

CR001463



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

ATELIER

« Méthodes et techniques de biochimie et de biologie moléculaire :
outils d'appui à la sélection des plantes résistantes à la sécheresse »

(Thiès, Sénégal, 22-28 février 1999)

RAPPORT



Participants et personnel du CERAAS



Financement : CTA-UE/DG VIII

Introduction

Depuis plus de six ans, le CERAAS a renforcé les activités de recherche conjointes dans le domaine de la biochimie et de la biologie moléculaire avec le Laboratoire de Biochimie et de Physiologie de l'Adaptation Végétale (LBPAV), de l'université Paris 7. Ces activités ont porté sur le transfert des concepts, méthodes et techniques vers le CERAAS pour leur application dans des programmes de sélection des pays en développement des régions sèches en particulier dans la sous-région Afrique de l'Ouest et du Centre.

Le financement conjoint accordé au CERAAS en 1999 par la DGXII et la DG VIII de l'UE a permis entre autres de renforcer sa capacité d'accueil scientifique et technique. En particulier, des équipements permettant la conduite des recherches dans le domaine de la biochimie et de la biologie moléculaire ont été acquis.

Ces domaines, parfaitement intégrés dans les schémas de travail des institutions de recherche des pays du Nord, sont encore très peu connus de la sous-région. Les rares échanges entre ces institutions du Nord et celles des pays de la sous-région se limitent à un niveau individuel et ne bénéficient pas d'un cadre adéquat de partage. De plus, les spécialistes africains dans ce domaine pointu de la recherche sont très peu nombreux et ne disposent pas d'un environnement (laboratoires, équipements et ressources financières) favorable à l'application de leurs connaissances. Bien que maîtrisant parfaitement les concepts et techniques, ces spécialistes disposent de connaissances essentiellement théoriques et non adaptées aux conditions de la sous-région.

Cet atelier présente donc l'opportunité de créer un cadre de concertation entre les spécialistes du Nord et ceux des pays de la sous-région pour échanger et proposer une approche pratique de traduction de ces concepts et méthodes, adaptée aux réalités de la zone.

La conceptualisation d'un schéma adapté d'application de ces concepts et méthodes sera également débattue. Ceci permettra la mise en place d'un réseau d'experts plus orienté vers une meilleure utilisation et rationalisation des ressources humaines disponibles dans cette spécialité



Ouverture de l'atelier par le Dr N. Mbaye, Secrétaire Exécutif de la CORAF (3^{ème} à partir de la droite)

Programme

Samedi 20 et dimanche 21 février 1998

Arrivée et accueil des participants à l'aéroport.

Lundi 22 février 1998

09H00-09H30 : Ouverture de l'atelier (N. Mbaye, Secrétaire Exécutif de la CORAF)

09H30-09H45 : Présentation des objectifs de l'atelier (H. Roy-Macauley, Directeur du CERAAS)

SESSION I : GENETIQUE/SELECTION

Président : B. Sarr

Rapporteur: S. Braconnier

09H45-10H15 : Méthodes et critères de sélection pour la résistance à la sécheresse application au cas de l'arachide. "Du rendement de la culture au fonctionnement de la cellule végétale" (D. Clavel).

10H15-10H45 Sélection de variétés d'arachide pour leur adaptation à la sécheresse (S. Dopavogui).

Plantes vivrières – stress hydrique au Cameroun : problèmes posés et solutions proposées (J. Souopgui).

10H45-11H00 : Pause café

11H00-13H00 : Adaptation du niébé au stress hydrique s'exerçant uniformément au cours du cycle (G. Zombre)

Breeding programme at NARI (K. Sabally)

13H00-15H00 : Pause déjeuner

Président : D. Clavel

Rapporteur : M. Sie

15H00-16H15 : La mutagenèse comme technique d'amélioration des sorghos locaux (B. Traoré).

Intégration des biotechnologies végétales au développement et à la conservation des ressources phyto-génétiques sahéliennes (R. Sidikou).

16H15-16H30 : Pause café

16H30-18H00 : Discussion générale sur la session

Mardi 23 février 1998

SESSION II : BIOCHIMIE

Président : N. Diallo

Rapporteur : S. Braconnier

08H30-10H30 : An analytical approach to the study of levels of proteases and their inhibitors in plants under conditions of drought (M. Kidric)

Relation mitochondries-chloroplastes au cours du métabolisme photorespiratoire (N. Diallo).

10H30-10H45 : Pause café

10H45-13H00 : Lipides membranaires, peroxydation des lipides et tolérance à la sécheresse (A. Pham Thi).

Relation entre l'expression des gènes codant pour des enzymes lipolytiques et la tolérance à la sécheresse chez *Vigna unguiculata* (A. d'Arcy-Lameta)

Immuno-détection et immunoquantification de l'ascorbate peroxydase chez les légumineuses (N. N. Diop).

13H00-15H00 : Pause déjeuner

Président : S. Braconnier

Rapporteur: N. N. Diop

15H00-16H15 : Aspartic proteinase and drought tolerance : search for molecular markers (H. Roy-Macauley).

1 6H15-1 6H30 : Pause café

1 6H30-18H00 : Discussion générale sur la session

Mercredi 24 février 1998

SESSION III : BIOLOGIE MOLECULAIRE

Président : H. Roy-Macauley

Rapporteur : M. Diouf

08H30-10H30 : Utilisation des marqueurs moléculaires en amélioration des plantes : évaluation des ressources génétiques, cartographies génétiques et analyses de caractères importants, amélioration assistée par marqueurs

(A. M. Risterucci).

Mapping QTLs (Quantitative trait loci) for drought resistance in upland rice (K Steele).

1 0H30-1 0H45 : Pause café

1 0H45-13H00 : Développement d'une capacité de marquage à l'ADRAO visant à l'identification de QTL et à leur utilisation en sélection pour des caractères tels que la compétition avec les adventices et la résistance à la sécheresse (T. Cadalen et S Tobita).

La sélection assistée par marqueurs moléculaires : cas de la tolérance du riz au sel dans le delta du fleuve Sénégal (M. Sié).

1 3H00-15H00 : Pause déjeuner

Président : A. Pham Thi

Rapporteur: N. N. Diop

15H00-16H15 : Utilisation des propriétés intrinsèques du virus de la Mosaïque Africaine du Manioc pour développer des stratégies de lutte contre la virose (A. Sangaré).

16H15-16H30 : Pause café

16H30-18H00 : Discussion générale sur la session

Jeudi 25 février 1999

08H00-13H00 : Matinée réservée à d'éventuelles communications qui n'auraient pu être présentées durant les sessions, et à des discussions informelles entre les différents participants.

1 3H00-15H00 : Pause déjeuner

15H00-18H00 Visite du laboratoire du CERAAS, discussion informelle entre les chercheurs et visite de la ville de Thiès

20H00 : Dîner du groupe

Vendredi 26 février 1998

08H00-1 0H45 Table ronde sur la mise en place d'un cadre formel et opérationnel d'application des concepts et méthodes de biochimie et biologie moléculaire au niveau de la sous-région.

Modérateur : H. Roy Macauley

Rapporteur S. Braconnier

1 0H30-11H45 : Pause café

1 11H45-13H00 : Suite de la discussion

1 3H00-15H00 : Pause déjeuner

1 5H00-17H00 : Présentation des rapports des sessions

1 6H00-16H15 : Pause café

1 6H15-18H00 : Discussion du rapport de l'atelier

18H00 : Cocktail de fin d'atelier

Samedi 27 et dimanche 28 février 1999

Départ des participants.

**Critères de sélection pour la résistance à la sécheresse :
application au cas de l'arachide
« du rendement de la culture au fonctionnement de la cellule végétale »**

Danièle CLA VEL
CIRAD-CA, ISRA / CNRA, BP 53
Bambey, Sénégal

La résistance à la sécheresse demeure un objectif de recherche majeur pour de vastes aires de cultures en irrigué comme en pluvial. En Afrique sub-saharienne, où la culture pluviale est largement dominante, le problème se pose parfois dramatiquement en termes d'alimentation voire de survie de populations rurales, particulièrement depuis le début des années soixante-dix.

Les raisons principales de la lenteur des progrès réalisés dans le domaine de la résistance à la sécheresse sont liées à la complexité des mécanismes mis en œuvre par les plantes et la variabilité de l'environnement auquel elles sont destinées

Les sélections pour le seul rendement (et ses composantes) en conditions de déficit hydrique ou basées sur un indice de sensibilité à la sécheresse ont montré leurs limites pour une amélioration significative de la production en milieu aride car les composantes du rendement sont fortement influencées par les facteurs environnementaux.

De nombreux caractères physiologiques et biochimiques impliqués dans l'adaptation à la sécheresse ont été identifiés par les physiologistes. Les caractères décrits s'expriment à différents niveaux d'intégration physiologique : de la cellule à la plante entière. Le sélectionneur doit savoir comment le développement phénologique de la culture s'accommode de la forme de déficit hydrique qu'elle rencontre. Ainsi, pour être conduit avec succès, un programme d'amélioration variétale pour l'obtention de variétés productives en conditions de la sécheresse doit respecter certaines principes :

- le premier principe consiste à utiliser des conditions environnementales réalistes dans les schémas de sélection ;
- le deuxième principe est de tester les paramètres physiologiques et biochimiques d'intérêt potentiel dans des conditions d'alimentation hydrique différenciées : optimale et déficitaire ;

- le troisième principe consiste à faire un choix parmi les critères de sélection qui sera basé sur la variabilité génétique du caractère, ses relations avec le rendement en milieu sec, sa fiabilité et sa facilité de mesure.

En ce qui concerne l'arachide, il convient d'être particulièrement vigilant aux grandes possibilités d'adaptation morphophysologique de l'espèce, afin de sélectionner des caractères vraiment explicatifs du rendement en milieu sec. Sur cette espèce, il est possible de parvenir à une amélioration de l'adaptation à la sécheresse sans sacrifier la bonne performance des variétés dans des conditions favorables. Le cas de la variété Fleur 11 et d'autres variétés expérimentales sélectionnées par le programme ISRA-CERAAS de sélection récurrente de l'arachide pour l'adaptation physiologique à la sécheresse en témoignent. L'intégration de critères moléculaires liés à la tolérance membranaire apparaît comme réaliste et probablement féconde car la capacité de tolérance membranaire de l'arachide présente de la variabilité, et la transformation génétique est réalisable sur cette espèce.

