

République Algérienne Démocratique et Populaire

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

*Université des Frères Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département d'Ecologie et de Biologie Végétale.*

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat es Science en Biologie

Spécialité: Biologie et Physiologie Végétales

Option: Génétique et Amélioration des Plantes

Thème

***Identification de marqueurs physiologiques de la tolérance à
la sécheresse chez le tournesol (*Helianthus annuus L.*)***

Présentée par :

NOURI Lilya

Soutenue le 2010/2011

Devant le jury :

Président : D^F BENSARI M. Professeur , Université Mentouri,Constantine.

Encadreur : D^F YKHLEF N. Professeur, Université Mentouri, Constantine.

**Co-Encadreur : D^F SARRAFI A. Professeur, Institut National Polytechnique, Ecole Nationale
Supérieure d'Agronomie, Toulouse.**

Examineurs : D^F BOUZERZOUR H. Professeur, Université Farhat Abas, Sétif.

D^F BENMOHAMMED A. Maître de Conférence,Université Farhat Abas, Sétif.

D^F CHOUGUI S. Maître de Conférence,Université Mentouri,Constantine.

Remerciements

*Je tiens à exprimer ma gratitude à mes responsables de thèse : Mademoiselle **Ykhlef Nadia**, professeur à l'université Mentouri - Constantine, et Monsieur **Sarrafi Ahmed**, professeur à l'Institut National Polytechnique, l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse. Mes vifs remerciements vont à eux de m'avoir permis de réaliser ce travail respectivement au niveau du laboratoire d'amélioration des plantes de l'université Mentouri de Constantine et au laboratoire de Biotechnologie et amélioration des plantes de l'INP, ENSA de Toulouse. Pour leurs encouragements, leurs aides inconditionnelles et enfin pour leur confiance qu'ils m'ont constamment témoignée. Leurs remarques et conseils qui ont été d'un apport précieux et considérable pour l'aboutissement de ce travail.*

Ma gratitude va tout spécialement à Monsieur Djekoune Abdelhamid, professeur à l'université Mentouri, actuellement Recteur de l'Université Mentouri – Constantine, de m'avoir reçu dans le laboratoire d'amélioration des plantes dont il est le directeur de recherche et à Monsieur Grieu Philippe, Professeur à l'INP, ENSA de Toulouse, de m'avoir reçu au laboratoire d'Agronomie et écophysiologie végétale de l'INP ENSA de Toulouse dont il est directeur de recherche.

J'adresse des remerciements tous spéciaux à Monsieur Maury Pierre, Maître de Conférence à l'INP, ENSA de Toulouse, pour son amabilité, sa disponibilité et son aide inconditionnelle et grâce à qui, ce travail a pu aboutir aussi bien sur le plan pratique que théorique, qu'il trouve ici ma reconnaissance la plus sincère.

Je remercie vivement Monsieur Bensari Mourad, professeur à l'université Mentouri – Constantine, d'avoir accepté de juger ce travail et qui m'a fait l'honneur de présider le jury de soutenance de cette thèse.

Mes vifs remerciements vont également à Messieurs Bouzerzour Hamma et Benmohammed Amar respectivement professeur et maître de conférence à l'Université Farhat Abas de Sétif et à madame Chougui Saida maître de conférence à l'université Mentouri – Constantine, d'avoir accepté aussi de juger ce travail et de se joindre au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement et tout particulièrement Monsieur Belbekri Nadir, responsable technique du laboratoire GBBV et ingénieur du laboratoire d'Amélioration des Plantes, ainsi que Messieurs Pégot, Bermudess Patrick ainsi que madame Nouvet Patricia, qui font parti du corps technique respectivement du laboratoire de Biotechnologie végétale et amélioration des plantes et d'agronomie et écophysiologie végétale de l'INP – ENSA de Toulouse, pour leur précieuse aide, leur présence et leur soutien permanent, grâce à quoi ce travail a pu être réalisé dans les meilleures conditions.

Je remercie profondément tous mes amis doctorants du laboratoire BAP, pour leurs disponibilités, et leurs grandes aides pour la réalisation de ce travail, ces remerciements sont aussi adressés tout spécialement à monsieur Seifolah Poormohammed Kiani.

Dédicaces

Je dédie cet humble travail en premier lieu à la mémoire de mon très cher père que son âme repose en paix et à ma très chère maman que dieu nous la préserve, je leur dis mission accomplie et le but est atteint. Veuillez accepter mes très chers ce modeste travail comme l'une des récompenses de vos efforts avec moi depuis toujours.

A mes frères et sœurs : Sabry, Lotfi, Sabrina et Lamia.

