

Étude de la tolérance à la sécheresse chez les céréales

L'orge comme modèle biologique,
approche QTL

B. Teulat-Merah¹ M. Ben Salem²

W. Zoumarou² H. Bahri³

R. Douimi³ D. This¹

Introduction

La sécheresse est un stress abiotique qui affecte le rendement des céréales et sa stabilité dans le bassin méditerranéen. Du point de vue agronomique, l'adaptation à la sécheresse est la capacité d'une plante à maintenir un rendement à travers des environnements où les périodes de sécheresse, leurs durées et leurs intensités sont fluctuantes. Le rendement étant difficile à améliorer directement (faible héritabilité, fortes interactions génotype x environnement...), l'étude

¹ Inra-Agro-M, UFR de Génétique et d'amélioration des plantes, 2 place P. Viala, 34060 Montpellier cedex, France.

² Laboratoire de Physiologie végétale, Inrat, 2049 rue Hedi Karray, Ariana, Tunis, Tunisie.

³ Département d'Agronomie et d'amélioration des plantes, École nationale d'agriculture de Meknès, PBS40, Meknès, Maroc.

de caractères pouvant avoir un impact positif sur le rendement est le plus souvent abordée. Ces caractères d'adaptation à la sécheresse ont été classés par Turner (1979) et Jones *et al.* (1981) :

L'échappée permet à certains génotypes d'échapper au stress en accomplissant leur cycle de développement en dehors des périodes de sécheresse. Ce phénomène est largement expliqué par la phénologie. Mais la sécheresse est imprévisible et les plantes sont forcément confrontées au stress une année ou l'autre.

Certains caractères d'adaptation, inductibles, permettent une tolérance avec maintien du potentiel hydrique foliaire ou évitement (système racinaire développé, réduction de la surface foliaire, présence de cires à la surface des feuilles, enroulement foliaire...).

Lorsque le potentiel hydrique foliaire est réduit, certaines plantes sont capables de maintenir leur turgescence cellulaire par ajustement osmotique (AO) grâce à l'accumulation active de solutés (Turner et Jones, 1980).

Enfin, s'il y a perte de turgescence, il peut y avoir une tolérance à la déshydratation des tissus (Turner, 1986).

Les caractères d'adaptation ont été largement étudiés (Turner, 1997). Cependant, leur déterminisme génétique est souvent peu connu. Pour mieux comprendre les composantes physiologiques, génétiques et moléculaires de la tolérance à la sécheresse, une étude génétique des caractères d'adaptation est néanmoins nécessaire. Par ailleurs, l'identification et l'utilisation de marqueurs moléculaires liés à des caractères complexes constituent un gain de temps pour la sélection. Cette recherche peut être abordée en identifiant les locus impliqués dans la variation quantitative du caractère étudié ou QTL (Quantitative Trait Loci) et en étudiant leur nombre, leur effet et leur stabilité. Pour que ce type d'étude soit efficace, il faut sélectionner les caractères en fonction de leur valeur adaptative globale par rapport à des stress et des environnements variables, leur impact positif sur le rendement et leur extrapolation possible aux autres céréales.

Dans ce cadre, l'orge est une espèce de choix. Elle présente des capacités d'adaptation à plusieurs stress abiotiques (sécheresse, salinité...). Certaines variétés locales ou espèces sauvages (*Hordeum spontaneum*) représentent une large source de variation pour des caractères morpho-physiologiques susceptibles de contribuer à la stabilité du

rendement (Forster *et al.*, 1999). Ces caractères peuvent être introgressés dans des variétés améliorées. De plus, la colinéarité des génomes des Triticées et plus largement des graminées a été largement démontrée (Moore *et al.*, 1995). Cette synténie permet la comparaison et le transfert d'informations sur la localisation des locus impliqués dans le contrôle de caractères d'adaptation de l'orge (diploïde) à d'autres céréales méditerranéennes comme le blé dur (tétraploïde).

I Caractères utilisables pour une analyse génétique de la tolérance

Recherche de critères sur cinq géotypes d'orge

Afin de rechercher les caractères les plus pertinents pour une étude génétique et moléculaire de la tolérance à la sécheresse chez les céréales, une étude bibliographique générale de la question a d'abord été réalisée. Puis, un nombre important de caractères ont été étudiés directement sur 5 géotypes d'orge soit au champ, soit en serre ou en chambre de culture (conditions contrôlées), avec pour chaque expérience, des conditions stressantes (déficit hydrique ou conditions pluviales) ou irriguées.

Matériel végétal et méthodes

Les géotypes étudiés sont LM2887 (lignée tolérante sélectionnée à l'Inra de Montpellier), Plaisant et Express (variétés productives mais sensibles à la sécheresse), Tadmor (sélectionnée par l'Icarda à partir d'une variété locale Syrienne Arabi Aswad et caractérisée par une stabilité du rendement élevée) et Et/Apm (lignée sélectionnée en Tunisie par l'Icarda, à rendement peu stable).

Les caractères permettant de limiter les pertes en eau mesurés dans notre étude sont le nombre de racines, la longueur et le volume racinaires et la transpiration épidermique. Le maintien de la photosynthèse a été abordé par l'étude de la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) des grains matures. Pour des orges originaires du

Moyen-Orient comme Tadmor, une faible teneur en chlorophylle totale en fin de cycle pourrait être un caractère adaptatif (van Oosterom et Acevedo, 1992). Il pourrait être impliqué directement dans le maintien de l'efficacité photosynthétique par protection du photosystème II (Watanabe *et al.*, 1995 ; Tardy *et al.*, 1998). Cette adaptation géographique spécifique semble être retrouvée chez des blés durs originaires des mêmes régions (Monneveux, comm. pers.). La teneur en chlorophylle totale a donc été déterminée sur la feuille étandard, avec un appareil Minolta Camera (Spad-502) mesurant la transmittance de la feuille dans deux domaines de longueur d'onde (rouge et proche infrarouge). En tenant compte de ces deux transmittances, une valeur numérique (valeur Spad) est calculée. Elle est proportionnelle à la teneur en chlorophylle totale présente dans la feuille. La transmission du signal de stress vers les cellules a été étudiée par la mesure de la teneur en acide abscissique (ABA) xylémique (Borel *et al.*, 1997). Enfin, des caractères liés au statut hydrique de la plante et à l'ajustement osmotique ont été mesurés en conditions contrôlées : teneur relative en eau (TRE), potentiels hydrique et osmotique foliaire (ψ and $\psi\pi$) et concentration en sucres solubles (CSS). Ces caractères ont été mesurés à différents temps après application d'un déficit hydrique au stade 4-feuilles (Teulat *et al.*, 1997 a).