Aujourd'hui, on peut penser que la résistance à la sécheresse constitue un objectif de sélection réaliste car les conditions suivantes sont réunies :

- amélioration des connaissances sur les réponses de la plante à la sécheresse ;
- * progrès dans les techniques de mesure de ces réponses ;
- variabilité génétique disponible au niveau des différents caractères d'adaptation ;
- possibilité d'utiliser la physiologie et la biologie moléculaire pour caractériser et amplifier cette variabilité.

Sélection de variétés d'arachide pour leur adaptation à la sécheresse

Siba DOPAVOGUI
CRA Bordo
Kankan, Guinée

Le Haute-Guinée ou Haut bassin du Niger est située au Nord-Est de la Guinée et abrite le Centre de Recherche Agronomique de Bordo (CRAB). Cette région représente le principal bassin arachidier du pays. L'arachide constitue la légumineuse dominante dans cette région. Elle y est cultivée à grande échelle et est couramment utilisée pour la consommation locale et pour l'alimentation de l'huilerie pour le moment arrêtée.

Les variations pluviométriques : arrêt prématuré des pluies avant la fin des cycles de culture, retard de la saison pluvieuse, poche de sécheresse longue au cours du cycle des cultures, pluies abondantes ou passagères à certaines périodes, provoquent souvent la chute des rendements des cultures. Le retard fréquent de la saison pluvieuse et le stress hydrique en fin de cycle des obligent les agriculteurs à abandonner les variétés à cycle long de 4 mois et plus.

C'est ainsi qu'un essai de variétés précoces a été mis en place au CRA/Bordo en 1998. Six variétés de l'ICRISAT et 2 reçues du Sénégal (Fleur 11 et 55-437) ont été comparées sur le plan du rendement en gousses, rendement au décorticage et poids de 100 graines.

A l'issue des travaux, toutes les variétés ont présentées des rendements statistiquement égaux. Le rendement moyen de 2,05 T/ha a été supérieur au rendement moyen d'un tel essai (1,2 T/ha) conduit à Foulaya en 1996.

Les variétés Sandjan, ICGV 88023, Fleur 11 et ICGV 87123 présentent des rendements au décorticage de 73 à 74%. Le plus important poids de 100 graines a été obtenu avec la variété locale Sandjan (49g). Les variétés Fleur 11 et ICGV 88023 seront introduites en milieu paysan pour étudier leur comportement en milieu réel.

Plantes vivrières : stress hydrique au Cameroun Problèmes posés et solutions proposées

Jacob SOUOPGUI¹ et J. LOHOUE PETM Y²

Centre de Biotechnologie de Nkolbisson

***Faculté de médecine et des Sciences Biomédicales
Yaoundé, Cameroun**

Le Cameroun, encore appelé « Afrique en Miniature », est situé entre le 2^e et 13^e degré latitude nord et le 9^e et 16^e degré longitude est. Il s'étend du Golfe de Guinée, sur l'océan Atlantique, au lac Tchad. Au plan climatique, on note deux grands types qui sont : les climats équatoriaux et tropicaux. Ce dernier comprend le climat tropical de type soudanien aux précipitations comprises entre 900 et 1500 mm et le climat tropical de type Sahélien aux précipitations comprises entre 400 et 900 mm. Ces régions arides représentent pratiquement la moitié de la superficie du pays (1). La déforestation du Sud du pays notée depuis les deux dernières décennies est à l'origine des perturbations climatiques et expose la totalité du pays à l'avancée du désert. Ceci pose de sérieux problèmes socio-économiques, les habitants n'ayant que l'agriculture comme unique source de revenus. De ce fait toute amélioration au niveau agricole dans les régions arides serait salutaire pour la population.

Au Cameroun, les techniques d'amélioration des cultures se limitent encore de nos jours à la sélection empirique des semences et plants à haut rendement et à cycle végétatif court. Par conséquent les cultures au niveau national sont polarisées en fonction des saisons climatiques. La rareté des vivres frais dans la région septentrionale est à l'origine de la famine et de certaines affections dont souffre la population. Malgré les efforts réalisés par le gouvernement et les organisations non gouvernementales, le stress hydrique lié au bouleversement climatique entraîne des baisses accentuées de rendement par suite de la modification des voies métaboliques de la plante conduisant à la baisse d'accumulation des réserves (2). Au sein d'une même population de culture, on observe une différence de capacité d'adaptation à ce stress hydrique ; ceci implique qu'en plus des facteurs environnementaux, il existerait des prédispositions génétiques exploitables qui participeraient au processus d'adaptation à ce phénomène. L'étude de tels facteurs génétiques exige une parfaite maîtrise de la

génétique moléculaire. La biologie moléculaire, technologie de pointe a révolutionné à plus d'un niveau le progrès scientifique dans divers domaines. Cependant à cause du faible transfert de technologie moderne vers les pays du sud et dans d'autres pays en voie de développement (3), cette révolution n'est fortement perceptible que dans les pays du Nord.

Au Cameroun, l'amélioration de la sélection des semences et plants ainsi que l'adaptation des cultures à la sécheresse nécessitent les techniques de Biologie Moléculaire comme

- la « polymérase chain reaction » (PCR) et la « restriction fragment length polymorphism » (RFLP), pour cribler les plants génétiquement résistants au stress hydrique ;
- les techniques d'hybridation moléculaire pour identifier les signaux impliqués dans cette résistance ;
- les méthodes d'induction ou le transfert de ces signaux chez les cultures vivrières intéressantes.

La réalisation et le succès d'un tel projet nécessitent l'assistance des experts du nord et des bailleurs de fonds. C'est pourquoi nous félicitons et remercions le CERAAS pour la tenue de cet atelier dont l'importance est capitale pour la sous-région.

Références

- (1) Melingui, A., Gwanfogbe, M., Nguoghian, J et Mounkam, J. (1987). Géographie du Cameroun. Nouvelle édition, Edicef.
- (2) Monneveux, P. et This, D. (1997). La Génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse : espoirs et difficultés. In : *Science et changements planétaires Sécheresse*, 8(1), pp. 29-37.
- (3) Brauer, D. (1998). D + C Development an3 Co-operation (1), January / February

Adaptation du niébé au stress hydrique s'exerçant uniformément au cours du cycle de développement

Gérard ZOMBRE, J. D. ZONGO et P. SANKARA
Université de Ouagadougou, F. A. S. T.
Ouagadougou, Burkina Faso

Introduction

Depuis 1963, le Sahel reçoit des pluies fréquemment inférieures à celles de la période 1959-1967. Certaines années sont même très sèches, entraînant une production agricole catastrophique. La recherche de variétés résistantes à la sécheresse est donc nécessaire.

Matériel et Méthodes

La tolérance au déficit hydrique s'exerçant uniformément au cours du cycle de développement de quatre variétés de niébé local : KNI, K VX 396-4, TN-88-63 et Gorom a été étudiée. Les plantes cultivées en pot avaient été soumises à une alimentation hydrique insuffisante (40% de la capacité du champ) dès le stade végétatif jusqu'à la formation des gousses (1^{er} juillet - 15 septembre) ont été comparés à celles soumises à une alimentation hydrique suffisante (80% de la capacité du champ). Les répercussions de ces traitements sur le développement végétatif, la floraison, les paramètres physiologiques (transpiration, déficit naturel de saturation : DNS, teneur en eau : TE, poids spécifique : PS, potentiel hydrique foliaire : PHF), les paramètres morphologiques (longueur de la tige principale, nombre de feuilles, longueur de la racine principale) et les composantes du rendement (nombre de gousses, nombre de graines/gousses, poids de 100 graines...) ont été étudiées.

Résultats et discussion

Le déficit a réduit la transpiration chez toutes les variétés sauf chez la variété TN-88-63. KNI et Gorom sont les deux variétés qui transpirent le plus lorsqu'elles sont alimentées convenablement en eau. mais elles se

différencient dans le cas d'une pénurie d'eau. Cette réduction est importante chez KNI qui limite ses pertes hydriques en diminuant ses surfaces évaporantes (réduction de la surface foliaire). Ceci constitue un mode d'adaptation majeur au déficit hydrique. Cette adaptation implique également une fermeture des stomates, entraînant une augmentation de la résistance stomatique, facteur principal qui limite le passage du CO₂ vers les chloroplastes. Comme conséquences pour KNI, nous avons observé une limitation de sa croissance, une floraison tardive et une fructification déficitaire.

Ceci n'a pas été le cas chez TN-88-63 qui, bien que présentant avec KNI, la plus forte variation du DNS et de la TE au cours de la journée, a eu un assez bon rendement. Gorom Local et K VX réduisent faiblement leurs pertes hydriques par le biais d'une diminution notable du potentiel foliaire. Malgré le déficit hydrique la transpiration n'est pas élevée.

Conclusion

Il existe une assez large variabilité intravariétale des réponses du niébé au déficit hydrique. Gorom Local se révèle ainsi être une variété productive à bon comportement sous contrainte hydrique ; TN-88-63 se révèle être une variété productive, mais sensible au déficit hydrique et à la température de l'air. K VX est une variété à fort développement végétatif, mais peu productive ; KNI est une variété gaspilleuse d'eau et sensible au déficit hydrique et à la température de l'air. Gorom Local est donc la variété qui répond le mieux aux exigences de bonne productivité lorsqu'elle est placée dans une situation de compromis entre photosynthèse et transpiration.

Breeding programme at NARI

Kebba SABALLY
National Agricultural Research Institute(NARI)
The Gambia

The National Agricultural Research Institute (NARI) was formed in 1993 and originated from the Agricultural Research Systems of The Gambia.

NARI's mandate is to conduct applied and adaptive research on crops, livestock, fisheries, forestry and rural economic resources. Our major activity is in the food and cash crop sectors.

The staple food of The Gambia is rice. However, the quantity imported is almost equal to the domestic production, making The Gambia a seriously food insecure country. Groundnut is the principal cash crop. Other important crops consumed are millet, maize and sorghum. Sesame and cotton are also cultivated.