A mes belles sœurs : Zineb et Neila Baya.

A mon beau frère : Kamel.

A mes très chers neveux: Wassim, Billel, Rami, Abdellah, Oussama, Isslem et le petit dernier Abderrahmène Saad.

A mes très chères nièces : Chaïma, Inès et notre toute petite dernière Aya Anfel.

A tous mes amis et collègues qui m'ont toujours soutenue moralement je spécifie : Alima, Nadia, et Halima. Qu'elles trouvent ici mes remerciements les plus chaleureux et les plus sincères.

Ainsi qu'à tous ceux qui à des titres divers m'ont apporté leur aide et leur sympathie..

Titre: Identification de marqueurs physiologiques de la tolérance à la sécheresse chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.).

Résumé:

La variabilité génétique de traits agro-physiologiques de tolérance à la sécheresse chez le tournesol a été étudiée à partir d'expérimentations, conduites en conditions contrôlées et au champ, réalisées sur des populations exprimant diverses sources de variabilité génétique : des lignées recombinantes (RILs) et des mutants.

Dans un premier temps, les LIRs et leurs parents ont été phénotypés en serre et au champ avec deux traitements hydriques (irrigué et sécheresse). Le phénotypage a porté sur des caractères agronomiques (précocité de la floraison, surface foliaire à la floraison, hauteur des plantes, sénescence, rendement et...). En conditions contrôlées (serre), l'effet du traitement hydrique a été significatif pour la totalité des caractères étudiés, exception faite pour la précocité de floraison et le nombre de feuilles à la floraison. En conditions naturelles (champ), l'effet du stress hydrique a été significatif seulement pour le poids du capitule et le rendement en grains par plantes. Une interaction entre les LIRs et le traitement hydrique a été aussi observée pour la majorité des caractères étudiés pour les deux conditions (serre et champ). Des différences significatives ont été observées, en comparant la moyenne des parents avec celle des 10% des meilleures lignées recombinantes sélectionnées, pour la quasi totalité des caractères étudiés dans les différentes conditions, excepté pour la surface foliaire à la floraison (LAF) en conditions contrôlées pour les plantes bien irriguées. Ce gain génétique significatif traduit une ségrégation transgressive de ces caractères agronomiques. En utilisant la carte génétique développée dans le laboratoire, les QTLs liés à ces caractères ont été identifiés. Plusieurs QTLs pour le rendement en grains par plante (GYP) dans les deux conditions de cultures (serre et champ) et pour les deux types de traitements hydriques ont été identifiés sur différents groupes de liaisons, avec deux QTLs spécifiques à une condition donnée (*GYPN.4.1*, *GYP1.7.1*) et les autres étaient liés avec plusieurs autres caractères morphologiques et agronomiques. Des co-localisations de QTLs pour le rendement en grains par plante et des QTLs de traits adaptatifs liés à la tolérance à la sécheresse ont été identifiés. En effet, sur le groupe de liaison 5, un QTL pour le rendement (*GYPW.5.1*) est lié avec des QTLs associés à l'ajustement osmotique (*OA.5.2*), au potentiel osmotique à pleine turgescence (*OPF.WS.5.2*), au potentiel hydrique foliaire (*LWP.WS.5.1*) et à la teneur relative en eau pour les deux traitements hydriques (*RWC.WW.5.1* et *RWC.WS.5.1*). Un QTL majeur identifié pour l'AO (*OA.5.2*) colocalisé également avec des QTLs détectés pour la surface foliaire et le poids du capitule. Ces différentes colocalisations de QTLs indiquent une base génétique commune pour la tolérance à la sécheresse et les caractères associés au rendement.

Dans un deuxième temps, la variabilité génétique de l'ajustement osmotique et des traits hydriques foliaires associés a été analysée chez une population de mutants (M6). Dans cette population, certains mutants présentent des performances supérieures par rapport à la lignée originelle quant à leurs capacités d'ajustement osmotique. Septs marqueurs moléculaires associés à l'ajustement osmotique ont été identifiés, dont un *E38M62_3* qui explique 17% de la variation phénotypique. Certains marqueurs AFLP sont associés aux traits hydriques analysés dans les deux types de traitements hydriques (marqueurs stables), alors que d'autres sont spécifiques d'un traitement hydrique donné. Ces marqueurs identifiés pourraient être utilisés dans des programmes de sélection assistée par marqueurs pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le tournesol.

Mots clés: Déficit hydrique, Tournesol, *Helianthus annuus*, Variabilité génétique, Caractères agronomiques, Ajustement osmotique, Identification de QTLs.

