des chercheurs des SNRA venant assurer une expertise au CERAAS. Il constitue un support à la concrétisation de la notion de mobilité des chercheurs des SNRA au sein des structures de la région.

3. Obligations de l'INSAH/ou la CORAF

L'INSAH/ou la CORAF garantit le statut d'expert régional du chercheur du SNRA pendant la durée de sa mise à la disposition au CERAAS. Ces garanties concernent notamment

- la bonne exécution du contrat liant l'expert au CERAAS

et

- la bonne utilisation des fonds mis à la disposition du Ceraas pour assurer le fonctionnement de l'expert

4. Obligations du SNRA d'origine

Le SNRA d'origine trouvera les arrangements auprès de l'administration de son pays pour garantir le maintien du poste de l'expert durant son séjour au CERAAS. Ces garanties concernent principalement

- la prise en compte de ses activités au CERAAS dans la conduite de son plan de carrière;
- le maintien de son salaire et de ses avantages durant son séjour au CERAAS

5. Obligations du CERAAS/ISRA

Le CERAAS/ISRA prévoiera dans son budget une indemnité forfaitaire couvrant les frais de survie, de logement et de déplacement de l'expert durant son séjour. Ce budget sera géré selon les modalités précisées dans le chapitre 8.

Le CERAAS/ISRA assurera le cadre de travail permettant l'épanouissement du chercheur, mis à sa disposition.

6. Obligations du chercheur mis à disposition.

L'expert régional mis à la disposition du CERAAS/ISRA sera placé sous la responsabilité hiérarchique du Chef de projet. Il se conformera à la réglementation administrative en vigueur à l'ISRA qui est l'institution hôte du CERAAS.

Il produira à la fin de son séjour un rapport circonstancié faisant un bilan de ses activités de recherches au CERAAS et dressant les perspectives pour la poursuite des travaux et leur valorisation.

7. Durée de mise à disposition

Le présent accord entre en vigueur à partir du départ effectif de l'expert régional pour le CERAAS. Il demeure valide pendant toute la durée de son séjour au CERAAS.

La durée de la mise à disposition ne peut excéder 12 mois renouvelables une seule fois.

8. Budget et modalités de paiement

Le budget nécessaire à la prise en charge de l'expert régional est clairement formulé dans le budget du CERAAS. Les paiements se feront par l'intermédiaire de la CORAF en accord avec l'INSAH et l'ISRA.

9. Litiges et amendements

Tout litige pouvant surgir de l'exécution du présent accord sera réglé à l'amiable entre les parties contractantes.

Tout amendement de ce protocole se fera en accord mutuel direct des parties signataires.

Pour le SNRA

Pour la CORAF/ou l'INSAH

Pour l'ISRA/CERRAS
Le Directeur Général

**Institut du Sahel
IN.SAH. (CILLS, Bamako)**

Rapport mission en Sierra Leone

**Responsable : Dr. Laemobaio NETOYQ
(Agronome/Economiste)**

Décembre 1994

Rapport de mission en Sierra Leone

D. ANNEROSE (CERAAS, ISRA/CIRAD) et L. NETOYO (IN.SAH./CILLS)

Introduction.

Afin de faire face à l'importante demande régionale en matière de recherche et de formation dans le domaine de l'adaptation à la sécheresse, la Communauté Européenne poursuit son appui pour le renforcement du CERAAS. Il est envisagé notamment de s'appuyer sur **les compétences** régionales afin de développer l'expertise dans les thèmes disciplinaires encore peu étudiés.

Parmi ces **thèmes**, la biochimie de l'adaptation à la sécheresse est encore peu travaillée au CERAAS. Le développement de nos capacités de recherche dans ce **domaine** permettra d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'adaptation à la **sécheresse**. Il contribuera aussi à renforcer **le** transfert, vers les SNRA du CILSS et de la CORAF, de concepts et méthodologies bien maîtrisés par les partenaires européens du CERAAS.

Le Dr. H. Roy-Macauley du Département de Botanique de l'Université de Sierra Leone (DBUSL) a terminé récemment une thèse de biochimie au Laboratoire de Biochimie et de Physiologie de l'**Adaptation** Végétale (LBPAV) de l'Université Paris 7. Il s'est déclaré intéressé par la proposition d'effectuer un séjour au **CERAAS** afin de contribuer au montage et au démarrage d'un laboratoire de biochimie.

L'objectif principal de cette mission était régler avec le DBUSL les aspects institutionnels de la mise à disposition du Dr H. Roy-Macauley. Il s'agit là de la première tentative de concrétisation du principe souvent évoqué de la mobilité des chercheurs au sein de la CORAF.