The ecology of The Gambia is predominantly sahelian. The rainfall is sometimes erratic and less than 600 mm annually in some areas (sahelian) and up to about 1000 mm annually in others (sudano-guinean). The rainfall duration is very short. 80% of total rainfall is usually received between late July and early to mid-September. The growing season varies between 75 to about 120 days.

NARI's breeding programme is very young and started in the dry season of 1996. The main objective of the programme is to develop cultivars that are high yielding and adaptable to our drought prone upland and lowland rainfed ecologies, for adoption by our farmers.

We use classical breeding methods mainly, on a combination of local and exotic varieties. So far, forty varietal combinations have been carried out in the programme. Four of these combinations, Gambia Rice Breeding (GRB) 2 to 5, are ready for a preliminary yield trial and GRB3, a high yielding cross, looks very promising. The F3 generation will be obtained next season for the very early maturing ones.

Screening is also carried out for early maturing and drought tolerant cultivars adapted to our agro-ecologies from materials obtained especially from WARDA.

The use of molecular biology techniques in breeding for example Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and other molecular markers to locate genes that underlie quantitative characteristics controlling drought related traits (Quantitative Trait Loci) has great promise. We have not used molecular tools in our breeding programme yet. This is because we are constrained by both human and material resources.

We are therefore grateful to the organisers for inviting us to this workshop, which will possibly provide the opportunity for exposure to these modern tools. With your support we hope to be able to make use of this emerging and vital technology in breeding for drought resistant crops, for improving crop production in The Gambia.

La mutagenèse comme technique d'amélioration génétique des sorghos locaux

Bakaty TRAORE
IPR-IFRA Katibougou
Koulikoro, Mali

Le sorgho constitue, après le mil, la deuxième céréale au Mali tant par les superficies occupées que par la production. Son rendement moyen de 800kg est faible et tributaire à 80% des eaux de pluies. Ainsi, les changements climatiques en cours (réduction des quantités globales et mauvaise répartition des pluies, demande climatique élevée) ont abouti à l'inhibition de la supériorité des variétés vulgarisées. Dans ces conditions, pour les populations rurales (80% de la population totale) pauvres et en forte croissance, la seule alternative viable est d'assurer une gestion rationnelle des eaux de pluies afin de sécuriser une production acceptable avec des ressources en eaux minimales.

Pour ce faire, le laboratoire d'Agro-Physio-Génétique de l'IPR/IFRA explore deux voies, en particulier sur le sorgho :

- la mise au point de variétés photosensibles pouvant ajuster au mieux leur cycle à celui de la saison des pluies dans les différentes zones agro-écologiques du Mali ;
- la mise au point de variétés adaptées au déficit hydrique (variétés précoces, variétés tolérantes à la sécheresse).

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons choisi d'élargir la base génétique des sorgho maliens à travers la mutagenèse. Nos investigations dans ce domaine ont abouti à la création de plusieurs mutants d'intérêts agronomiques (productifs), génétiques et physiologiques (géniteurs pour la résistance à la sécheresse). Cependant, la création de l'idéotype nécessite la combinaison de la mutagenèse et de l'hybridation. Ce qui démontre la complémentarité de ces deux méthodes d'amélioration variétale. Toutefois, cette voie relativement lente nous amène à suggérer l'association des techniques classiques et modernes (double haploïdisation *in vitro* et génie génétique) pour accélérer la

création d'idéotypes recherchés par les paysans. L'absence d'une articulation nette entre l'étude des mécanismes d'adaptation à la sécheresse et la création variétale pour la tolérance à la sécheresse constitue, sans doute, un problème majeur pour la résolution des problèmes liés à la sécheresse. En effet, l'étude des mécanismes morpho-physiologiques d'adaptation à la sécheresse relève du domaine de la physiologie végétale, alors que la création variétale pour la résistance au stress hydrique est du domaine de l'amélioration génétique des espèces. Ainsi, les physiologistes ont toujours tendance à focaliser leurs efforts sur la compréhension du mécanisme, et les sélectionneurs ont coutume de tester à la sécheresse leurs variétés mises au point et sélectionnées sur la base de critères autres que ceux de leur adaptation à la sécheresse. Une telle approche n'assurait guère le succès de l'amélioration variétale des espèces végétales à la sécheresse. Aussi, était-il indispensable de concevoir un schéma de sélection basé sur des critères d'adaptation au stress hydrique, pour espérer résoudre les problèmes de sensibilité des plantes à la sécheresse.

Dans ce cadre, des techniques classiques de croisements entre variété tolérante au stress hydrique et d'autres variétés peuvent assurer de l'obtention d'un idéotype tolérant au déficit hydrique. Seulement, l'existence et la disponibilité de géniteurs adéquats pour la résistance au stress hydrique ne sont pas assurées chez de nombreuses espèces. L'une des méthodes pouvant être explorée est l'élargissement de la base génétique par induction de mutations. Une telle approche a été testée sur sorgho et des résultats encourageants ont été obtenus.

La méthodologie à suivre, les contraintes, les limites et les atouts de la technique de mutagenèse sont décrits et présentés.

Utilisation de la mutagenèse dans l'amélioration génétique du fonio

Adama BERTHE
IPR-IFRA Katibougou
Koulikoro, Mali

Le fonio constitue une céréale de soudure pour les populations sahéliennes. Il est cultivé sur les terres pauvres, presque abandonnées qu'il permet de récupérer. Culture de diversification, elle est un excellent aliment conseillé en diététique (aux diabétiques) Elle peut procurer un revenu intéressant surtout dans les zones urbaines où elle est bien vendue. Au Mali, le fonio occupe environ 50000 hectares et produit 17500 tonnes (soit 350 kg/ha). Sa culture est pratiquée dans les zones de Ségou et Mopti en zone centrale et celle de Sikasso en zone sud. Les contraintes liées au développement de la culture sont la verse, l'égrenage spontané, les difficultés d'entretien mécanique liées à son port rampant et celles de sa transformation technologique liées à la petitesse de ses graines.

Afin de résoudre ces problèmes nous avons choisi la technique de mutagenèse à l'aide de produit chimique : le Méthane Sulfonate d'Ethyle (MSE). Ainsi, deux écotypes de fonio CFM 95 et CFM 103 ont été traités chacun ç 0%, 1% et 2% d'une solution de MSE pendant 0, 6, 12 et 18 heures. Les mutations observées en deuxième année ont concerné le taux de germination, la vigueur à la levée, le port érigé, le raccourcissement du cycle et l'augmentation du nombre de tiges fertiles. Les têtes de lignées choisies au nombre de 20 sont décrites dans la présente communication.



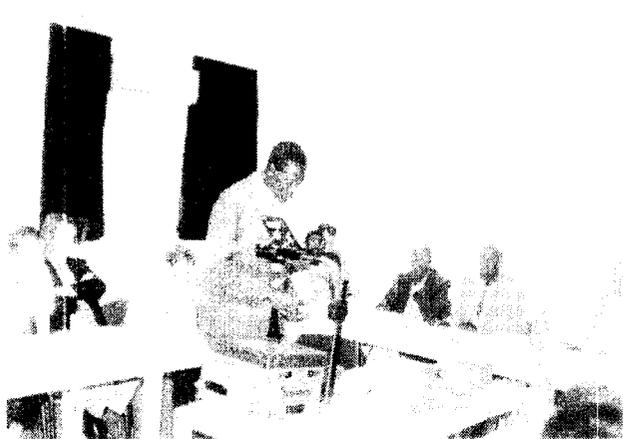
Visite de la serre du CERAAS

Utilisation des paramètres physiologiques et moléculaires dans la sélection des clones d'hévéa.

Edmond KOFFI, Michel Y. GNAGNE et Kouadio DIAN
Station de recherche de Bimbresso
Centre National de Recherche Agronomique (CNRA)
Abidjan, Côte d'Ivoire

La sélection de clones d'hévéa, établie en trois étapes, est étroitement associée à des critères biochimiques qui sont les paramètres physiologiques du latex. L'implication de ces paramètres entre le CCPE et le CCGE a permis de sélectionner un certain nombre de clones que la méthode initiale basée essentiellement sur la production n'aurait pas révélé.

Toutefois, le niveau de production de la majeure partie de ces clones est demeuré faible, montrant ainsi les limites à cette première méthode. Des méthodes nouvelles d'utilisation des paramètres physiologiques, de même que des approches basées sur la biologie moléculaire ont donc été envisagées.



Exposé des participants durant les sessions de travail

Intégration des biotechnologies végétales au développement et à la conservation des ressources phytogénétiques sahéliennes

Ramatou SIDIKOU et D. SEYNI
Faculté des Sciences, Université Abdou Moumouni
Niamey, Niger

Nos ressources phytogénétiques, qu'elles soient cultivées ou spontanées, ont besoin d'être développées et conservées par tous les moyens possibles. Les moyens aussi bien traditionnels que modernes, notamment les biotechnologies végétales : la culture *in vitro*, la biochimie et la biologie moléculaire. Cependant, il est important de noter que ces nouvelles technologies ne se substituent pas aux méthodes classiques, mais viennent plutôt en appui.

C'est ainsi que le génie génétique, les croisements interspécifiques par fusion de protoplastes ou par sauvetage d'embryons, constituent des outils supplémentaires et précieux pour les sélectionneurs. Ils permettent en effet l'introduction plus rapide et plus précise d'un gène intéressant (comme celui de résistance à la sécheresse), tout en donnant accès à un plus grand nombre de gènes d'origines diverses.

Quant à la micropropagation, elle représente la biotechnologie végétale la plus répandue, et ouvre la voie à une amélioration sanitaire, une production en masse de plants, une accélération de la diffusion des nouvelles variétés (lutte contre la désertification) et une meilleure conservation des ressources phytogénétiques.

L'intégration des concepts modernes à nos systèmes de productions agricoles revêt une grande importance en permettant un développement qualitatif et quantitatif de ceux-ci. Les pays du Nord ont intégré depuis longtemps ces nouvelles technologies à leur agriculture et le résultat en est des plus satisfaisants.

En zone sahélienne, la productivité agricole rencontre d'énormes problèmes dus, entre autres, à l'insuffisance des précipitations.