Title: Identification of physiological markers for drought tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Abstract:

In order to progress in the comprehension of the characters implied in drought tolerance in sunflower, we carried out several experiments. Our materials were two populations of sunflower expressing various sources of genetic variability: Recombinant Inbred lines (RILs) and mutants.

First, a mapping population of sunflower was used to study agronomical traits under greenhouse and field conditions each with two water treatments and three replications. Days from sowing to flowering, leaf number per plants, plant height, plant leaf area at flowering, leaf area duration, total dry matter per plant, head weight and grain yield per plant were measured for recombinant inbred lines (RILs) and their parental lines. In the greenhouse conditions, significant water treatment effect was observed for all of the studied traits except for days from sowing to flowering and the number of leaf per plant. In the field conditions, water stress had significant effect on only head weight and grain yield per plant. 'Water treatment \times RILs' interaction was also observed for most of the traits in both field and greenhouse conditions. Genetic gain (positive transgressive segregation) presented as the differences between the mean of the top 10% selected RILs and the mean of the parents, was significant for some of the traits. Transgressive segregation would be the result of accumulation of positive alleles coming from different parental lines. The percentage of phenotypic variance explained by QTLs (R^2) ranged from 4% to 40%. Several QTLs for grain yield per plant (GYP) under four water treatments were identified on different linkage groups, among which two were specific (*GYPN.4.1*, *GYP1.7.1*) and the rest were overlapped with several other traits. Three QTLs for GYP were also overlapped with several QTLs for drought-adaptive traits. On linkage group 5, a QTL for yield (*GYPW.5.1*) is overlapped with the QTLs for osmotic adjustment (*OA.5.2*), osmotic potential at full turgor (*OPF.WS.5.2*), leaf water potential (*LWP.WS.5.1*) and relative water content under both water treatments (*RWC.WW.5.1* and *RWC.WS.5.1*). This result showed a partly common genetic basis for drought tolerance traits (plant water status and osmotic adjustment) and grain yield in recombinant inbred lines.

Second, we have evaluate the genetic variability for osmotic adjustment-related traits among a population of gamma-induced M6 mutants of sunflower and some molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits are identified. some mutant lines with higher values than the original line were identified for osmotic adjustment-related traits. Marker-trait analysis showed that some AFLP markers were associated with each trait in both water treatments (stable markers) and some others are specific for a given water treatment. Furthermore, some AFLP markers were associated with more than one trait. The identified markers could be used in marker-based selection programmes for improving drought tolerance in sunflower.

Key words: Drought stress, Sunflower, *Helianthus annuus*, Genotypic variability, Agronomical traits, Osmotic adjustment, QTLs identification.

Abréviations

Ψ_s : Potentiel osmotique (osmotic potential).

Ψ_{sFT} ou π_{100} : Potentiel osmotique à pleine turgescence (osmotic potential at full turgor).

Ψ_t : Potentiel de turgescence (turgor potential).

Ψ_w : Potentiel hydrique foliaire (leaf water potential).

BIO : Masse sèche par plante (BIOmass per plant).

DFM : Nombre de jours entre la floraison et la maturité physiologique (Days from Flowering to physiological Maturity).

DSF : Nombre de jours entre le semis et la floraison (Days from Sowing to Flowering).

GG : Gain génétique (Genetic Gain).

GYP : Rendement exprimé par la masse des graines par plante (Grain Yield per Plant).

HW: Masse du capitule (Head Weight).

LAD : Durée de surface foliaire verte en post floraison (Leaf Area Duration).

LAF : Surface foliaire à la floraison (Leaf Area at Flowering).

LN : Le nombre de feuilles par plante à la floraison (Leaf Number).

OA : Ajustement osmotique 'AO'(osmotic adjustment).

PH : Hauteur de la plante à la floraison (Plant Height).

QTL : Quantitative Trait Loci .

RIL ou LIR : Lignées Recombinantes (Recombinant inbred lines).

RWC ou TRE : Teneur en eau relative (relative water content).