Pour cela le Secrétaire Exécutif de la CORAF a sollicité l'appui du Dr R.A.D. Jones, **correspondant** de la CORAF en Sierra Leone, afin de faciliter les discussions entre Messieurs NETOYO et **ANNEROSE** et le Professeur N. A. **COLE**, Chef du DBUSL.

La mission a quitté Dakar le 06 novembre 1994 et a séjourné à Freetown du **06** au **09** novembre 1994.

Le 07/11/94 :

Discussions au NARCC.

La mission a rencontré Mme **Francine** NGEBA, Chef des services administratifs du National **Agronomic Centers** Coordination (NARCC) qui lui a fait une présentation des activités de cet organisme dont le Dr. R.A.D. JONES assure la direction. Cet organisme coordonne l'ensemble des activités des institutions de recherche agronomique de la Sierra Leone. Ces recherches sont **effectuées** dans 2 institutions :

l'Institut of Agronocal Research (I.A.R.) à Njola situé au nord du pays et,
le ROKUPR Rice Research Station situé à 400 km au sud de Freetown

Le Dr. Jones devant revenir de mission le 08/11/94, Mme Francine NGEBA, à la demande de la mission prend les dispositions pour l'organisation d'une première rencontre au DBUSL.

Discussions à l'Université de Sierra Leone.

La mission a ensuite rencontré le Pr. COLE et le Dr. H. Roy-Macauley. Le Pr COLE a fait part à la mission de son accord de principe pour la mise à disposition du Dr. ROY-MACAULEY au CERAAS. Il a cependant exprimé le souhait de voir cette coopération se formaliser dans le cadre d'un protocole d'accord entr ele CERAAS et le DBUSL

Nous avons exposé au Pr. COLE les principes de fonctionnement de la CORAF et de ses réseaux. Nous avons proposé que la préparation de ce protocole fasse l'objet d'une discussion initiale avec le Dr. JONES, représentant la CORAF en Sierra Leone. Les participants décident d'un commun accord de se rencontrer dès son retour de mission

Le Dr. ROY-MACAULEY a ensuite présenté les laboratoires du Département à la mission. Cette visite nous a permis de constater que le DBUSL, et l'Université en général, manquent cruellement de moyens en équipement et en fonctionnement malgré une capacité en moyens humains qui semble bonne. Les discussions que la mission aura ultérieurement avec le DR. JOINES confirmeront que ce constat est généralisable et même aggravé dans les structures de recherches agronomiques du pays. Il apparaît nécessaire à la mission que la CORAF apporte un appui rapide aux institutions de ce pays afin qu'elles puissent améliorer décemment leur capacité de recherche. Il s'agit là d'un préalable indispensable au bon développement de la coopération régionale avec ce pays dans lequel les compétences et l'expertise humaines sont indéniablement élevées.

Le 08/11/94 :

Réunion au NARCC.

Une réunion s'est tenue dans les locaux du Dr. Jones, avec les représentants du Département. Nous avons convenu après discussion que les règles de fonctionnement de la CORAF constituait un cadre général satisfaisant pour la coopération envisagée avec le DUBSL. Nous avons convenu de la nécessité d'élaborer un protocole d'accord complétant ce cadre général sur 3 points particuliers :

- la mise à disposition du Dr. ROY-MACAULEY ,
- l'appui du CERAAS à la formation d'étudiants du DBUSL,
- l'appui du CERAAS aux initiatives permettant de renforcer les capacités de recherche propres du DBUSL.

Un protocole d'accord a été rédigé pour avis et agrément le lendemain.

Discussions sur les aspects scientifiques.

D ANNEROSE et H. ROY-MACAULEY ont continué les discussions afin de préciser les aspects scientifiques de la mission du Dr. ROY-MACAULEY au CERAAS. Celle-ci s'articulera autour

- du montage au CERAAS d'un laboratoire fonctionnel de biochimie de l'adaptation à la sécheresse,
- du développement des travaux sur le métabolisme de l'ABA en conditions de stress hydrique,
- de la formation par la recherche dans le domaine considéré de chercheurs des SNRA membres de la CORAF et du CILLS.

Rencontre à l'Ambassade de France.

Nous avons rencontré Mr Georges FAYE, Attaché culturel et scientifique de l'Ambassade de France afin de lui exposé le but de la mission et la coopération que nous développons avec la Sierra Leone.