Pour combler le déficit alimentaire issu des cultures pluviales, un accent est mis sur le développement des cultures irriguées et des cultures maraîchères (dites de contre-saison). Or, grâce aux méthodes biotechnologiques, on peut procéder à un meilleur développement de ces cultures irriguées par une amélioration aussi bien qualitative (cultures de méristèmes, marquage moléculaire, génie génétique, fusions de protoplastes), que quantitative (micropropagation, embryogenèse somatique).

Notre domaine de spécialisation va de la Botanique aux Biotechnologies Végétales. En relation avec cet atelier, les travaux que nous avons menés et que nous menons concernent les thèmes et techniques suivants :

- embryogenèse somatique et régénération de plantes à partir de suspensions cellulaires de racines et de protoplastes d'un *Cichorium* hybride ;
- étude de la diversité génétique de certaines variétés de mil sauvage par électrophorèse enzymatique ;
- projet d'amélioration et de valorisation de *Phoenix dactylifera* (fruitier cultivé) et *Neocarya macrophylla* syn. *Parinari macrophylla* (fruitier spontané) par intégration de méthodes biotechnologiques ;
- possibilités d'intégration des biotechnologies végétales à la conservation des ressources phytogénétiques ;
- intégration des biotechnologies végétales au développement de la culture de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) au Niger.

An analytical approach to the study of levels of proteases and their inhibitors in plants under conditions of drought

Marjetka KIDRIC

Jozef Stefan Institute, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Jamova 39, 7000 Ljubljana, Slovenia

The aim of this presentation is to describe the biochemical approach - as opposed to the molecular biology approach - to searching for enzymes whose levels change under conditions of plant stress. The need for a quantitative approach will be emphasised, and some of the problems this entails, especially in plant as opposed to mammalian systems, will be discussed. The approach will be illustrated by reference to proteinases.

Elution profiles from standard types of chromatography are constructed using different substrates, with and without specific inhibitors,

enabling different types of enzymes to be identified and their activities quantified. Complementary approaches are to construct elution profiles, again using different substrates, or to detect enzyme activities on gels after electrophoresis as zymograms. The need to quantify enzymes at the protein level will also be discussed and some techniques mentioned. The analysis can then be completed by quantifying levels of specific mRNA in order to assess levels of expression under various conditions.



Participants à l'atelier

Relation mitochondries - chloroplastes au cours du métabolisme photorespiratoire

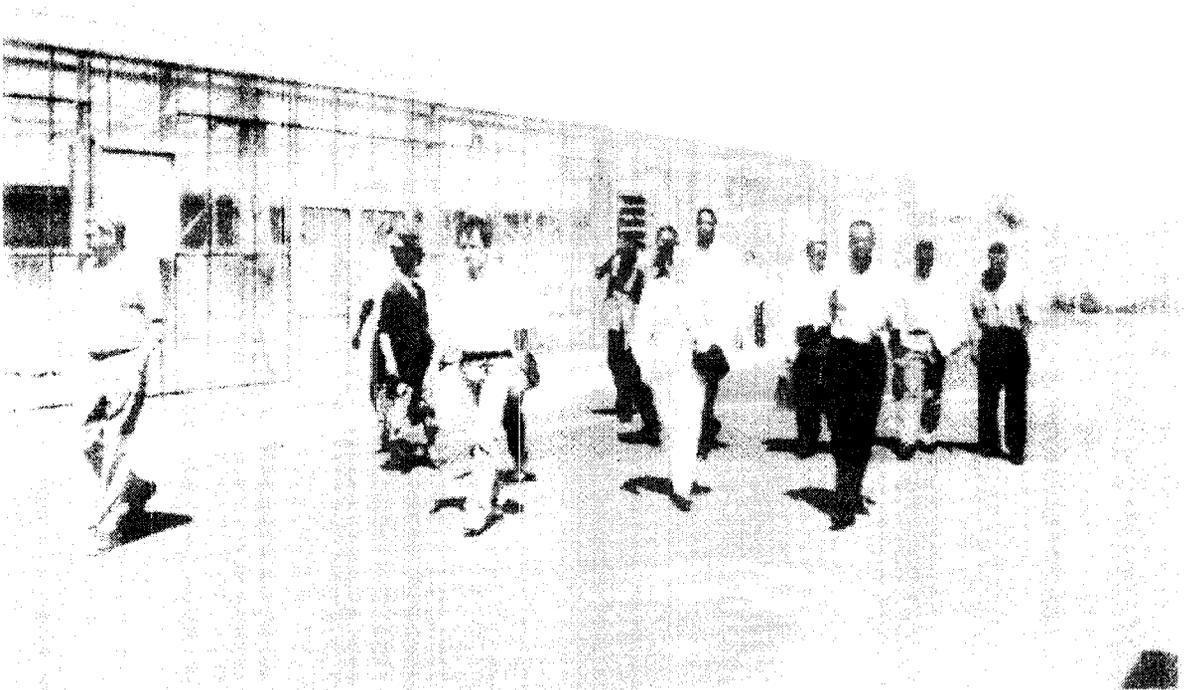
Nicolas DIALLO

Faculté des Sciences, Université Cheikh Anta Diop (UCAD)
Dakar, Sénégal

Lorsque les stomates se ferment (à la suite d'une sécheresse prolongée, par exemple), le CO_2 ne parvient plus aux chloroplastes. Cela provoque la mise en fonctionnement d'un cycle vital : la photorespiration. Ce cycle permet en grande partie d'utiliser l'excès d'énergie lumineuse reçue par les feuilles sans synthèse nette de sucres et évite ainsi la détérioration de l'appareil photosynthétique. Partant des acquis sur l'étape la plus complexe de la photorespiration : l'oxydation de la glycine, nous analysons le comportement de l'appareil mitochondrial lorsque l'appareil photosynthétique évolue vers son niveau de

régime, et notamment, la coordination entre l'activité du chloroplaste et celle de la mitochondrie à l'échelle de la cellule, à l'échelle de la mitochondrie et à l'échelle des protéines (mise en place et expression)

Les résultats présentés pourraient être utilisés dans l'étude de l'adaptation des plantes à la sécheresse, dès lors que celle-ci, comme la plupart des contraintes du milieu provoque toujours un affaiblissement de la teneur en CO_2 au niveau des feuilles.



Visite des locaux du CERAAS

Lipides membranaires, peroxydation des lipides et tolérance à la sécheresse

Anh PHAM THI

Laboratoire de Physiologie et de Biochimie de l'Adaptation Végétale
Université Paris 7
Paris, France

Les mécanismes d'adaptation des plantes à la sécheresse sont nombreux et se situent au niveau de l'organisme entier aussi bien qu'au niveau cellulaire et moléculaire. Les membranes cellulaires sont les cibles privilégiées des effets du déficit hydrique. Les études ultrastructurales ainsi que les mesures de perméabilité membranaire indiquent que les plantes tolérantes à la sécheresse possèdent des membranes plus résistantes.

Les lipides sont, avec les protéines, les composants majeurs des biomembranes. Les analyses faites sur des cultivars de niébé (*Vigna unguiculata*) plus ou moins résistants à la sécheresse montrent que le déficit hydrique induit des modifications significatives de la composition en lipides et acides gras des membranes foliaires :

Lorsque les plantes sont soumises à une sécheresse modérée, les cultivars tolérants sont capables d'accumuler des lipides polaires dans les feuilles alors que chez les cultivars sensibles, la teneur en lipides membranaires diminue. Les déficits hydriques sévères induisent une dégradation des lipides chez tous les cultivars, dégradation d'autant plus intense que le cultivar est plus sensible.

Le monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG), lipide majeur des thylakoïdes, et la phosphatidylcholine (PC), principal lipide des membranes extra-chloroplastiques, sont les classes lipidiques les plus susceptibles à l'action du déficit hydrique. La sécheresse entraîne également des modifications du degré d'insaturation des acides gras, via une diminution du pourcentage d'acide linoléique.

Cette diminution est particulièrement évidente chez les cultivars sensibles soumis à un déficit hydrique important.

Les modifications de la composition en acides gras et lipides des membranes de *Vigna unguiculata* sous l'action de la sécheresse sont dues à une inhibition des biosynthèses, mais surtout à une accélération des processus dégradatifs, conséquences des activités hydrolytiques et peroxydatives.

Parmi les enzymes lipolytiques, la phospholipase[°]D (PLD) est l'une des plus importantes chez les plantes. Elle dégrade les phospholipides, en donnant l'acide phosphatidique. Son activité enzymatique augmente au cours du traitement de sécheresse, atteignant un maximum dès les déficits modérés chez les plantes sensibles, et ne variant que faiblement chez les cultivars résistants. Par amplification PCR et criblage d'une banque d'ADNc de feuilles de *Vigna unguiculata*, nous avons réussi à cloner un ADNc codant pour une PLD. L'évaluation des transcrits par hybridation northern et la semi-quantification de la protéine par hybridation western indiquent que la régulation du gène de la PLD se situe essentiellement au niveau transcriptionnel.

En résumé, les plantes tolérantes au déficit hydrique présentent une meilleure stabilité de leurs membranes, grâce à une meilleure régulation de l'expression des gènes codant pour les enzymes lipolytiques. Les lipides membranaires et les systèmes enzymatiques associés peuvent constituer des marqueurs utiles pour l'aide à la sélection pour l'amélioration de la résistance à la sécheresse.

Relation entre l'expression des gènes codant pour des enzymes lipolytiques et la tolérance à la sécheresse chez *Vigna unguiculata*

Agnès d'ARCY-LAMETA

Laboratoire Physiologie et Biochimie de l'Adaptation Végétale
Université Paris 7
Paris, France

Sous l'effet d'un stress hydrique, la photosynthèse est perturbée et les électrons se fixent sur l'O₂ et non sur le CO₂, il se forme alors des espèces activées de l'oxygène (EAO) : anion superoxyde, radical hydroxyle et peroxyde d'hydrogène.

Ces EAO sont très réactives, elles captent aisément des électrons pour revenir à un état stable aux dépens des diverses molécules biologiques, dans ce cas il se produit de nouveaux radicaux libres de type peroxydatif très réactifs eux aussi qui peuvent entraîner des réactions en chaîne.