SOMMAIRE

pages

1. INTRODUCTION	1
1.1. Le tournesol : les enjeux de cette culture en Algérie	2
1.2. La sécheresse : une contrainte majeure en Algérie	5
1.3. Objectif de la thèse	6
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
2.1. Le tournesol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	9
2.1.1. Des graines valorisées dans des filières alimentaires et non alimentaires	9
2.1.2. Classification botanique	10
2.1.3. Domestication et sélection	11
2.1.3.1. La domestication de l'espèce en Amérique du Nord	11
2.1.3.2. L'introduction du tournesol en Europe au XVI ^{ème} siècle	11
2.1.3.3. La sélection variétale	12
2.1.4. Description morphologique de la plante	12
2.1.4.1. Le système racinaire	12
2.1.4.2. La partie aérienne	13
2.1.4.3. L'appareil reproducteur	13
2.1.4.4. La graine	14
2.1.5. Cycle de développement	14
2.1.5.1. Phase Semis – Levée	14
2.1.5.2. Phase Levée – Stade 4-5 paires de feuilles	15
2.1.5.3. Stade bouton floral – Début de Floraison	15
2.1.5.4. Floraison	17
2.1.5.5. Maturation	18
2.2. Effets de la sécheresse et réponses adaptatives des plantes	18
2.2.1. Effet de la sécheresse sur la plante	18
2.2.1.1. Rendement en condition de sécheresse	18
2.2.1.2. Effets de la sécheresse sur la surface assimilatrice	19
2.2.1.3. Effets de la sécheresse sur le fonctionnement photosynthétique	20
2.2.2. Réponses adaptatives des plantes	21
2.2.2.1. Esquiver la sécheresse	22
2.2.2.2. Eviter la sécheresse	22
2.2.2.3. Tolérer la sécheresse et rôle de l'ajustement osmotique	23
2.3. Amélioration génétique du tournesol et méthodes d'analyse génétique	26
2.3.1. Marquage moléculaire	27
2.3.1.1. Marqueurs RFLP	28
2.3.1.2. Marqueurs de type PCR	28
2.3.2. La carte génétique	29
2.3.3. Analyse de la variabilité génétique et identification de QTLs	30
2.3.3.1. Analyse de la variabilité génétique	30
2.3.3.2. Identification de QTLs	32
3. MATERIEL ET METHODES	36
3.1. Matériel végétal	36
3.1.1. La population de lignées recombinantes (RILs)	36

3.1.2.	La population de mutants (M6)	36
3.2.	Conditions de culture et dispositif expérimental	37
3.2.1.	Cas des LIRs	37
3.2.1.1.	Culture en conditions contrôlées (serre)	37
3.2.1.2.	Culture en conditions naturelles (champ)	37
3.2.2.	Cas des mutants	38
3.2.2.1.	Culture en conditions naturelles (toit roulant)	38
3.3.	Paramètres étudiés	39
3.3.1.	Caractères morphologiques et agronomiques	39
3.3.1.1.	Caractères du développement (phénologie)	39
3.3.1.2.	Caractères de la croissance	39
3.3.2.	Paramètres de l'état hydrique des plantes	42
3.3.2.1.	Teneur en eau relative foliaire	42
3.3.2.2.	Potentiel hydrique foliaire	43
3.3.2.3.	Potentiel osmotique (Ψ_{π})	44
3.3.2.4.	Pression de turgescence	46
3.3.2.5.	Ajustement osmotique	46
3.4.	Méthodes d'analyse génétique	47
3.4.1.	Variabilité génétique et gain génétique	47
3.4.2.	Détection des QTLs pour les LIR	47
3.4.3.	Identification de marqueurs individuels	48
4.	VARIABILITE GENETIQUE ET IDENTIFICATION DE QTLs LIES A DES CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET AGRONOMIQUES CHEZ LE TOURNESOL SOUS DIFFERENTS TRAITEMENTS HYDRIQUES.....	49
4.1.	Introduction	50
4.2.	Synthèse des résultats et discussion	65
4.2.1.	Variation phénotypique et effet du stress hydrique	65
4.2.2.	Variabilité génétique et héritabilité des caractères morphologiques et agronomiques	64
4.2.3.	Corrélations phénotypiques et identification des caractères corrélés au rendement en grains ...	68
4.2.4.	Identification des QTLs	68
5.	VARIABILITE GENETIQUE ET IDENTIFICATION DE MARQUEURS MOLECULAIRES DE L'AJUSTEMENT OSMOTIQUE ET LES CARACTERES ASSOCIES CHEZ DES MUTANTS DE TOURNESOL (<i>HELIANTHUS ANNUUS L.</i>) EN CONDITIONS DE SECHERESSE	73
5.1.	Introduction	74
5.2.	Synthèse des résultats et discussion	94
5.2.1.	Variabilité génétique de l'ajustement osmotique et des caractères hydriques associés	94
5.2.2.	Identification de marqueurs individuels pour l'ajustement osmotique et les paramètres hydriques associés	95
6.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	98