Résultats

Les caractères retenus comme ayant un impact global sur le rendement et généralisables au moins aux deux espèces sont l'ajustement osmotique (AO) et l'efficacité d'utilisation de l'eau (EUE) évaluée par la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$). La relation entre $\delta^{13}\text{C}$ et EUE est résumée dans le tableau 1. Pour l'AO et $\delta^{13}\text{C}$, des résultats comparables ont été obtenus chez l'orge et le blé dur dans notre laboratoire (Rekika, 1997 ; Teulat, 1997 ; Teulat *et al.*, 1997 a ; Merah, 1999) et dans l'ensemble de la littérature, ce qui en faisait des caractères de choix pour une étude génétique.

La phénologie pouvant jouer un rôle important dans l'esquive de la sécheresse au champ, elle a été également retenue pour l'étude QTL. Enfin, la teneur en chlorophylle totale pouvant avoir une valeur adaptative dans plusieurs espèces céréalières originaires du Moyen-Orient, son étude génétique était également intéressante dans le matériel végétal utilisé.

	A	B
Teneur en ^{13}C $\delta^{13}\text{C}$	Faible Très négatif	Forte Peu négatif
Discrimination contre le ^{13}C Δ	Elevée Grand	Faible Petit
Pression partielle de CO_2 (P_i)	Elevée	Faible
Carboxylation par rapport à la diffusion Limitation stomatique	Plus limitante Faible	Moins limitante Elevée
Efficacité d'utilisation de l'eau Matière sèche produite / quantité d'eau transpirée	Faible Faible	Elevée Elevée

Δ : discrimination isotopique du carbone

$\delta^{13}\text{C}$: composition isotopique du carbone

Δ (‰) = $(\delta^{13}\text{C}_{\text{Ca}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{cp}}) / 1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{cp}}$ où $\delta^{13}\text{C}_{\text{ca}}$

est la composition isotopique du carbone de l'air

et $\delta^{13}\text{C}_{\text{cp}}$ la composition isotopique du carbone de l'échantillon (produit).

■ Tableau 1

Composition isotopique du carbone

et efficacité d'utilisation de l'eau (d'après Deléens *et al.*, 1994).

Analyse approfondie du comportement de deux lignées méditerranéennes

Caractères mesurables au champ

La composition isotopique du carbone, la phénologie et la teneur en chlorophylle totale peuvent être étudiées directement au champ pour l'étude génétique. En effet, ces caractères peuvent être mesurés par des techniques non destructives sur un grand nombre d'individus.

Un essai implanté sur le champ d'étude du campus Ensa/Inra de Montpellier en 1995 et conduit en conditions pluviales et irriguées a permis l'évaluation des génotypes parents du croisement pour les 3 caractères. Pour la teneur en chlorophylle mesurée à l'anthèse, Tadmor a présenté des valeurs Spad inférieures à Er/Apm, ceci pour les deux régimes hydriques. Les valeurs Spad étaient moins élevées dans les conditions pluviales par rapport aux conditions irriguées. La plus forte différence entre les deux traitements hydriques a été notée pour Tadmor. L'anthèse et la floraison étaient plus précoces pour Er/Apm que pour Tadmor quel que soit le traitement hydrique,

mais les deux géotypes étaient plus précoces dans les conditions pluviales. Enfin, pour $\delta^{13}\text{C}$, les valeurs étaient moins négatives en pluvial qu'en irrigué. Les plantes étaient donc plus enrichies en ^{13}C , et avaient une meilleure EUE dans les conditions moins favorables. Les valeurs pour Tadmor étaient de -25,9 ‰ en pluvial et de -26,8 ‰ en irrigué et pour Er/Apm, de -25,6 ‰ en pluvial et de -26,4 ‰ en irrigué. Les différences entre les deux parents étaient faibles mais significatives.

Une analyse des corrélations tenant compte des deux traitements hydriques a montré des corrélations significatives négatives entre $\delta^{13}\text{C}$ et le nombre d'épis fertiles, le rendement en grains et l'indice de récolte ($r = -0,67^*$, $r = -0,68^*$ et $r = -0,81^{**}$). Ceci est également en accord avec les données bibliographiques chez le blé et l'orge où des rendements élevés sont obtenus pour une EUE faible (Acevedo, 1993 ; Deléens *et al.*, 1994). Chez l'orge, plus les plantes ont une forte discrimination du carbone (faible $\delta^{13}\text{C}$), meilleure est leur stabilité de rendement et leur rendement dans des conditions hydriques limitantes (Acevedo, 1993). Des résultats similaires ont été trouvés dans une étude d'une core collection de 144 géotypes de blé dur (Merah, 1999).

Cas particulier de l'ajustement osmotique

Les deux géotypes parentaux ont montré des comportements contrastés pour la capacité d'ajustement osmotique (AO) évaluée en conditions contrôlées à un stade jeune. Tadmor était caractérisé par un AO élevé. Er/Apm présentait un faible AO et un potentiel osmotique foliaire ($\psi\pi$) très négatif (faible) de façon intrinsèque ($\psi\pi$ sans stress), 12 jours après le stade 4 feuilles (Teulat *et al.*, 1997 a).

Au cours du déficit hydrique, Tadmor maintient également sa teneur relative en eau (TRE). La comparaison des résultats avec ceux obtenus lors d'une expérience en conditions contrôlées conduite au Cimmyt par Lewicki en 1994, sur les mêmes géotypes où le déficit hydrique a été appliqué au stade floraison, a montré que les géotypes avaient les mêmes comportements sous stress aux deux stades de développement étudiés (Teulat, 1997) (fig. 1). Cependant, les différences dans les valeurs de potentiel osmotique observées ont été attribuées aux différences de développement. Les différentes

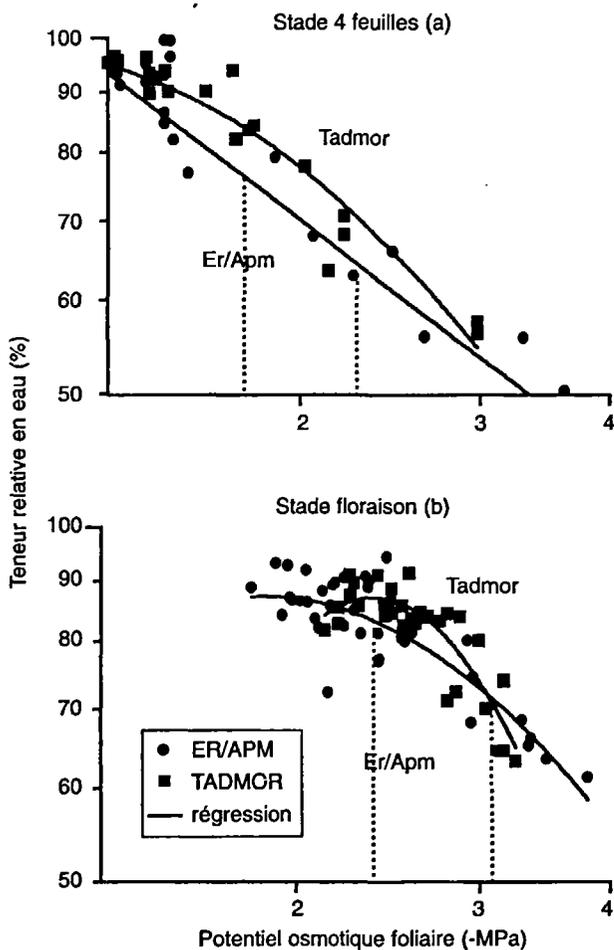


Figure 1

Relation entre la teneur relative en eau (TRE) et le potentiel osmotique foliaire ($\psi\pi$) quand un déficit hydrique est appliqué au stade 4 feuilles (a) et à la floraison (b) pour le génotype à ajustement osmotique élevé Tadmor et le génotype à plus faible ajustement osmotique Er/Apm.