Nous lui avons fait part de nos constatations sur l'état de vétusté des laboratoires et le manque de moyens du Département. Il nous a indiqué son souhait d'examiner dans le cadre de la coopération régionale que nous développons les possibilités d'appuyer le renforcement des moyens du Département- A sa demande, une note lui a été rédigée (voir annexe) afin de mieux informer l'Ambassade sur la nature de cette coopération et ainsi mieux appuyer les futures initiatives.

Le 9/11/94 :

Réunion au NARCC.

Nous avons présenté au Pr N.A. COLE et au Dr. R.A.D. JONES le protocole d'accord rédigé. Ce protocole a été approuvé sans modifications par les différentes parties (voir annexe).

Au terme de ces discussions il a été (convenu que :

le Pr N.A. COLE présentera le dossier préparé auprès du Conseil de l'Université pour agrément afin de permettre au Dr ROY-MACAULEY de rejoindre le CERAAS avant la fin de l'année 1994,

les discussions se poursuivront rapidement avec le CERAAS pour concrétiser le montage des actions de coopération prévues dans le protocole d'accord élaboré.

La mission a quitté Freetown pour rejoindre Dakar via Banjul

Le 10/11/94 :

Discussions à la Coraf.

La mission a rencontré le Dr Ndiaga MBAYE, Secrétaire Exécutif de la CORAF, et lui a rendu compte des discussions qu'elle a eu durant ce séjour en Sierra Leone, Le Dr

Ndiaga MBAYE estime que les résultats de cette mission sont extrêmement importants et serviront d'exemple pour le développement de la coopération régionale au sein de la CORAF et du CILLS. il a pris bonne note des observations de la mission sur l'état des moyens des institutions de recherche de la Sierra Leone et se propose de voir avec le Dr JONES les interventions qui peuvent être envisagées afin d'améliorer leur capacité de recherche.

ANNEXE 1

PROTOCOLE D'ACCORD

ENTRE LE CERAAS

ET LE DEPARTEMENT DE BOTANIQUE DE L'UNIVERSITE DE SIERRA LEONE

Protocole d'accord

Avant-propos.

La Coraf représentée par le Dr R.A.D. JONES, le Réseau R3S représenté par son Coordonnateur, le Dr L. NETOYO, le Ceraas représenté par son Responsable, le Dr D. ANNEROSE et le Département de Botanique représenté par son Directeur, le Pr N.A. COLE et par le Dr H ROY-MACAULEY ont tenu une réunion de travail le 8 novembre 1994.

Il a été décidé au cours de **cette** réunion d'établir un document permettant de **préciser** le cadre de leur coopération.

Les participants estiment que les principes de fonctionnement de la CORAF et les **règles** de fonctionnement des réseaux et bases-centre de la CORAF fournissent le **cadre** général dans lequel s'effectuera leur coopération. Ils conviennent cependant de la nécessité **d'apporter** dans un document annexe les éléments **complémentaires nécessaires** à la mise en oeuvre pratique de cette coopération. Pour cela ils proposent l'établissement d'un protocole d'accord exposé ci-après.

Protocole d'accord

ENTRE :

le CERAAS

ET

l'Université de Sierra Leone, Département de Botanique

1) Mise à disposition d'un expert.

A la requête du CERAAS, l'Université de Sierra Leone accepte que le Dr I-i. ROY-MACAULEY soit mis à la disposition du CERAAS pour une durée d'un an renouvelable, en tant que biochimiste de l'adaptation à la sécheresse.

Les modalités de cette mise à disposition sont exposées dans le protocole annexé.

2) Formation d'étudiants de l'Université.

Le CERAAS, dans le cadre du mandat régional qui lui est confié, accueillera à la demande du Département de Botanique des étudiants de l'Université dans le cadre de séjours de formation à vocation diplomante (DEA ou plus).

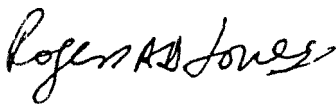
3) Appui du CERAAS

Le CERAAS appuiera le Département dans les initiatives lui permettant de renforcer ses capacités propres de recherche.

Cet appui pourra se concrétiser dans le cadre de la recherche de bourses, dans celui de l'élaboration de projets de recherche et dans la recherche des financements correspondants.