6.1.	Variations phénotypiques des caractères morphologiques et agronomiques chez le tournesol	98
6.2.	Les régions chromosomiques d'intérêt pour le rendement et ses composantes chez le tournesol	99
6.3.	Comparaison des QTLs des caractères agronomiques avec ceux des caractères associés à la tolérance à la sécheresse	101
6.4.	Variabilité génétique et identification de marqueurs moléculaires pour l'ajustement osmotique et les paramètres hydriques associés chez une population de mutants de tournesol	102
6.5.	Perspectives	105
7.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	109

Introduction

1. Introduction

1.1. *Le tournesol : les enjeux de cette culture en Algérie*

Avec une production mondiale oscillant autour de 32 millions de tonnes, et un rendement moyen de l'ordre de 12 q/ha, le tournesol est l'une des grandes espèces oléagineuses de la planète (Bover, 2009). Les atouts internationaux de l'espèce sont sa richesse en huile, sa résistance à la sécheresse et plus généralement son faible besoin en intrants. En 2007, les principaux pays producteurs ont été l'Union Européenne (15.2 millions de tonnes), la Russie (5.6 millions de tonnes) et l'Argentine (3.5 millions de tonnes) (<http://www.sunflowernsa.com>). La demande mondiale sur le marché des graines oléagineuses et des huiles est forte. Le tournesol y tient une part essentielle puisqu'il représente 10% de la production des graines et 12% de la production d'huile; la première culture oléo-protéagineuse étant le soja avec plus de 50% de la production mondiale (Bover, 2009). Au sein de l'Union Européenne, la France produit 1.4 million de tonnes de graines de tournesol (<http://www.faostat.fao.org/>). Le rendement moyen en France est le plus élevé de tous les pays grands producteurs de tournesol (25.7 q/ha vs 12.6 en 2007). Le tournesol est d'abord cultivé pour ses graines, qui représentent l'une des plus importantes sources d'huiles alimentaires au monde. La teneur en huile des graines de tournesol est voisine de 45%.

Plus de 147 millions de tonnes de la production mondiale d'huiles végétales est échangée sur le marché international (<http://www.fao.org> ; Banassi, 2009). Le palme, et le soja sont les deux produits leaders, mais ils ne représentent ensemble que 60% du total. Il reste donc une place importante occupée par les autres produits tels que les huiles de : Coton, Tournesol, Colza, Coco et de Palmiste (Hachemi, 2006). La production mondiale d'huile de palme, qui a connu une véritable explosion au cours des 20 dernières années, dépasse 20 millions de tonnes et est très fortement concentrée sur deux pays: la Malaisie (51% de l'offre mondiale) et

l'Indonésie (31%). L'ensemble des autres pays du monde, y compris l'Afrique, qui était le berceau de cette culture, représente aujourd'hui moins de 4 millions de tonnes (Benassi et Labonne, 2004).

Les principaux exportateurs mondiaux de l'huile de palme sont la Malaisie, l'Argentine et l'Indonésie, qui arrivent loin devant les Etats Unis. Même si l'UE, les Etats-Unis et les autres pays développés assurent certains achats, ce commerce est largement destiné aux pays très peuplés d'Asie (Inde, Chine, Pakistan, etc.) et d'Afrique (surtout d'Afrique du Nord. avec l'Egypte, l'Algérie et le Maroc) (Benassi et Labonne, 2004).

En effet, les pays du Maghreb : le Maroc, l'Algérie et la Tunisie connaissent un important déficit en huiles alimentaires et tourteaux. La situation de dépendance par rapport au marché international et la perspective de voir s'accroître la facture des huiles et des tourteaux, mobilisent l'attention des trois états du Maghreb dont les politiques semblent sur certains points converger. Ces politiques s'appuient sur une stratégie de sécurité alimentaire qui va au-delà de la recherche de la simple substitution d'importations ; en fait, elles recherchent des gains de productivité et la spécialisation. Ainsi, les trois états encouragent une meilleure maîtrise technique dans les meilleures localisations, pour le développement aussi bien de l'olivier que des cultures de graines oléagineuses (tournesol essentiellement) (Benassi et Labonne, 2004).