La portion des courbes entre les deux barres verticales représente la gamme de valeurs de $\psi\pi$ où des différences de TRE significatives entre les deux génotypes sont obtenues.

méthodes employées pour évaluer l'AO ont donné les mêmes résultats. La méthode de Morgan (1983) permettant un suivi de la TRE

en fonction de ψ et $\psi\pi$ tout au long du stress, et comparant les valeurs de TRE des génotypes à un ψ ou $\psi\pi$ donné, n'est pas applicable pour l'étude de grands effectifs de plantes comme c'est le cas dans les études génétiques.

Afin de réduire le nombre de caractères à mesurer pour l'étude génétique, les corrélations entre les différents paramètres d'évaluation de l'AO ont été étudiées. On trouve des corrélations significatives entre AO élevé, TRE élevée, faibles ψ et $\psi\pi$, et accumulation de sucres solubles (ASS) élevée à 14 % de la capacité au champ (CC) : AO-ASS $r = 0,91^*$, AO-TRE $r = 0,91^*$, AO- $\psi\pi$ $r = - 0,87^*$. L'évaluation du potentiel osmotique à turgescence maximale ($\psi\pi 100$) par calcul (Wilson *et al.*, 1979) permet en mesurant la TRE et le $\psi\pi$ de comparer le comportement osmotique de plusieurs génotypes à une teneur en eau de la feuille donnée. L'étude complète des lignées parentales a montré que le ψ est bien réduit lors du déficit hydrique. La mesure de la TRE et du $\psi\pi$ permet donc une appréciation simplifiée mais réelle des différences de $\psi\pi$ à un état comparable de stress des plantes. Ces mesures peuvent être réalisées sur de grands effectifs et à l'humidité du sol où les caractères sont les mieux exprimés, (dans notre étude 14 % CC). L'AO peut alors être calculé par différence des $\psi\pi 100$ des plantes non stressées et stressées (Ludlow *et al.*, 1983). Dans notre cas, les différences entre les $\psi\pi 100$ des plantes à 100 % CC (plantes témoins irriguées ayant poursuivi leur croissance) et à 14 % CC (ayant subi le stress hydrique) ont été considérées. Cette méthode présente l'avantage, quand les génotypes ont un $\psi\pi 100$ intrinsèque faible en conditions non stressantes, de permettre une distinction entre ajustement osmotique adaptatif, inductible par le déficit hydrique et capacité osmotique intrinsèque. La mesure de la concentration en sucres solubles (CSS), solutés majoritairement accumulés lors de l'AO chez l'orge (Lewicki, 1993), est également intéressante. Elle permet l'étude des relations entre AO, réduction du $\psi\pi$ et accumulation de solutés lors d'un déficit hydrique bien caractérisé. La mesure de ces caractères à 14 % CC et 100 % CC permet alors non seulement de calculer l'AO selon la méthode de Ludlow *et al.* (1983), mais aussi de comparer les QTL impliqués dans leur variation dans deux conditions hydriques différentes : déficit hydrique et témoin irrigué.

I Analyse QTL

La population en ségrégation de 167 lignées recombinantes en F8 (LR) issue du croisement entre Tadmor et Er/Apm a été utilisée pour l'ensemble des analyses génétiques.

Essais agrophysiologiques

Conditions contrôlées

Les caractères retenus liés à l'ajustement osmotique (AO) ont été mesurés sur les LR à 14 % et 100 % CC. Pour mesurer les caractères sur 5 plantes par LR dans chaque traitement hydrique, un dispositif expérimental en blocs incomplets équilibrés a été adopté. Ce dispositif permet de mesurer les caractères sur un grand nombre de LR et de plantes par LR, tout en pouvant tenir compte d'une variabilité environnementale qui peut exister entre les différents blocs. Dans notre cas, ces blocs correspondaient à des expériences distinctes réalisées chronologiquement dans des conditions contrôlées programmées de façon identique. Pour éviter les interférences avec la phénologie et pour plus de rapidité dans l'exécution des mesures, le stress hydrique a été appliqué à un stade jeune (4-feuilles développées) sachant que des comportements similaires existaient à un stade de développement ultérieur. Les détails de cette expérience sont présentés dans Teulat (1997) et Teulat *et al.* (1998).

En parallèle, la teneur en chlorophylle totale a été mesurée sur la dernière feuille développée. Enfin, pour étudier la relation entre la teneur en eau des plantes (évaluée par la TRE) et la croissance végétative, les masses de matière fraîche et sèche aérienne totale, le nombre de feuilles sur le brin maître et le nombre total de talles ont également été mesurés.

Essais au champ

Pour étudier le comportement des 167 LR en conditions agricoles et identifier des QTL ne présentant pas d'interaction avec l'environne-

ment pour quelques caractères agronomiques, trois essais ont été réalisés : en 1995 sur le champ d'étude du campus Ensa/Inra de Montpellier (sud de la France, M95), en 1996 au Cida à Grenade (sud de l'Espagne, G96) et en 1997 sur le site expérimental de l'Inra à Mauguio (environs de Montpellier, M97). L'essai M95, conduit en conditions pluviales consistait en 2 lignes de 3 m de long de chaque LR (20 graines par ligne). Pour G96, conduit en conditions pluviales, les plantes ont été semées dans des parcelles de 3 m² (220 graines/m²). Enfin, pour M97, l'ensemble des LR et des parents ont été étudiés en conditions pluviales (M97plu) et irriguées (M97ir) à raison de deux blocs par traitement. Deux lignes de 1,5 m par LR à raison de 20 graines par ligne ont été implantées. Les caractères agronomiques mesurés étaient la masse aérienne totale, le rendement, le poids de 1 000 grains, le nombre de talles fertiles, le nombre de grains par épi et la hauteur. La date d'épiaison a été également notée et la teneur en chlorophylle totale mesurée sur la feuille drapeau à l'anthèse (valeurs Spad). La composition isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) a également été mesurée à partir de grains matures pour l'essai G96.