Un des composés cellulaires très facilement attaqué par les EAO est l'acide linoléique 18:3 n-3, car il possède un groupement méthylène activé.

Nous avons donc modélisé expérimentalement in vitro la photoperoxydation d'extraits lipophiles totaux de tissus foliaires venant des plantes utilisées dans le laboratoire *Vigna unguiculata* cv EPACE et 1183 et *Phaseolus vulgaris* cv Carioca, et dont le degré de résistance à la sécheresse est bien caractérisé EPACE > 1183 > Carioca (> = plus tolérant).

Les différents cultivars ont été soumis à des déficits hydriques contrôlés. Les résultats montrent que :

la capacité de résistance à la peroxydation photochimique est affectée par la sécheresse ; plus une plante est résistante à la sécheresse et plus les substances lipophiles extraites de ses feuilles sont résistantes à la peroxydation induite photochimiquement.

Les plantes possèdent des défenses chimiques leur permettant de résister au stress oxydant : glutathion, vitamine C, caroténoïdes, flavonoïdes. Parmi les composés présents dans les extraits lipophiles, les caroténoïdes semblent les

meilleurs candidats pour protéger les lipides de la peroxydation, nous avons montré que le β -carotène diminue proportionnellement à l'augmentation d'autres caroténoïdes à plus haut pouvoir antioxydant.

Les plantes possèdent également des processus de défenses enzymatiques contre les radicaux libres : la superoxyde dismutase ou SOD, la catalase et l'ascorbate peroxydase. Nous nous sommes intéressées à cette dernière enzyme.

Le dosage de l'activité enzymatique de l'ascorbate peroxydase chez les deux cultivars de *V. unguiculata* 1183 et EPACE, montre que le niveau d'activité est 50% plus élevé chez la plante contrôlée d'EPACE que chez 1183. Cette activité ne varie pas chez EPACE alors qu'elle augmente de plus de 60 % chez 1183 en conditions de sécheresse moyenne.

Après avoir cloné et séquencé l'ADNc correspondant à une ascorbate peroxydase, nous avons estimé son expression en terme de transcrits.

Cette expression semble plus élevée chez les témoins de la plante résistante que chez la plante sensible, puis en réponse au déficit hydrique, l'expression reste stable chez le cultivar résistant et augmente sensiblement chez le cultivar sensible.

En conclusion, les plantes sont équipées pour résister au stress oxydant. Dans le cas de déficit hydrique, les plantes tolérantes présentent un équipement de défense plus efficace que les plantes sensibles soit au niveau des molécules de protection comme les caroténoïdes soit au niveau de l'équipement enzymatique de détoxification par exemple l'ascorbate peroxydase.

Immunodétection et immunoquantification de l'ascorbate peroxydase chez les légumineuses

Ndèye Ndack DIOP
CERAAS
Thiès, Sénégal

Introduction

Lt: déficit hydrique induit une synthèse de dérivés toxiques de l'oxygène constitués essentiellement des espèces activées de l'oxygène (EAO) et des composés oxygénés (Smirnof et Colombe, 1988; Ferrari-Iliou et al., 1994). La cellule possède un système enzymatique ou non enzymatique de protection contre le stress oxydant (Smirnof, 1993). La voie enzymatique implique les superoxyde dismutases, les catalases et l'ascorbate peroxydase (APX). L'APX est très active dans le processus de détoxification de l'H₂O₂. Elle existe sous formes cytoplasmique, chloroplastique (Chen et Asada, 1989), peroxydomale (Yamaguchi et al., 1995), glyoxydomale (Bunkelmann et Trelease, 1996) et mitochondriale (Jimenez et al., 1997).

Matériel et Méthodes

Le expérimentation comprend de quatre variétés de légumineuses ayant des sensibilités à la sécheresse différentes: *Vigna unguiculata* (E.PACE, résistant et 1183, moyennement sensible) et *Phaseolus vulgaris* (IPA, sensible et Carioca, très sensible). Les plantes sont cultivées dans des pots en plastique de volume 650 cm³, dans un mélange de tourbe et de vermiculite (v/v = 1/1). A 5 semaines, elles sont soumises au traitement de déficit hydrique par suspension d'arrosage. Différentes intensités de stress sont déterminées par le potentiel hydrique foliaire : témoins (T) bien hydratés; S1, $\psi_w = -1$ MPa; S2, -1.5 MPa; S3, -1.8 à -2 MPa et R plantes réhydratées pendant 24 h une fois atteint le ψ_w de -1.5 MPa.

Les protéines foliaires sont extraites dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.8; 2 mM EDTA; 0.5 mM PMSF; 5 µg/l leupeptine; 4 mM ascorbate de sodium. L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide (gradient linéaire de 8 à 13%). L'immunodétection ou Western Blotting (Western blotting protocols, ECL, Amersham) a permis de détecter et quantifier la protéine étudiée.

Résultats

Estimation de la valeur de la masse moléculaire (PM) de l'APX

La valeur de la masse moléculaire (PM) de l'APX est estimée après SDS-PAGE à environ 28.8 kDa à partir de la droite de régression du graphique $\log PM = f(Rf)$ (fig°1).

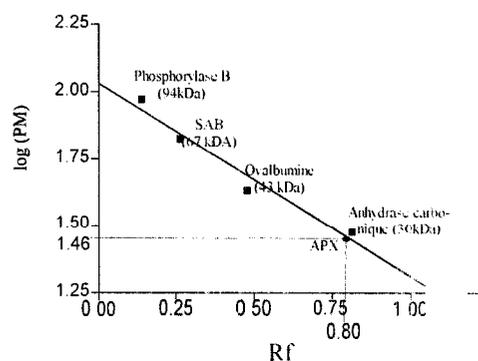


Fig 1 : Détermination du PM approché de l'APX

Effet de la contrainte hydrique sur la quantité d'APX

Un déficit hydrique moyen de -1.5 MPa provoque chez Epace, une augmentation de la quantité d'APX détectée de 100% pour atteindre 180 % à -2 MPa (fig 2a). Chez 1183, ce phénomène est moins marqué avec une augmentation de l'APX à -1.5 MPa de 40 % et 55% à -2 MPa (fig 2b). Chez le genre *Phaseolus*, le déficit hydrique se manifeste plus rapidement à partir de -1 MPa. Il provoque une diminution de la quantité d'APX chez IPA en ce point (fig 2c). Cette quantité atteinte semble se maintenir à un niveau proche de celui du témoin quel que soit le niveau de déficit hydrique appliqué. Chez Carioca par contre, la quantité d'APX augmente en fonction de l'intensité du déficit hydrique (fig 2d) jusqu'à 90% à -1.5 MPa. A -1.8 MPa, l'APX diminue mais reste cependant de 38% plus élevé que le T.

Effet de la réhydratation sur la quantité d'APX

A la réhydratation, les cultivars de *Vigna* et de *Phaseolus* ont des quantités d'APX toujours plus élevées que le témoin et le S2 (fig 2).

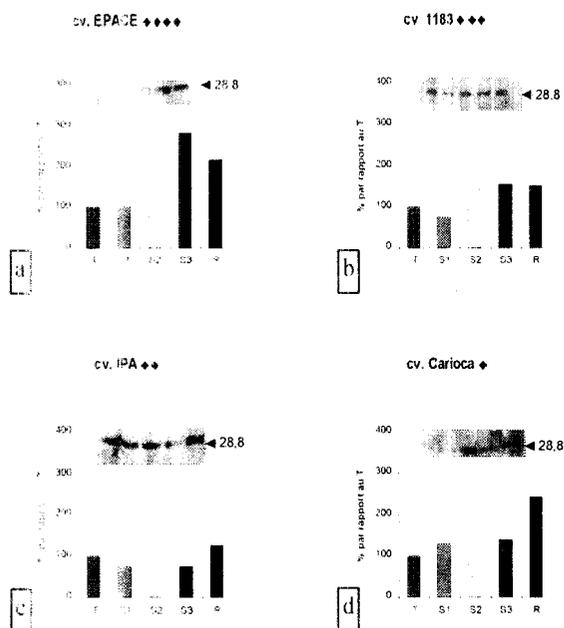


Fig 2 Evolution de la quantité d'APX sous l'effet du déficit hydrique. Les résultats sont exprimés en % par rapport au témoin.

♦ tolérance à la sécheresse en ohanip et au déficit hydrique

Discussion

Dés travaux antérieurs ont permis d'isoler et de séquencer un ADNc codant pour une cAPX (Ferrari-Iliou et al., 1996) chez *Vigna*. Son PM approximatif est de 27 kDa, donc très proche de la bande détectée ici par immunologie (28,8 kDa) suggérant que l'APX identifiée est d'une part une cytosolique et d'autre part un monomère.

Chez le genre *Vigna*, l'induction des mécanismes de défense est tardive. La plante semble répondre à des dommages oxydatifs élevés comme dans le cas de plantules de tournesol (Sgherri et Navari-Izzo, 1995).

En ce qui concerne *Phaseolus*, il existe 2 cas de figures. Le système de défense du cv IPA semble être inhibé par le déficit hydrique puisque la quantité d'APX en conditions hydratées (T et R) est plus élevée. Par contre, chez le cv Carioca, le système de défense se met en place, mais ne se maintient pas quand

le stress devient trop sévère. Ceci laisse penser que soit que la détoxification est inefficace, soit que le stress oxydant n'est pas le facteur primaire de la sensibilité au stress hydrique.

La teneur en APX du genre *Vigna* augmente progressivement en fonction de l'intensité du déficit hydrique. Il semble que le niveau de tolérance du cv EPACE soit lié à l'accumulation de l'APX. Dans le cas de *Phaseolus*, les cultivars ne résistent pas à des stress oxydants élevés quelque soit le mode de lutte, augmentation ou maintien du niveau de l'APX.

Concernant la réhydratation, tout comme les plantes reviviscentes, les légumineuses montrent une augmentation accrue de la défense antioxydante pour faire face aux dommages occasionnés par la reprise normale des activités cataboliques et/ou anaboliques Sgherri et al. (1994).