La principale huile produite dans les pays du maghreb est l'huile d'olive, dont la Tunisie est un exportateur significatif (6,4 %, de la production mondiale), tandis que la production couvre à peine les besoins en Algérie et au Maroc (Benassi et Labonne, 2004 ; Hachemi, 2006). Ces deux derniers restent fortement dépendants des importations pour alimenter leur marché. En effet, Après les céréales (25%) et le lait (21%), les huiles alimentaires constituent le troisième produit de première nécessité importé par l'Algérie dans une proportion d'environ 12% de l'ensemble de ses importations en denrées alimentaires (Hachemi, 2006). Suite à cette situation,

l'Algérie est l'un des premiers marchés d'huiles de graines oléagineuses du Maghreb avec plus de 500 000 tonnes importées en 2004 tous types d'huiles confondu (Colza : 42252 tonnes ; Palme : 135385 tonnes; Soja : 151925 tonnes et le Tournesol : 233896 tonnes) où on note la nette supériorité de l'huile de tournesol sur le marché Algérien (Bedrani, 2008). La culture des plantes oléagineuses en Algérie n'est pas très développée, en particulier en raison d'un choix variétal peu adapté au regard des conditions climatiques difficiles, seule, la production de l'huile d'olive est devenue traditionnelle.

En Algérie, la consommation totale d'huiles et de graisses s'élève à 486 millions de tonnes d'huiles, 12.000 tonnes de beurre et 42.000 tonnes de margarine (Hales, 2002). La participation des matières grasses dans le bilan énergétique global a évolué fortement depuis l'indépendance, passant de 9,5% en 1963 à 13,3% en 1990 et elle se situe aux environs de 19% en 2004 (Hachemi, 2006). Les huiles de tournesol et d'olive dominent largement le marché algérien, contrairement à l'huile de Soja, également importée, mais qui s'avère moins appréciée par le consommateur algérien (Hales, 2002 ; Benassi et Labonne, 2004).

Les exportations Françaises d'huiles de colza et de tournesol vers l'Algérie dépassent aujourd'hui 50 000 tonnes par an (Bureau, 2003). A cette fin, Agropol, l'organisme de coopération internationale de la Filière Française des Huiles et Protéines Végétales, a signé, en septembre 2002, un accord cadre avec l'Institut Technique Algérien chargé des oléagineux afin de mettre en place un partenariat scientifique et technique pour accompagner le développement des cultures oléagineuses en développant des productions locales de tournesol et de colza. Cet accord visé à la fois à répondre aux importants besoins en huiles de la population algérienne et à diversifier les cultures pour un meilleur équilibre des assolements. Le développement d'une telle filière permettrait de limiter l'exode rural en maintenant les populations jeunes sur des exploitations agricoles compétitives et diversifiées (Bureau, 2003). Par conséquent, le développement de la culture du

tournesol en Algérie permettrait de répondre à des enjeux agronomiques, économiques et même sociétaux .

1.2. La sécheresse : une contrainte majeure en Algérie

La contrainte majeure qui pourrait affecter la production du tournesol en Algérie est la sécheresse; sachant qu'en France le tournesol est cultivé le plus souvent dans des milieux où la ressource en eau est très variable et souvent déficitaire dès la floraison (Flénet, 1994 ; Flénet *et al.*, 1996). La sécheresse est un problème universel qui concerne aussi les pays d'Europe, en effet les diverses perspectives faites dernièrement sur les changements climatiques indiqueraient une forte probabilité d'une augmentation de la température et une aggravation du déficit pluviométrique au sud de l'Europe, où est produit actuellement l'essentiel du tournesol. Cependant, le tournesol présente l'avantage de mieux valoriser l'eau que les autres cultures d'été plus gourmandes en ressources hydriques au moment des grosses chaleurs. En effet, le tournesol présente un système racinaire profond, une forte plasticité du développement foliaire et une capacité photosynthétique élevée (intermédiaire entre les plantes C3 et les plantes C4). En dépit de son bon comportement face à la sécheresse, il subsiste une importante fluctuation inter-annuelle du rendement et de la teneur en huile. Par exemple, le déficit hydrique fortement marqué en 2003 en France a conduit à une diminution du rendement de 3.7 q/ha par rapport à 2002 (20,3q/ha en moyenne en 2003) (Roche *et al.*, 2006).

Cette situation conduit à réfléchir aux voies d'amélioration de la productivité du tournesol dans le cadre de contraintes hydriques plus ou moins marquées (Hamon, 2007). Deux approches complémentaires peuvent être envisagées: l'optimisation de la conduite culturale et la sélection de génotypes tolérants à la sécheresse. Les biotechnologies, notamment le marquage moléculaire, sont des outils désormais incontournables dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent d'affiner la connaissance de la génétique classique par l'établissement de cartes génétiques dans lesquelles sont localisés les QTL

(Quantitative Trait Loci) impliqués dans le contrôle de caractères quantitatifs, comme la qualité des graines et le rendements. Ces QTL sont ensuite repris dans les programmes de Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) pour sélectionner des génotypes d'intérêt. La sélection du tournesol a fourni des variétés résistantes aux principaux pathogènes (mildiou, phomopsis) tout en progressant sur la productivité (Vear *et al.*, 2003).