Enfin, un essai supplémentaire a été conduit en 1999 sur le champ d'étude du campus Ensa/Inra de Montpellier (M99) sous deux régimes hydriques (M99plu et M99ir) selon le même dispositif que pour M97. Il a été implanté pour valider les QTL obtenus en conditions contrôlées et étudier ou vérifier les relations entre les différents caractères adaptatifs et les caractères agronomiques sur un même essai. Les concentrations en glucose, fructose et saccharose ont été mesurées à partir de disques foliaires récoltés à l'épiaison pour un bloc par traitement (François, 1999). Simultanément et sur l'ensemble des blocs, la TRE, le $\psi\pi$, la teneur en chlorophylle totale ont été mesurés ainsi que la hauteur, la longueur du col de l'épi, le rendement, le poids de 1 000 grains, le poids aérien total à la récolte. Des échantillons de grains matures seront également utilisés pour la mesure de $\delta^{13}\text{C}$ prochainement.

Les données météorologiques de chaque cycle de développement ont été relevées. Ce suivi a permis de noter des périodes de sécheresse de février à mars inclus et de début mai à fin juin pour M95, de début avril à début juillet pour G96, de février à mai pour M97plu et de mi-janvier à mi-mars pour M99plu. Ces périodes de sécheresse différaient également par leur intensité. M95, G96,

M97plu, M97ir, M99plu et M99ir sont considérés comme 6 environnements différents.

Méthodologie de détection des QTL

Afin d'identifier des QTL impliqués dans la variation des caractères mesurés, une carte génétique a été construite avec les 167 LR et le logiciel Mapmaker version 3,0 (Lander *et al.*, 1987). Une carte de base est décrite dans Teulat *et al.* (1998). À l'heure actuelle, cette carte est essentiellement composée de marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) et microsatellites (Simple Sequence Repeat ou SSR) et couvre environ les trois quarts du génome de l'orge. Un effort particulier a été fait pour cartographier des marqueurs permettant une comparaison de cartes et de QTL dans l'espèce (*Hordeum vulgare* L.) et entre espèces de céréales. La cartographie de gènes candidats a permis d'aborder la recherche de marqueurs liés à la tolérance à la sécheresse d'une façon plus fonctionnelle.

Les QTL ont été recherchés : i) pour chaque bloc séparément pour l'étude en conditions contrôlées et pour chaque environnement pour les essais au champ M95, G96, M97plu et M97ir ; ii) à partir de moyennes phénotypiques brutes. Pour l'étude en chambre de culture, malgré les conditions contrôlées, des effets bloc et pot (bloc) très hautement significatifs ont été notés et les moyennes ajustées ont été générées en fixant ces effets (Teulat *et al.*, 1998). De la même manière, des moyennes ajustées ont été générées pour les 4 premiers environnements au champ en fixant l'effet environnement (haute-ment significatif). Pour les différents lots de données, les QTL ont été recherchés par analyse de variance à un facteur ($P < 0,005$) soit en utilisant la procédure Anova du logiciel SAS, soit avec QGene™ version 2,30 (Nelson, 1997) et par cartographie simple d'intervalle ($LOD \leq 2$) avec le logiciel Mapmaker/QTL version 1 (Lander et Botstein, 1989). Pour les essais au champ, le logiciel MQTL (Tinker et Mather, 1995) a également été utilisé car il permet la détection de QTL qui interagissent ou non avec l'environnement quand la population en ségrégation est étudiée dans plusieurs environnements. L'analyse est basée sur la cartographie d'intervalle simple (Simple

Interval Mapping) incluant un test QTL x E et l'utilisation de coefficients de régression partielle provenant de marqueurs utilisés comme cofacteurs pour contrôler la variance génétique de QTL non ciblés. La cartographie d'intervalle composite simplifiée (simplified Composite Interval Mapping ou sCIM) est utilisée pour améliorer la précision de la position des QTL. Les données des caractères agronomiques de M99plu et M99ir n'ont pas été incluses pour cette détection. Les résultats sont en cours d'analyse.

Caractères liés au statut hydrique et à l'ajustement osmotique

Le dispositif expérimental utilisé en conditions contrôlées a permis la détection de QTL à partir de blocs isolés, de plusieurs blocs ou de l'ensemble des blocs (moyennes brutes ou ajustées par régression des effets bloc et pot (bloc)). Quel que soit le lot de données utilisé, la distribution des caractères était continue. La gamme de variation était plus importante à 14 % CC qu'à 100 % CC. Par exemple, $\psi\pi$ variait de - 4,40 à - 0,36 MPa à 14 % CC et de - 2,42 à - 0,84 MPa à 100 % CC. À 14 % CC, les valeurs des caractères étaient plus faibles par rapport aux plantes témoins, à l'exception de CSS où la concentration moyenne était de 9,51 mg/g de matière fraîche sous stress, contre 2,33 à 100 % CC. L'analyse QTL a montré l'intérêt du dispositif expérimental. Les moyennes ajustées ont permis la détection de QTL représentatifs de l'ensemble de l'expérimentation en éliminant une partie des effets environnementaux.

Parmi l'ensemble des QTL détectés, des régions ont été sélectionnées en fonction de leur consistance statistique et de leur valeur physiologique (QTL synténiques ou regroupés, pertinence des critères, co-localisations avec des gènes candidats). Un nombre important de QTL a été identifié en situation de déficit hydrique du sol par rapport au traitement irrigué. Certaines régions n'étaient détectées que sous déficit hydrique (chromosomes 7HS, 4HL, 1HS, 6HL et 5HS). Parmi celles-ci, deux agissaient en épistasie pour la TRE (7HS et 6HL) (Teulat *et al.*, 1998). Pour ces QTL détectés à 14 % CC, il est souvent difficile de savoir s'ils contrôlent une réponse au stress hydrique, la variation venant d'une déshydratation des tissus, ou s'ils sont réelle-

ment impliqués dans la réponse adaptative, la variation venant d'une accumulation active de solutés, ou les deux. Des QTL contrôlant certains caractères comme $\psi\pi100$ ou CSS100, CSS à turgescence maximale calculé sur le même principe que $\psi\pi100$, mesurés sur les plantes irriguées, pourraient avoir un impact physiologique par une adaptation « constitutive » au déficit hydrique (chromosomes 4HS, 1HL et 5H proche du centromère). Les régions des chromosomes 7HL, 2H et 1HL étaient communes aux deux traitements hydriques. Enfin, des QTL contrôlant l'AO calculé à 100 % de la TRE ont été cartographiés sur les chromosomes 4HL, 6HL et 5HS.