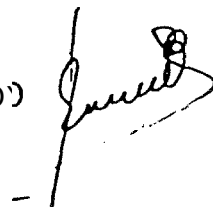
Pour la CORAF

Dr. R.A.D. JONES



Pour le R3S

Dr. L. NETO



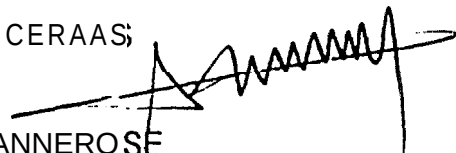
Pour le Département de Botanique
(Université de Sierra Leone)

Pr. N.A. COLE



Pour le CERAAS;

Dr. D. ANNEROSE



ANNEXE 2

NOTE A L'AMBASSADE DE FRANCE EN SIERRA LEONE

NOTE A L'AMBASSADE DE FRANCE EN SIERRA LEONE

D. ANNEROSE (CIRAD/ISRA)
Chef du projet du CERAAS

Depuis 1984, les pays africains confrontés à la baisse de la production agricole et à une augmentation simultanée des besoins alimentaires **ont** commencé à associer **leurs** efforts de recherche. L'un des principaux objectifs visés était de favoriser l'émergence d'une **communauté** scientifique africaine capable de traiter de manière efficace et réaliste les grands problèmes auxquels étaient confrontés leur agriculture

La création de la **CORAF**¹, qui réunit aujourd'hui les responsables des Institutions de recherche de 25 pays africains, a rapidement concrétiser cette volonté. Elle a été suivie par la création des réseaux-produits ou plantes (arachide, maïs, riz, coton, manioc, ...) et de réseaux thématiques comme le Réseau de Recherche sur la Résistance à la Sécheresse (**R3S**). Ces réseaux développés sous l'égide de la **CORAF** ont joué et continuent de jouer un rôle particulièrement important dans le renforcement des capacités de recherches des SNRA, notamment en rompant l'isolement des chercheurs grâce à la définition et la conduite d'action de recherche coordonnées et d'intérêt commun.

Un des exemples les plus édifiants est celui du **R3S** et plus particulièrement du **CERAAS**² qui est le premier pôle, ou base-centre régionale fonctionnelle du dispositif **CORAF**.

Le **CERAAS** a été créé en 1989 à l'**ISRA**³, qui a accepté d'élargir à l'échelle régionale l'expertise sur l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées, développée grâce à un très fort **partenariat** avec le **CIRAD**⁴. En quelques années le **CERAAS** avec une approche multidisciplinaire est à l'origine de la création d'une communauté scientifique d'une centaine de chercheurs africains, européens et sud-américains travaillant dans le domaine concerné. Ce centre accueille ou appuie directement les chercheurs des SNRA dans des actions de recherche ou de Protocole d'accord

formation par la recherche auprès des chercheurs. Les résultats obtenus ont **déjà** eu un impact significatif sur le développement à travers la création de variétés d'arachide plus résistantes à l'arachide (Sénégal, Botswana, Burkina, Brésil, Portugal), de sorgho (Mali), ainsi que sur la mise en place de programmes de création variétale performant sur une grande part des **espèces** vivrières à travers l'Afrique.

Le **CERAAS** coordonne aujourd'hui les activités de recherche de 3 universités européennes (Paris 7, Université libre de Bruxelles, Université de Lisbonne) et des SNRA dans le cadre d'un projet financé par la Communauté Européenne. Il s'appuie pour cela sur les expertises internationales mais aussi régionales avec le souci

¹Conférence des Responsables d'**Institutions** de Recherches Africaines.

²Centre d'Etude Régional pour l'**Amélioration** de l'**Adaptation** à la Sécheresse.

³Institut Sénégalais de Recherches Agricoles

⁴Centre International de Recherches en Agronomie pour le Développement,

permanent de favoriser le renforcement des capacités de recherche des institutions de recherche africaines.

La coopération du CERAAS avec la Sierra Leone et plus particulièrement le Département Botanique s'inscrit dans ce cadre institutionnel et scientifique. Ce département possède notamment les capacités humaines pour assurer le développement de recherches sur la biochimie de l'adaptation à la sécheresse et peut constituer une étape efficace dans le transfert des concepts et méthodologies exploitables au niveau régional. Ceci nécessite essentiellement que son niveau d'équipement soit supérieur à celui existant. Le **CERAAS** appuiera le Département de Botanique en ce sens afin de permettre notamment une délocalisation de l'expertise disponible au niveau régional. Une telle stratégie peut contribuer à la réalisation d'une économie d'échelle durable notamment pour les pays proches concernés par ce domaine de recherche. De même, une plus-value significative résultera d'une approche associant une université à une institution agronomique dans un cadre régional couvrant la plupart des éco-climats africains.