1.3. Objectif de la thèse

Le travail de thèse visait à évaluer la variabilité génétique pour des caractères agronomiques et physiologiques de tolérance à la sécheresse, et à identifier les zones génomiques (QTLs) impliquées dans le contrôle de ces caractères. L'ajustement osmotique, caractère physiologique de tolérance à la sécheresse a été particulièrement étudié. Ce travail vise également à identifier des marqueurs moléculaires éventuels pour la sélection de génotypes innovants.

Cette thèse a été conduite sur la base d'expérimentations communes (collaboration) avec la thèse de Poormohammad Kiani réalisée dans le laboratoire BAP de l'ENSAT, et a contribué à la réalisation du projet de collaboration « Tassili » 2006-2009, intitulé « Quelles stratégies agronomiques et génétiques pour améliorer la productivité du tournesol » dont les responsables parties Algérienne et Française sont respectivement : professeur YKHLEF N. et le professeur GRIEU P., entre le laboratoire de Biotechnologie Végétale et amélioration des plantes de l'Université des Frères Mentouri de Constantine dirigé par le professeur DJEKOUNE A. et les laboratoires : d'Agronomie et d'Ecophysiologie végétale (Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse) et de Biotechnologie et Amélioration des plantes de l'ENSAT dirigés respectivement par le professeur GRIEU P. et le professeur SARRAFI A..

Le mémoire de thèse est présenté sous la forme de 5 chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique relative au tournesol,

aux effets et réponses des plantes à la sécheresse, ainsi qu'à l'amélioration génétique du tournesol et les méthodes d'analyse génétique utilisées à cette fin.

- Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés .

- Le troisième chapitre traite de la variabilité génétique et de l'identification de QTLs liés à des caractères morphologiques et agronomiques chez des lignées recombinantes soumises à un déficit hydrique dans différents environnements : conditions contrôlées (serre) et naturelles (champ).

- Le quatrième chapitre concerne la variabilité génétique et l'identification de marqueurs moléculaires de caractères physiologiques, comme l'ajustement osmotique et certains paramètres qui lui sont associés chez une population de mutants de tournesol obtenue par irradiation aux rayons gamma soumise à une contrainte hydrique.

- Enfin le mémoire se terminera avec une conclusion ainsi qu'une présentation de quelques perspectives pour ce travail.

CHAPITRE I : Etude Bibliographique

2. Etude bibliographique

2.1. *Le tournesol (Helianthus annuus L.)*

2.1.1. Des graines valorisées dans des filières alimentaires et non alimentaires

Le tournesol présente de nombreuses débouchées, que ce soit dans l'alimentation humaine, animale ou dans la valorisation des sous-produits des industries huilières. Le tournesol est considéré comme la première plante annuelle cultivée spécifiquement pour son huile. La grande diversité de la composition en acides gras de l'huile de tournesol conduit à des utilisations variées, aussi bien en nutrition humaine que dans le domaine non alimentaire. Pour le secteur alimentaire, le développement de variétés de tournesol différemment enrichies en acides gras présente un réel intérêt pour l'alimentation humaine, avec de nombreux effets bénéfiques sur la santé. L'huile de tournesol entre dans la fabrication de margarine, de sauces pour salades et de préparations pour nourrissons. Dans le secteur non alimentaire, l'huile de tournesol peut être utilisée dans le domaine des lubrifiants, le domaine des peintures et biosolvants, des produits cosmétiques ou pharmaceutiques. L'huile de tournesol, comme l'huile de colza, peut être utilisée directement comme agrocarburant dans les moteurs diesel, ou après estérification en ester méthylique. Ces dernières années, l'UE a considérablement augmenté sa production de biocarburants, en particulier de biodiesel, le biocarburant le plus important produit dans l'UE (Benassi, 2009).

A partir de la trituration de la graine entière de tournesol, on obtient ce que l'on appelle du tourteau "pailleux". L'amande de la graine de tournesol est en effet protégée par deux demi enveloppes cellulosiques. La suppression partielle de ces enveloppes par décorticage permet d'obtenir un tourteau moins cellulosique et plus riche en protéines. La composition en cellulose et en protéines des tourteaux de tournesol est très variable, conséquence de la variabilité des origines des graines, de la variété et de la technologie de décorticage. Ainsi, pour le tourteau de type

“pailleux”, la teneur en protéines varie de 21 à 40 % et la teneur en cellulose de 16 à 34 % (Cetiom Octobre 2003 Fiche Technique). Par rapport aux autres tourteaux, le tourteau de tournesol présente l’avantage de ne contenir aucun facteur anti-nutritionnel pouvant limiter son incorporation dans les aliments ou son acceptabilité par les animaux (Cetiom, 2003).