Relation entre la teneur relative en eau et des paramètres de la croissance

L'approche QTL a permis d'identifier les bases génétiques de relations observées dans des études physiologiques, notamment entre la TRE, relative à l'état hydrique de la plante et la croissance. Une corrélation phénotypique et génétique négative a été trouvée entre la TRE et le nombre de feuilles, quelles que soient les conditions hydriques (Teulat *et al.*, 1997 b). De plus, des QTL cartographiés sur les régions 7HS et 7HL, contrôlent à la fois la TRE et le nombre de feuilles. Lockhart (1965) a montré qu'un changement dans la pression de turgescence peut avoir une influence directe sur la croissance cellulaire. Les QTL pour chaque caractère ont des effets allèles de signes contraires pouvant expliquer cette relation (Teulat *et al.*, 1997 b). Les co-localisations de QTL procurent également un supplément d'information sur l'existence potentielle de relations entre caractères. Par exemple, une co-localisation de QTL contrôlant la contribution de l'accumulation de solutés à l'AO, calculé selon Ludlow *et al.* (1983), et CSS sur le chromosome 2H, appuie le rôle potentiel des sucres solubles dans l'AO. Cependant, des QTL spécifiques à chacun des caractères ont également été identifiés.

QTL de caractères mesurés au champ

De nombreux QTL ont été identifiés. Certains sont spécifiques d'un environnement mais plusieurs sont communs à 2, 3 ou aux 4 envi-

ronnements. Le QTL le plus important trouvé pour le rendement en grains, en analysant la moyenne ajustée de tous les environnements, a été localisé sur le chromosome 7HL. L'analyse avec MQTL a permis de trouver de nombreux QTL n'interagissant pas avec l'environnement. Les plus consistants ont été identifiés pour le nombre de grains par épis (chromosome 3H) et pour la hauteur (chromosomes 3H et 6H). Un QTL a été détecté pour $\delta^{13}\text{C}$ sur le chromosome 2H pour G96. En général, les QTL identifiés pour les conditions irriguées (M97i) étaient plus nombreux et avaient une probabilité d'existence (LOD-score) plus élevée en comparant avec ceux identifiés pour les conditions pluviales (M97p). Des QTL impliqués dans la variation de la date d'épiaison ont été trouvés pour M95, M97plu et M97ir ; cependant, aucun n'a été retrouvé en tenant compte de la variation environnementale (moyennes ajustées ou analyse avec MQTL). Concernant la teneur en chlorophylle totale, des QTL consistants et stables ont été identifiés sur les chromosomes 7H, 2H, 6H et 5H (This *et al.*, 2000). Deux de ces QTL (7H et 6H) ont été également détectés pour le traitement avec déficit hydrique de l'expérience en conditions contrôlées (This *et al.*, 2000) et ce, malgré des conditions environnementales et un stade de développement différents. Le QTL du chromosome 5H est également trouvé dans le traitement témoin (100 % CC). Concernant la région du chromosome 2H, un QTL commun aux deux humidités du sol a été mis en évidence dans l'expérience en conditions contrôlées, mais distant génétiquement de celui trouvé pour les essais au champ.

Plusieurs régions chromosomiques ont influencé plus d'un caractère. Dans ce cas, les paramètres correspondants étaient corrélés. Cependant, des QTL isolés ont également été trouvés.

Validation des QTL identifiés

L'inconvénient majeur d'une étude QTL est que les QTL détectés peuvent être spécifiques de l'environnement mais aussi du fonds génétique étudié. C'est pourquoi il est nécessaire de répéter les mesures dans plusieurs environnements et dans d'autres matériels génétiques.

QTL liés au statut hydrique et à l'ajustement osmotique

L'essai réalisé au champ en 1999 a permis l'identification à ce jour, de QTL pour la TRE, le $\psi\pi$, le $\psi\pi100$ et la concentration en saccharose. Aucun QTL pour l'AO calculé n'a été identifié. Ceci est en accord avec Morgan (1995) qui préconise l'utilisation de conditions contrôlées pour mesurer ce caractère de façon optimale. Cependant, ces premiers résultats : i) montrent qu'il est possible d'identifier des QTL pour des caractères difficiles à évaluer au champ comme les caractères du statut hydrique ; ii) confirment l'implication de plusieurs régions dans le contrôle des caractères liés à l'AO chez l'orge. Enfin, malgré leur faible nombre, tous les QTL trouvés pour les conditions agricoles avaient été préalablement identifiés pour les conditions contrôlées : un locus sur les chromosomes 2H et 6H, deux locus sur le 1H et sur le 5H. Ceci confirme la valeur globale de ces QTL dans le fonds génétique étudié.

Comme pour les conditions contrôlées, un plus grand nombre de QTL ont été trouvés pour les conditions de stress. La figure 2 montre l'exemple du chromosome 6HL où plusieurs QTL ont été identifiés à 14 % CC en conditions contrôlées. Deux QTL identifiés en conditions pluviales au champ sont localisés dans la même région. On peut noter la présence de deux locus de déhydrines dans cette région du chromosome 6H, en accord avec d'autres observations de ce type (Campbell *et al.*, 1997).

Co-localisation de QTL de caractères physiologiques adaptatifs et de performance agronomique

Des comparaisons de localisation de QTL montrent que parmi les QTL « stables » identifiés pour les caractères liés au statut hydrique, au moins trois sont communs à des QTL pour des caractères agronomiques. Sur le chromosome 6H, présentant des QTL pour $\psi\pi$ et $\psi\pi100$ au champ et en conditions contrôlées, un QTL pour le poids de 1000 grains a été identifié. Sur le chromosome 1H, un QTL contrôlant la TRE dans les deux conditions expérimentales est co-