Références

- Bunkelmann, J. et Trelease, R.N., 1996. *Plant Physiol.*, 110, 589-598.
- Chen, G. X. et Asada, K.; 1989. *Plant Cell Physiol.*, 30 (7), 987-998.
- Ferrari-Iliou, R., Pham Thi, A.T., Mazliak, P et Vieira da Silva, J., 1994. *L'Année Biologique*, 115-136.
- Ferrari-Iliou, R., El Maarouf, H., Pham Thi, A.T., d'Arcy-Lameta, A., Gareil, M. et Zuily-Fodil, Y., 1996. 10th FESPP Congress, Florence, Italy, September 9-13, dans From molecular mechanisms to the plant . an integrated approach. *Plant Physiol. Biochem.*, spécial issue, 237.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A et Sevilla, F., 1997. *Plant Physiol.*, 114 (1), 275-284.
- Sgherri, C.L.M., Loggini, B., Bochicchio, A. et Navari-Izzo, F ; 1994. *Phytochemistry*, 37 (2), 377-381.
- Sgherri, C.L.M. et Navari-Izzo, F.. 1995. *Physiol. Plant.*, 93, 25-30.
- Smirnov, N. et Colombe, S.V., 1988. *J. Exp. Bot.*, 39, 1097-1108.
- Smirnov, N., 1993. *New Phytol.*, 125, 27-58
- Yamaguchi, K., Mori, H. et Nishimura, M.; 1995. *Plant Cell Physiol.*, JSPP, 36(6), 1157-1162.

Aspartic proteinase and drought tolerance : search for molecular markers

Harold ROY-MACAULEY
CERAAS
Thies, Senegal

Introduction

Water deficit stimulates enzymatic activities which cause a decrease in structural and functional lipids and proteins. It has been shown in the case of bean plants, that the more sensitive the plant is to drought, the greater the stimulation of leaf endoproteolytic activities. In addition, these stimulated endoproteolytic activities corresponded to a decrease, particularly in chloroplasts protein content. The enzymes involved in these processes could be used as molecular markers to assist breeding. The nature of the endoproteinases which could be specifically involved in drought tolerance processes has been investigated in this work.

Materials and Methods

Two cultivars of bean plants, differing in their sensitivity to water deficit : *Vigna unguiculata* L. Walp. cv EPACE-1 (resistant), and *Phaseolus vulgaris* L cv Carioquina (sensitive) were cultivated in pots (350 ml) in a mixture of peat and vermiculite (50/50) in a green house.

Autolytic capacity at various pHs (3.0 à 6.5) and aspartic proteinase activities in crude extracts from the second fully expanded leaves of irrigated (-0.3 MPa) and severely stressed (-1.8 MPa) plants were determined using Coomassie blue dye and a specific short chain synthetic polypeptide substrate (Pro-Thr-Glu-Phe-(NO₂-Phe)-Arg-Leu), respectively. Inhibitor studies on purified leaf extracts (ammonium sulphate precipitation, gel filtration - sephadex G-25 column and anion-exchange chromatography - MonoQ anion-exchange column) were made using the following exogenous proteinase inhibitors : PMSF and benzamidine (serine proteinase inhibitors) , pepstatin (aspartic proteinase inhibitor) ; pCMB (cysteine proteinase inhibitor) ; NaOH, EDTA, ZnCl₂, CuCl₂ and CaCl₂ (metallo-proteinase inhibitors).

Results

Autolysis

At more acidic pHs (3.0 to 5.0) autolytic activities were observed for irrigated and stressed plants of both species. They were generally higher in stressed Carioquina than EPACE plants. At less acidic pHs (5.5 to 6.5), no autolytic activity was observed for both irrigated and stressed EPACE plants, revealing a certain stability in their protein content. In the case of Carioquina, autolytic activities were observed only in stressed plants.

Inhibition

Inhibitors belonging to either one of the four groups of proteinase inhibitors used in the study caused inhibition in both irrigated and stressed plants. The metallo-proteinase inhibitors, Zn and Cu, caused the highest inhibitions. Despite the weak inhibition caused by the aspartic proteinase inhibitor under our experimental conditions, consistent results for all the fractions examined were obtained. These results led to the examination of the response of this group of enzymes in particular, to water deficit.

Aspartic proteinase activity

Water deficit significantly stimulated aspartic proteinase activity in both EPACE-1 ($p < 0.05$) and Carioquina ($p < 0.001$). In addition, the stimulation was three times higher in the sensitive cultivar Carioquina than in the resistant cultivar EPACE-1.

Conclusion

The four groups of endoproteinases and in particular aspartic proteinases are likely to be involved in drought tolerance processes. This possibility of aspartic proteinases been used as molecular markers of drought could be further examined.

Utilisation des marqueurs moléculaires en amélioration des plantes : évaluation des ressources génétiques, cartographies génétiques et analyses de caractères importants, amélioration assistée par marqueurs.

Ange Marie **RISTERUCCI**
CIRA D
Montpellier, France

Le marquage moléculaire haute densité du génome ouvre de nouvelles perspectives pour la génétique et la sélection. Une application importante des marqueurs concerne la gestion des ressources génétiques, ils permettent une meilleure description de la distance génétique entre les génotypes ou entre les populations à conserver. Les marqueurs microsatellites développés sur de nombreuses espèces végétales sont, par leur facilité de mise en œuvre, particulièrement intéressants pour ce genre d'application. L'identification variétale de riz; et le contrôle de conformité de clones de cacaoyer sont pris en exemples.

Une autre application importante du marquage moléculaire du génome est la localisation de genes impliqués dans l'élaboration de caractères d'intérêt agronomique, comme des

résistances à des stress biotiques (maladies) ou abiotiques (sécheresse, température,...). des gains de productivité ou de qualité. Les marqueurs liés à ces gènes d'intérêt permettront de repérer précocement dans des croisements les descendants porteurs des allèles favorables et de réaliser une sélection assistée par marqueurs.

Deux exemples sur l'identification de QTLs sont présentés :

- le premier concerne l'étude du déterminisme génétique de la résistance à *Phytophthora* chez le cacaoyer ;
- le deuxième porte sur la localisation de QTLs contrôlant la morphologie et la distribution racinaire chez le riz.



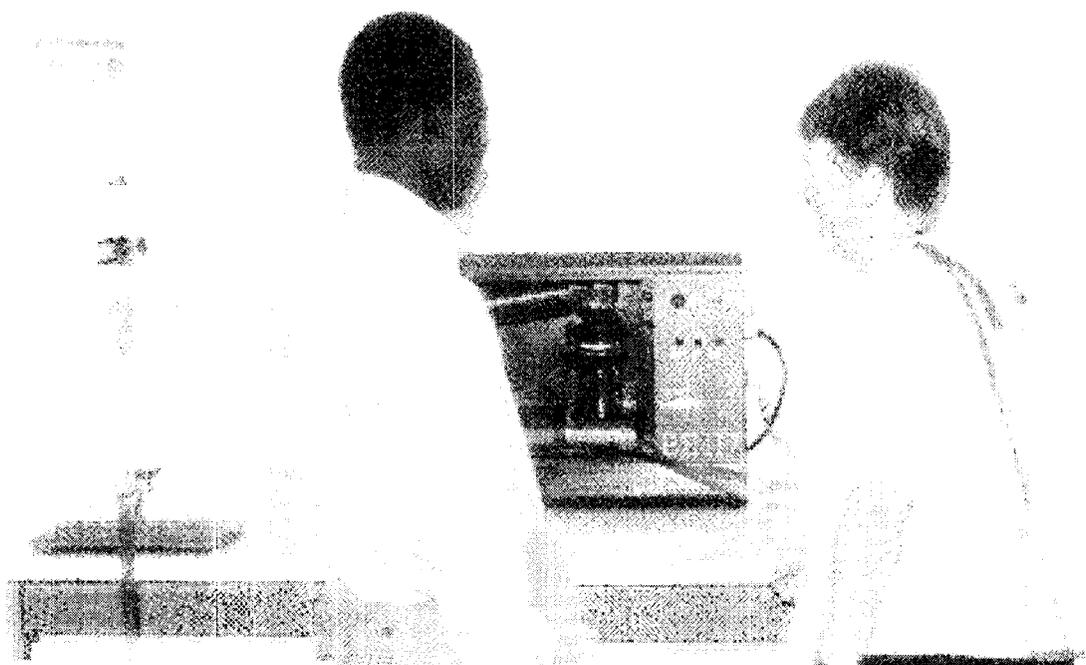
Présentation des équipements scientifiques du CERAAS

Développement d'une capacité de marquage à l'ADRAO visant à l'identification de QTL et à leur utilisation en sélection pour des caractères tels que la compétition avec les adventices et la résistance à la sécheresse

Thierry CADALEN et Satoshi TOBITA
ADRAO / WARDA
Bouaké, Côte d'Ivoire

L'ADRAO a développé depuis peu une capacité de marquage moléculaire basée sur les microsatellites s'inscrivant dans le programme d'hybridation interspécifique *Oryza glaberrima* / *O. sativa* qui vise à utiliser l'énorme potentiel génétique *O. glaberrima* en introgressant des caractères adaptatifs dans un fonds génétique amélioré *O. sativa*. Le but est l'identification et la caractérisation de facteurs génétiques associés à des problèmes majeurs de la riziculture pluviale en Afrique de l'Ouest (pyriculariose, sécheresse, acidité, compétition avec les adventices), et la sélection de génotypes adaptés, en utilisant l'information des marqueurs moléculaires. Cinq variétés de *O. sativa* et trois variétés de *O. glaberrima* sont utilisées dans la production de descendants interspécifiques obtenus par voie conventionnelle (Backcross) ou par voie

androgénétique (population d'haploïdes doublés). Une sélection de 100 microsatellites, déjà cartographiés, permettra de construire une carte génétique avec un maillage relativement lâche (un marqueur tous les 15 – 20 cM) visant à identifier des QTL (Quantitative Trait Locus). La recherche de polymorphisme entre les variétés parentales sur un sous-échantillon de 39 microsatellites confirme l'utilité de ces marqueurs, pour leur niveau de polymorphisme et leur facile mise en œuvre dans un contexte de sélection assistée par marqueurs. La stratégie retenue sera abordée à travers l'analyse de deux caractères importants pour la riziculture pluviale: la résistance à la sécheresse et la compétition avec les adventices.



l' site des laboratoires

Mapping QTLs (Quantitative trait loci) for drought resistance in upland rice

Katherine STEELE¹ and Adam PRICE²

¹ Centre for Arid Zone Studies, University of Wales, Bangor, Gwynedd, L57 2UW

² Department of Plant and Soil Science, University of Aberdeen, AB24 3UU
United Kingdom

The use of molecular markers for mapping traits of agronomic importance holds great promise for speeding the development of improved plant varieties and increasing our understanding of the physiological or molecular mechanisms behind biological phenomenon. Molecular mapping is now being applied to drought resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Drought is important because a considerable proportion of the world rice area is not irrigated and can be prone to water deficit, and upland farmers would benefit from new varieties combining high yield with drought resistance.