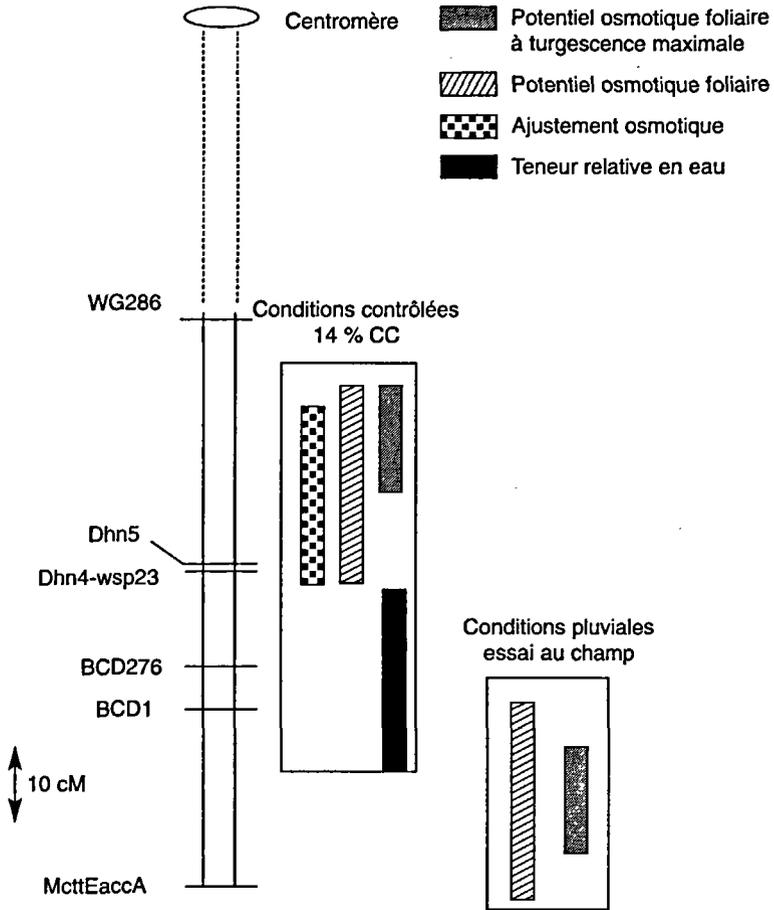


Figure 2
Portion du bras long du chromosome 6H où plusieurs QTL contrôlant des caractères du statut hydrique et liés à l'ajustement osmotique ont été identifiés à 14 %CC en chambre de culture et en conditions pluviales au champ.

localisé avec un QTL pour le nombre de grains par épi. Aucun QTL stable pour le rendement n'a été détecté sur le chromosome 2H au niveau d'un groupe de QTL contrôlant la concentration en sucres solubles et $\psi\pi_{100}$. Cependant, un QTL pour la composition isotopique du carbone a été identifié dans cette région chromosomique. Les données de composition isotopique du carbone et les données

agronomiques qui seront obtenues à partir de l'essai M99 et d'un essai conduit à l'ENA de Meknès au Maroc en 2000 seront particulièrement intéressantes pour vérifier cette co-localisation.

Recherche de QTL stables pour la performance agronomique

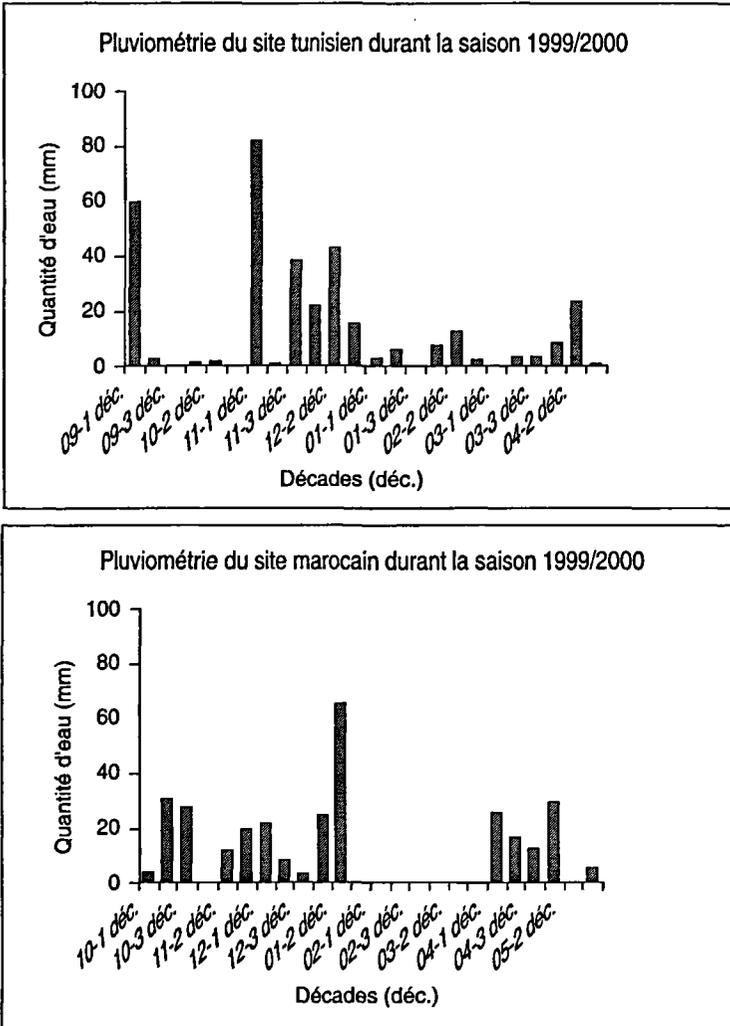
La recherche de QTL doit être élargie à d'autres sites représentatifs du climat méditerranéen et à d'autres populations en ségrégation pour vérifier ou identifier des régions chromosomiques stables impliquées dans la tolérance à la sécheresse chez l'orge. Ceci est réalisé actuellement dans le cadre d'un projet européen (Inco/DC) dont l'objectif général est d'utiliser les technologies moléculaires pour améliorer la tolérance à la sécheresse et la résistance à l'oïdium et pour obtenir des rendements stables chez des orges méditerranéennes. Des essais multiloceaux dans trois sites d'Afrique du Nord (Égypte, Tunisie et Maroc), sur deux ans (2000 et 2001) permettront d'identifier les QTL stables pour le rendement et ses composantes, ainsi que pour quelques caractères morpho-physiologiques (Forster *et al.*, 2000). Lors de la campagne 2001, deux populations en ségrégation supplémentaires seront également testées pour les mêmes caractères. Ces populations ont comme parent tolérant des orges sauvages (*Hordeum spontaneum*), ce qui permettra de valider les résultats obtenus sur la population Tadmor x Er/Apm sur d'autres fonds génétiques, et de comparer l'efficacité de trois approches de sélection moléculaire, basées sur des différences au niveau des lignées donneuses de gènes de tolérance (orges sauvages ou variété locale). Une mesure de l'état hydrique du sol à différents stades phénologiques des génotypes parents ainsi que le suivi des conditions météorologiques devraient permettre d'expliquer les différences entre chaque site.

Pour l'essai 2000, 3 répétitions de 188 lignées et variétés (la population de LR du croisement Tadmor x Er/Apm, Tadmor et Er/Apm ainsi que quelques lignées haploïdes doublés et des variétés locales de chaque pays) ont été cultivées en plein champ à Gizée (Égypte), au Kef (Tunisie) et à Meknès (Maroc). Pour l'ensemble des sites, les mesures réalisées sont le nombre de plantes par m², le nombre de

talles par m², les dates d'épiaison, d'anthèse, la surface foliaire, le poids spécifique de la feuille drapeau et les composantes du rendement. L'essai tunisien a été installé en conditions pluviales à la station expérimentale de l'Inra de Tunisie (Inrat) au Kef. Cette région située au nord-ouest de la Tunisie, à 180 km de Tunis, est caractérisée par un microclimat de type semi-aride supérieur à hivers froids. La pluviométrie faible variant de 200 à 600 mm de pluie selon les années, est irrégulièrement répartie. L'écart des températures est important : en moyenne 1,6 °C pour le mois de janvier et 34,2 °C pour le mois de juillet. L'essai marocain a été conduit à la station expérimentale de l'ENA à Meknès, qui se situe dans la zone bour favorable, caractérisée par un hiver froid et pluvieux et un été chaud et sec. La pluviométrie annuelle moyenne de 500 mm est en faveur de la céréaliculture. Toutefois, au cours de la campagne 2000, la sécheresse s'est pratiquement installée dès la levée et a duré plus de 70 jours. Grâce à un apport en eau par irrigation manuelle, le cycle de la culture a été achevé : deux irrigations ont été réalisées à la fin tallage (17 au 27 février 00) et à l'épiaison (12-19 mars 00), la quantité apportée étant estimée à 40 mm pour chaque irrigation. Une grande différence sur l'état végétatif des lignées a été observée entre les répétitions, due à l'écart de quelques jours entre les irrigations. La figure 3 montre l'évolution de la pluviométrie pour les sites tunisien et marocains pour la saison 1999/2000.

■ L'orge : une espèce relais

Les QTL identifiés dans notre étude ont été comparés à ceux décrits dans plusieurs espèces de céréales proches : blé, riz et maïs. Une zone impliquée dans la variation de plusieurs paramètres du statut hydrique et de l'AO sur le chromosome 7HS s'est avérée colinéaire à une portion du chromosome 8 du riz. C'est dans cette région que le QTL majeur impliqué dans l'AO à 70% de la TRE, ainsi que des QTL impliqués dans l'enroulement foliaire et de nombreux critères racinaires sous stress ont été cartographiés chez le riz (Lilley *et al.*, 1996) (fig. 4). Le gène *or* contrôlant l'osmorégulation chez le blé est situé sur



■ Figure 3
Évolution de la pluviométrie sur les sites tunisien et marocain durant la période de culture 1999/2000 jusqu'au mois d'avril 2000.

le bras homéologue à l'orge, sur le chromosome 7AS (Morgan, 1991; Morgan et Tan, 1996), mais plus éloigné du centromère que chez l'orge. Cette région pourrait correspondre à une portion du chromosome 6 du riz. La région centromérique du chromosome 2H contrôle

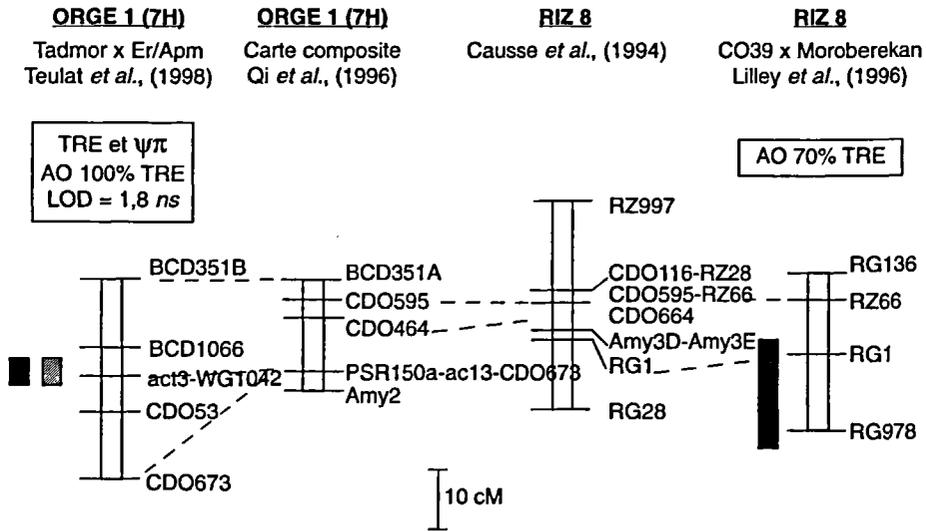


Figure 4
Cartographie comparée d'une région chromosomique contrôlant la variation de deux caractères liés à l'ajustement osmotique chez l'orge et de l'ajustement osmotique à une teneur relative en eau de 70 % chez le riz. Les caractères ont été mesurés sous déficit hydrique dans les deux espèces.

la variation de $\psi_{\pi 100}$ et de CSS sous stress dans notre étude, mais aussi le ψ_{π} létal sur le chromosome 7 (proche de CDO588) du riz (Lilley et al., 1996) et la somme de fructose + glucose sur une portion du chromosome 10 (proche de CDO1417) du maïs (Pelleschi et al., 1999).

Ces relations de synténie entre QTL, si elles se confirmaient, auraient des répercussions importantes en terme de physiologie comparée des céréales, et justifieraient donc une investigation plus poussée. Une comparaison génomique plus précise des régions entre les différentes céréales devrait permettre d'étudier la conservation des QTL entre différentes espèces, et d'identifier les séquences d'ADN et le polymorphisme sous-jacents (This et Teulat-Merah, 1999). Le riz peut dans cette approche servir de modèle pour la recherche de gènes, du fait de son petit génome (Gale et Devos, 2000). Toutefois, des différences existent entre le riz et les Triticées notamment le blé dur. Ces espèces ne sont pas cultivées dans les mêmes régions géographiques.

C'est pourquoi, surtout pour l'adaptation, le riz n'est pas forcément un modèle biologique idéal, où des informations peuvent être utilisées pour améliorer l'orge et le blé dur. Une étude bibliographique de Hay et Ellis (1998) souligne par exemple, que bien que des gènes de sensibilité à la vernalisation soient communs entre orge, blé et seigle (*Triticées*), une vernalisation par faible température n'est pas nécessaire pour la floraison du riz, la cartographie comparée de ce caractère offre donc peu d'intérêt pour l'instant. Enfin, le passage direct des comparaisons synténiques entre le modèle riz et le blé pose parfois quelques difficultés (Feuillet et Keller, 1999). L'orge peut donc être considérée comme espèce relais non seulement pour des études appliquées, mais aussi plus fondamentales en biologie des stress environnementaux et en génétique moléculaire.

Remerciements

Le travail présenté dans cet article a été financé par le ministère français de l'Agriculture et de la Pêche, au travers de la Direction générale de l'enseignement et de la recherche, par l'Inra, par la Communauté européenne sous la forme d'un programme Inco/DC IC18-CT98-0.311, et bénéficie d'une collaboration bilatérale franco-marocaine Prad n°00-16. Les auteurs tiennent à remercier l'excellent appui technique de C. Borries et I. Souyris, et l'ensemble des étudiants (particulièrement S. François et B. Rotter) ainsi que les autres instituts français (Inra Clermont-Ferrand, IBP Orsay) et étrangers (Cida Grenade, Cimmyt, Icarda, Scri Dundee, université de Bologne, FCRI Le Caire) qui ont contribué à la réalisation de ce projet.

Bibliographie

Acevedo E 1993 — Potential of carbon isotope discrimination as a selection criterion in barley breeding. *In* Stables isotopes and Plant Carbon-Water Relations. J Ehleringer, A Hall, G Farquahar Eds. 399-417.