A population of 205 F₆ recombinant inbred lines was derived from a cross between two upland varieties of rice (Azucena and Bala) which differ for root traits. Molecular markers have been used to screen the F₆ lines and have enabled construction of a genetic linkage map containing 105 RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) and 109 AFLPs (amplified fragment length polymorphisms). Many root and shoot morphological characters have been screened in the population under experimental and field conditions.

Traits were analysed by interval mapping to identify the likelihood of QTLs being present and linked to molecular markers on the map.

QTLs for root penetration, root length, root thickness, leaf rolling and leaf drying have been identified. QTLs with significant effects on root growth have been targeted for marker-assisted selection to improve the popular Indian upland variety Kalinga III, which has poor roots

Publications

Price, A. H. and Tomos, A. D. (1997) Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) II: Mapping quantitative trait loci using molecular markers. In *Theoretical and Applied Genetics* (95): 143-152

Price A. H., Virk, D. S. and Tomos, A. D. (1997) Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.) I: A hydroponic screen. In *Theoretical and Applied Genetics* (95), pp 132-142

Price, A. H., Young, E. M. and Tomos, A. D. (1997) Quantitative trait loci associated with stomatal conductance, leaf rolling and heading date mapped in upland rice (*Oryza sativa*) In *New Phytologist* (137), pp 83-91



Présentation du système aéroponique

La sélection assistée par marqueurs moléculaires : cas de la tolérance du riz au sel dans le delta du fleuve Sénégal

Moussa Sié, Daba Ndour et M. Kouamé Mieran
ADRAO
Saint-Louis, Sénégal

La salinité constitue une contrainte sévère pour la riziculture dans le delta du fleuve Sénégal ; la salinisation des terres serait due à un flux d'eau et de sel résiduel dans le sol. Elle entraîne une augmentation de la pression osmotique provoquant un stress hydrique mais aussi nutritionnel de la plante donc une baisse de rendement.

Dans le but de sélectionner des variétés de riz tolérantes à la salinité, 2 approches expérimentales ont été retenues respectivement à la Station de recherche de l'ADRAO à Ndiaye et au laboratoire de biotechnologie végétale de l'université Cheikh Anta Diop.

La première basée sur l'analyse de caractères agromorphologiques quantifiables de 89 variétés de riz cultivés en milieu normal (eau douce) et en milieu stressé (eau salée). L'effet de la salinité a entraîné une réduction de 22 % de la croissance au stade jeune plant, 16 % pendant la phase de maturation, 8 % pour les ramifications primaires, 28 % des ramifications secondaires et 37 % du nombre de grains pleins. Cependant, nous avons noté une augmentation de 24 % du tallage, 19 % du nombre de panicules et 180 % de la stérilité chez les variétés les plus sensibles.

La deuxième approche est basée sur l'étude du polymorphisme moléculaire de l'ADN d'un sous échantillon de 8 variétés de riz par la technique DAF. Les résultats obtenus montrent que 50 % des amorces utilisées permettent de mettre en évidence un polymorphisme génétique entre les variétés. L'amplification avec les amorces OR30 ou B4 se traduit par des bandes respectivement

de 2,2 kb et 1,87 kb exclusivement présentes chez les variétés tolérantes tandis qu'avec B5, nous avons noté deux bandes de 1,9 et 1,88 kb qui n'existent que chez les variétés sensibles. Seule l'amorce B2 nous permet de faire une discrimination intragroupe.

Cette étude entre dans le cadre de la recherche de marqueurs moléculaires pour les caractères physiologiques associés à la tolérance du riz au sel.

Matériel et méthodes

Deux traitements ont été utilisés dans l'évaluation de la tolérance à la salinité au champ de 89 variétés de riz à la Station de Recherche de l'ADRAO à Ndiaye (Saint-Louis) : irrigation avec l'eau d'irrigation avec une conductivité électrique (CE) maintenue à 3,5 et 0,5 mS cm⁻¹. Le dispositif expérimental était un bloc de Fisher à 2 répétitions, la formule minérale était de 120N-60P-60K.

Pour la technique de biologie moléculaire, nous avons utilisé la technique DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) pour l'étude du polymorphisme moléculaire de l'ADN d'un sous-échantillon constitué de 8 variétés (4 tolérante et 4 sensibles). 8 amorces avaient été utilisées (OR 30, 8. 6l, 10.6^e, Hp10, B2, B4, B5 et B7).

Remerciements

Les auteurs remercient Mme Marie Madeleine Spencer-Barreto et Mr Diaga Diouf sans l'intervention desquels, la partie biologie moléculaire n'aurait pu se réaliser.

Utilisations des propriétés intrinsèques du virus de la mosaïque africaine du manioc pour développer des stratégies de lutte contre la virose

Abdourahamane SANGARE¹, Claude FAUQUET² Roger BEACHY,²
¹ Laboratoire de Génétique, Université de Cocody, 22 BP 582 ABJ 22

Cocody, Côte d'Ivoire

² ILTAB/TSRI, 70666, North Torrey Pines Road
 La Jolla, USA

Le Virus de la Mosaïque Africaine du Manioc (PCMV) constitue une des contraintes majeures de l'intensification de la culture du manioc en Afrique. L'impact de la maladie sur la production annuelle de manioc sur le Continent varie selon la variété, la région, le climat, etc. mais peut atteindre 100% de chute de rendement dans des situations épidémiques telles que celles vécues dans un passé récent en Ouganda. Malgré son importance mondiale, le manioc n'a commencé à faire l'objet de recherche intensive que depuis une trentaine d'années.

La sélection génétique classique a permis par exemple dans un délai raisonnable de transférer les gènes de tolérance de *Manihot glaziovii* (une espèce apparentée à l'espèce cultivée, *Manihot esculenta*) aux variétés

cultivées. Cependant, ces cultivars améliorés par ces méthodes ne rencontrent pas les exigences alimentaires des paysans et posent des problèmes pour leur vulgarisation. Pour contourner ces problèmes, nous avons entrepris d'utiliser les stratégies basées sur la transformation et l'expression des séquences virales dans des plantes transgéniques. Nous avons testé de nombreuses séquences telles que le gène de la capsid (CP), le gène de la réplicase (Rep) etc.

Les résultats obtenus pour chaque stratégie seront débattus. De même, l'utilisation de notre modèle pour développer des stratégies pour créer la résistance à la sécheresse sera discutée.



Présentation du dispositif hydroponique

Conclusions et recommandations

Cet atelier s'est déroulé en trois sessions. Au cours de chaque session, chacun des intervenants a présenté ses activités en relation avec le thème de ces réunions.

Les premières présentations portaient sur les stratégies de sélection variétale employées par les différents intervenants, et sur les possibilités d'optimisation de ces stratégies en utilisant les techniques modernes de biochimie et biologie moléculaire (Session I). Les plantes étudiées étaient l'arachide (D. Clavel et S. Dopavogui), le niébé (G. Zombré), le sorgho (B Traoré), le fonio (A. Berthé), le maïs (J. Souopgui), l'hévéa (E. Koffi) ou encore les cultures vivrières en général (K. Sabally). Les exposés ont donné lieu à des discussions très ouvertes permettant à chacun d'appréhender la problématique de chaque intervenant,

De toutes ces discussions il ressort que la sélection des espèces résistantes à la sécheresse pose de nombreuses difficultés. Pour les surmonter et élaborer un programme de sélection efficace, le sélectionneur doit, dans un premier temps, connaître parfaitement son matériel. Les phénomènes mis en jeu sont en effet beaucoup trop complexes pour être résumés dans l'étude d'un seul caractère.

D'autre part, les sélectionneurs ont montré les limites des méthodes classiques, et leurs inconvénients. Ils ont conclu que, pour améliorer les schémas de sélection classiques, il fallait :

- avoir une approche pluridisciplinaire du problème, regroupant sélectionneurs, agrophysiologistes, biochimistes et biologistes moléculaires ;
- employer de nouvelles techniques afin de surmonter les difficultés rencontrées lors des programmes de sélection classiques.

La seconde journée a donné lieu à des présentations concernant certains critères biochimiques associés à la tolérance des plantes à la sécheresse, et pouvant être utilisés comme marqueurs (Session II). Il a beaucoup été question des activités enzymatiques protéolytiques (M. Kidric, H. Roy-Macauley), lipolytiques (A. Pham Thi), ainsi que des systèmes anti-oxydants (A. D'Arcy-Lameta, NN Diop).

Les systèmes membranaires sont d'une importance majeure dans le métabolisme cellulaire. En effet, toutes les grandes fonctions cellulaires font intervenir les membranes, qui maintiennent une compartimentation indispensable à la survie des cellules. Les travaux réalisés sur le niébé ont mis en évidence le rôle important des phosphogalactolipides (MGDG et DGDG) dans le maintien de l'intégrité membranaire, lors d'une contrainte hydrique. Ces travaux sont récents et paraissent prometteurs, car ils ont déjà été confirmés sur d'autres plantes (cocotier, coton, palmier à huile). La composition lipidique membranaire représenterait donc un paramètre très pertinent dans le cas d'une sélection pour la tolérance à la sécheresse.

Dans ce domaine, les recherches ont été approfondies, et une relation a été mise en évidence entre l'expression des gènes codant pour les enzymes lipolytiques et la tolérance à la sécheresse. L'existence de sondes permettant l'identification des gènes impliqués permettrait d'effectuer un screening variétal, et également de suivre le caractère associé dans une descendance. Il faut cependant rester prudent car un seul caractère ne saurait permettre à lui seul, la sélection de matériel adapté à la sécheresse.

Un autre exemple a en effet permis de montrer qu'un caractère biochimique de résistance à la sécheresse, mis en évidence chez le genre *Vigna*, se révélait non pertinent dans le cas de *Phaseolus*.

Les autres activités enzymatiques d'importance majeure lors d'un stress hydrique sont les activités protéasiques qui détruisent les protéines, en particulier celles des membranes. Dans le cas de l'aspartyl protéinase, les travaux sont allés jusqu'à l'étude de l'expression du gène codant pour cette enzyme, en réponse au stress hydrique.

La biochimie permet donc d'approfondir les connaissances de la plantes et de découvrir des critères plus précis, mais elle a tout de même ses limites.

Plusieurs chercheurs du sud ont souligné que la plupart des travaux présentés au cours de cette session ont été conduits sur des plantes modèles ne correspondant pas aux plantes souvent cultivées dans les pays du sud. Cependant, il a été rappelé que les possibilités de transférer les techniques d'une plante à d'autres existent et qu'elles ne posent pas de problèmes. L'une des missions du CERAAS est d'ailleurs d'assurer le transfert et l'adaptation des techniques nouvelles pour les rendre efficaces dans les pays en développement.

Certains ont également souligné l'intérêt d'assister à ces réunions scientifiques, qui permettent de réunir des chercheurs de différentes disciplines. Cet atelier ne doit représenter qu'une étape ; il faut poursuivre cette démarche en ouvrant de nouvelles collaborations entre les différentes institutions présentes.

La troisième journée a permis aux intervenants de présenter différentes techniques de marquage moléculaire, ainsi que leurs applications en génétique et en sélection (Session III) Les résultats présentés dans le cas du riz (K. Steele, T. Cadalen et S. Tobita, M. Sie), du cacao (A.M. R sterucci) ont montré les potentialités de ces techniques pour l'étude de la tolérance à la sécheresse.

Ces nouvelles approches, encore peu utilisées dans les pays de la sous-région, ont suscité beaucoup d'intérêt de la part des sélectionneurs. Il est donc urgent de recourir à ces techniques afin d'optimiser leurs travaux de sélection. Il convient cependant de ne pas se précipiter dans toutes les directions car le choix des techniques à utiliser est fonction des objectifs à atteindre et de l'état des connaissances actuelles.

La mise en œuvre d'un programme de sélection assistée par marqueurs moléculaires nécessite 3 conditions

- bien connaître son matériel végétal d'un point de vue agronomique, physiologique et même biochimique ;
- avoir un matériel suffisamment diversifié et un programme de sélection en cours ou à démarrer ;
- effectuer une recherche bibliographique exhaustive sur l'état des recherches dans le domaine, afin de ne pas s'engager dans une voie qui n'aboutira pas.

Il a été souligné également que l'évolution rapide des techniques en biologie moléculaire impose des échanges scientifiques permanents, pour se maintenir au niveau. Cet atelier est donc une excellente initiative, d'autant qu'au Sénégal, se trouvent concentrés un certain nombre de laboratoires utilisant ces techniques (UCAD, IRD, CERAAS...). Il existe des possibilités de collaboration qu'il faut explorer.

Les participants ont émis le souhait d'avoir accès à ces nouvelles techniques, qui sont encore peu utilisées dans les pays de la sous-région. Cet aspect rentre tout à fait dans le mandat du CERAAS, dont une des principales missions est de mettre à la disposition de la sous-région les techniques modernes pour optimiser les schémas de sélection variétale pour l'adaptation à la sécheresse.

La table ronde organisée le dernier jour de l'atelier a permis, devant les demandes exprimées lors de cet atelier, de formuler les recommandations ci-dessous.

- 1 Il est indispensable de renforcer les compétences scientifiques et techniques dans ce domaine au CERAAS. Des équipements performants sont disponibles, il faut dès lors concentrer les compétences scientifiques pour les mettre en œuvre, et atteindre une masse critique nécessaire à la bonne marche d'un laboratoire de biologie moléculaire.
- 2 Il faut identifier et acquérir les techniques susceptibles de permettre un démarrage rapide des activités dans ce domaine. Compte tenu de la taille de sa structure, le CERAAS ne peut pas mettre en œuvre l'ensemble de ces nouvelles techniques, il faut faire des choix réfléchis, Dans

un premier temps, des analyses de contrôle des collections pourraient être initiées par l'utilisation de microsattellites ou PCR-RFLP sur gènes répétés (rDNA).

- 3 La proposition d'organiser des séminaires techniques, conjointement avec d'autres institutions régionales a été faite et approuvée par l'ensemble des participants. Ces ateliers seraient le lieu de formation, de réflexions sur les programmes à mettre en œuvre et les choix à prendre.
- 4 La création d'un réseau informel dans un premier temps, afin d'encourager les échanges scientifiques dans ce domaine, est fortement souhaitée. Ce réseau permettrait de maintenir le niveau de performance des équipes du sud.
- 5 L'élaboration de projets scientifiques d'intérêt commun permettra de développer les activités! dynamiser le réseau et de remplir les missions de formation et de développement du CERAAS. Les partenaires des institutions du Sud doivent approfondir leur réflexion afin de formuler clairement leurs problématiques de sélection. Chacun est invité à proposer un programme de recherche s'inscrivant dans un plan stratégique national. Compte tenu de la forte demande enregistrée, chaque dossier sera évalué par un comité qui hiérarchisera les demandes en terme de priorité. Les programmes choisis débiteront le plus rapidement possible au CERAAS.

Enfin, durant les travaux, les partenaires du Nord présents ont réaffirmé leur volonté d'appuyer et de participer activement à la mise en œuvre de ces précédentes initiatives.

Liste des participants

Prénoms & Nom	Institution	Pays	Ville	Fax
Emmanuel AKUBUGWO	School of Biological Sciences Abia State University	Nigeria	Uturu	(23-1) 83 2318 83
*Adama BERTHE	Institut Polytechnique Rural de Katibougou (IPR)	Mali	Koulikoro	(223) 262189
David BOGGIO	CERAAS	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 95
Serge BRACONNIER	CERAAS / CIRAD	Sénégal	Thiès	(221) 951 4995
Alain BRAUMAN	Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Station de Bel Air	Sénégal	Dakar	(221) 832 16 75
Thierry CADALEN	ADRAO / WARDA	Côte d'Ivoire	Bouaké	(225) 63 4714
Jean-Luc CHOTTE	Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Station de Bel Air	Sénégal	Dakar	(221)832 16 7 5
Danièle CLAVEL	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) Centre de Bambey / CIRAD	Sénégal	Bambey	(221) 973 60 52
Agnès d'ARCY-LAMETA	Université Paris 7 Laboratoire de Biochimie et Physiologie de l'Adaptation des Végétaux (LBPAV)	France	Paris	331 14276068
Nicolas DIALLO	Université Cheikh Anta Diop (UCAD) Département de Biologie Végétale	Sénégal	Dakar	(221) 639 61 59
Ndiaye Ndack DIOP	CERAAS	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 93
Diégane DIOUF	UCAD / Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Station de Bel Air	Sénégal	Dakar	(221)832 1 6 75
Macoumba DIOUF	CERAAS	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 9 5

*Siba I DOPAVOGUI	fnati tu t de Recherche agronomique de Guinée (IRAG) Centre de Foulaya	Guinée	Kindia	(224) 415758
Alidou FAYE	CERAAS	Sénégal	Bambey	(221) 973 60 52
Marjetka KIDRIC	Jozef Stefan Institute Department of biochemistry and Molecular Biology	Slovénie	Ljubljana	386 61 27 35 94
*Edmond KOFFI	Centre National de Recherche Agricole (CNRA) Station de Bimbresso	Côte d'Ivoire	Abidjan	(225) 45 33 05
Ndiaga MBAYE	CORAF	Sénégal	Dakar	(221) 825 55 69
Al NDIAYE	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) Centre de Bambey	Sénégal	Bambey	(221) 973 60 52
Mamadou NDIAYE	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) Centre de Bambey	Sénégal	Bambey	(221) 973 60 52
Marc NEYRA	Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Station de Bel Air	Sénégal	Dakar	(221) 832 16 75
Marcel NWALOZIE	CORAF / fmo State University, Nigeria	Sénégal	Dakar	(221) 825 55 69
Chuks OGBONNAYE	CERAAS / Abia State University, Nigeria	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 95
Ana PHAMTHI	Université Paris 7 Laboratoire de Biochimie et de Physiologie de l'Adaptation des Végétaux (LBPAV)	France	Paris	331 44 27 60 68
Roger PONTANIER	Institut de Recherche pour le Développement (IRD) Station de Bel Air	Sénégal	Dakar	(221) 832 16 75
Ange Mark RISTERUCCI	CIRAI	France	Montpellier	(33) 467 6 f 37 92

Harold ROY- MACAULICAULEY	CERA / University of Sierra Leone	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 95
*Kebba SABALLY	National Agricultural Research Institute (NARI)	Gambia	Serrekunda	(220) 484921 (220) 484927
Paule Malick SALL	CERAAS	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 95
Mbaye Ndoye SALL	CERAAS	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 95
Benoît SARR	CERAAS	Sénégal	Thiès	(221) 951 49 95
Sicou Sidibé	CERAAS	Sénégal	Bambey	(221) 973 60 52
Moussa SIE	ADRAO / WARDA	Sénégal	Saint-Louis	(221) 962 64 93
*Jacob SOUOPGUI	Université de Yaoundé Faculté de Médecine et des Sciences Biomédi- cales	Cameroun	Yaoundé	(237) 239469
Katherine STEELE	CAZS University of Wales	United Kingdom	Bangor	44 1248 371 533
Satoshi TOBITA	ADRAO / WARDA	Côte d'Ivoire	Bouaké	(225) 63 47 14
*Bakary TRAORE	Institut Polytechnique Rural de Kati bougou (IPR)	Mali	Koulikoro	(223) 2621X9
*Gerard ZOMBRE	Université de Ouaga- dougou Faculté des Sciences et Techniques	Burkina Faso	Ouagadougou	(226) 307242

*Chercheurs dont la participation a été financée par le CTA