Borel C, Simmoneau T, This D, Tardieu F 1997 —

Stomatal conductance and ABA concentration in the xylem sap of barley lines of contrasting genetic origins. *Aust J Plant Physiol* 24: 607-615.

Campbell S, Close T 1997 — Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New Phytol* 137: 61-74.

- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD 1994 — Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Deleens E, Barthes L, Hannachi L, Bousser A, Casabianca H, James H, Bigois M, Gate P, Vignier L, Bouthier A 1994 — Un nouvel outil : l'analyse de la composition isotopique. *Perspectives agricoles* 190 : 108-122.
- Feuillet C, Keller B 1999 — High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8265-8270.
- Forster B, Ellis R, Newton A, Tuberosa R, This D, El-Gamal A, Bahri H, Ben Salem M 1999 — Molecular breeding of barley for droughted low input agricultural conditions. *In Plant nutrition - Molecular biology and genetics*. G Gissel-Nielsen et A Jensen Eds. Kluwer Academic publishers Dordrecht Boston London, 359-363.
- Forster B, Ellis R, Thomas W, Newton A, Tuberosa R, This D, El-Enein R, Bahri H, Ben Salem M 2000 — The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *J Exp Bot* 51: 19-27.
- Francois S 1999 — Tolérance à la sécheresse et métabolisme des sucres chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) Mémoire de DAA de l'Institut national agronomique Paris-Grignon 35 p.
- Gale M, Devos K 1998 — Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1971-1974.
- Hay RKM, Ellis RP 1998 — The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. *Ann Bot* 82: 541-554.
- Jones MM, Turner NC, Osmond CD 1981 — Mechanisms of drought resistance. *In The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. LG Palegg, D Aspinall Eds. New York. Academic Press, 15-37.
- Lander ES, Botstein D 1989 — Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L 1987 — Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lewicki S 1993 — Evaluation de paramètres liés à l'état hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf) et l'orge (*Hordeum vulgare* L.) soumis à un déficit hydrique modéré, en vue d'une application à la sélection de génotypes tolérants. Thèse de doctorat, Ensa-Montpellier, 87 p.
- Lilley J, Ludlow M, McCouch S, O'Toole J 1996 — Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* 47: 1427-1436.
- Lockhart JA 1965 — An analysis of irreversible plant cell elongation. *J Theoret Biol* 8: 264-275.
- Ludlow M, Chu A, Clements R, Kerslake R 1983 — Adaptation of species of centrosema to water stress. *Aust J Plant Physiol* 10: 119-130.

- Merah O 1999 —
Utilisation de la discrimination isotopique du carbone pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) dans les régions méditerranéennes. Thèse de doctorat, Ensa-Rennes, 172 p.
- Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD 1995 —
Grasses, line up and form a circle. *Curr Biol* 5: 727-739.
- Morgan JM 1983 —
Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *Aust J Agric Res.* 34: 607-614.
- Morgan JM 1995 —
Growth and yield of wheat lines with differing osmoregulative capacity at soil water deficit in seasons of varying evaporative demand. *Field Crops Res* 40: 143-152.
- Morgan JM 1991 —
A gene controlling differences in osmoregulation in wheat. *Aust J Plant Physiol.* 18: 249-257.
- Morgan JM, Tan MK 1996 —
Chromosomal location of a wheat osmoregulation gene using RFLP analysis. *Aust J Plant Physiol.* 23: 803-806.
- Nelson J 1997 —
QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding* 3: 239-245.
- Pelleschi S, Guy S., Kim JY, Pointe C, Mahe A, Barthes L, Leonardi A, Prioul JL 1999 —
Ivr2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol Biol* 39: 373-380.
- Qi X, Stam P, Lindhout P 1996 —
Comparison and integration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-394.
- Rekika D 1997 —
Identification et analyse génétique des caractères physiologiques liés au rendement en conditions de sécheresse chez le blé dur. Intérêt potentiel des espèces sauvages apparentées pour l'amélioration de ces caractères. Thèse de doctorat, Ensa-Montpellier, 158 p.
- Tardy F, Creach A, Havaux M 1998 —
Photosynthetic pigment concentration, organization and interconversions in a pale green Syrian landrace of barley (*Hordeum vulgare* L., Tadmor). *Plant Cell Environ* 21: 479-489.
- Teulat B 1997 —
Recherche de marqueurs moléculaires liés à la tolérance au déficit hydrique chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.). Thèse de doctorat, Ensa-Montpellier, 191 p.
- Teulat B, Rekika D, Nachit M, Monneveux P 1997 a —
Comparative osmotic adjustments in barley and tetraploid wheats. *Plant Breeding* 116: 519-523.
- Teulat B, Monneveux P, Wery J, Borries C, Souyris I, Charrier A, This D 1997 b —
Relationships between relative water content and growth parameters in barley: a QTL study. *New Phytol* 137: 99-107.
- Teulat B, This D, Khairallah M, Borries C, Ragot C, Sourdille P, Leroy P, Monneveux P, Charrier A 1998 —
Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 96: 688-698.
- This D, Teulat-Merah B 1999 —
Towards a comparative genomics of drought tolerance in cereals: lessons from a QTL analysis in barley. International workshop-CIMMYT Mexico June 21-25 1999. (<http://www.cimmyt.mx/Research/ABC/>).

- This D, Borries C, Souyris I, Teulat B 2000 — QTL study of chlorophyll content as a genetic parameter of drought tolerance in barley. *Barley Genet News B Genet Newsletter* 30 (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgrn/30/dt2_2.htm).
- Tinker N, Mather D 1995 — Software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *J Quant Trait Loci* (<http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqt/2>).
- Turner NC 1979 — Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. *In Stress physiology of crop plants*. H Mussel, RC Staples Eds. New York, Wiley interscience, 343-372.
- Turner N 1986 — Adaptation to water deficit: a changing perspective. *Aust J Plant Physiol* 13: 175-190.
- Turner N 1997 — Further progress in crop water relations. *Advances in Agronomy* 58: 293-338.
- Turner N, Jones M 1980 — Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. *In Adaptation of plants to water and high temperature stress*, N Turner et P Kramer eds, Wiley, New York, 87-107.
- Van Oosterom E, Acevedo E 1992 — Adaptation of barley (*Hordeum vulgare* L.) to harsh Mediterranean environments. *Euphytica* 62: 1-14.
- Watanabe N, Naruse J, Austin R, Morgan C 1995 — Variation in Thylakoid proteins and photosynthesis in Syrian landraces of barley. *Euphytica* 82: 213-220.
- Wilson J, Fisher M, Scultze E, Dolby G, Ludlow M 1979 — Comparison between pressure volume and dew point-hygrometry techniques for determining water relation characteristics of grass and legume leaves. *Oecologia* 41: 77-88.