Les teneurs en huile et en protéines ainsi que la composition en acides gras (palmitique, stéarique, oléique et linoléique) sont des critères déterminants pour la valorisation de la production.

2.1.2. Classification botanique

Le tournesol (*Helianthus annuus* L.) est une espèce diploïde ($2n=2x= 34$), originaire d’Amérique du Nord. Il est ramené en Europe au XVIe siècle par les Espagnols (Soltner, 1995).

D'après Chadeaud et Emberger (1960), le tournesol cultivé *Helianthus annuus* L. appartient :

- à l'embranchement des Spermaphytes,
- au sous-embranchement des Angiospermes,
- à la classe des Dicotylédones,
- au phylum des Pariétales-Rhoeadales-Synanthérales,
- à l’ordre des Synanthérales,
- à la famille des Astéracées ou Composées,
- à la sous-famille des Tubuliflores,
- à la tribue des Hélianthés,
- au genre *Helianthus* L.,
- à l'espèce *annuus*.

D'après Schilling et Heiser (1981), le tournesol cultivé *Helianthus annuus* L. appartient au genre *Helianthus* qui renferme 49 espèces, réparties en 4 sections nommées : *Divaricati* (31 espèces), *Helianthus* (11 espèces), *Ciliares* (6 espèces) et *Agrestes* (1 espèce).

2.1.3. Domestication et sélection

Le développement de la culture du tournesol en France est récente. Elle date des années 70 et coïncide avec l'apparition de variétés hybrides F1 par l'utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique (Leclercq, 1969 ; 1970). Cependant, le tournesol, originaire d'Amérique du Nord, y est cultivé depuis plusieurs millénaires.

Nous pouvons distinguer trois étapes dans la domestication du tournesol depuis le néolithique jusqu'à nos jours (Bonjean, 1994).

2.1.3.1. La domestication de l'espèce en Amérique du Nord

Elle a été réalisée par des populations amérindiennes nomades de l'ouest des Etats Unis dès le néolithique (Heiser, 1985). Les principales modifications induites lors de cette domestication concernent l'architecture (à plusieurs capitules à l'origine, on passe à une architecture à capitule unique) et la précocité qui commence à s'uniformiser au sein des populations cultivées.

2.1.3.2. L'introduction du tournesol en Europe au XVI^{ème} siècle

Vers 1510 les Espagnols ramènent des akènes de tournesol du nouveau monde. A cette époque et jusqu'au XIX^{ème} siècle, le tournesol est surtout considéré comme une plante ornementale et est présent un peu partout en Europe (de l'Espagne aux Pays-Bas et de la France à la Russie). Les premières traces importantes d'usages alimentaires apparaissent en Russie. A cette époque, l'église orthodoxe interdit la consommation pendant le carême de nombreuses denrées alimentaires riches en matières grasses dont ne fait pas partie l'huile de tournesol. La population adopte donc la consommation d'huile de tournesol (Bonjean, 1994).

La production s'étend sur 150,000 ha en 1883 et atteint 400,000 ha en 1905. En 1915 il y a environ 900,000 ha, avec un rendement moyen de l'ordre de 4 q/ha et des teneurs en huile qui oscillent entre 15 et 20%. Au début du XX^{ème} siècle, la sélection du tournesol débute en Russie. C'est une sélection massale, initialement empirique puis raisonnée par la suite, basée sur différentes populations de tournesol présentes à cette époque dans le pays. Parmi les acquis de cette sélection citons le

gain de précocité par rapport au matériel de départ qui nécessitait parfois plus de 170 jours pour arriver à maturité. Mais le plus remarquable des acquis reste la teneur en huile qui fut progressivement améliorée : 35% en 1935; 45% en 1955 et jusqu'à 55% pour certaines lignées, en 1965 (Bonjean, 1994).

2.1.3.3. La sélection variétale

Malgré les apports de la sélection russe, les variétés des populations présentes jusqu'aux années 60 restaient assez hétérogènes au niveau du champ. Le tournesol est allogame et supporte mal la consanguinité. La sélection du tournesol nécessitait l'utilisation des structures hybrides pour progresser. Cela fut possible à partir du début des années 60 avec la découverte de la stérilité génique, et surtout de la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique (Leclercq, 1969). Les progrès issus des hybrides F1 ont permis de doubler la production mondiale de tournesol en l'espace de 20 ans (10,9 millions de tonnes en 1969 pour passer à 21 millions de tonnes en 1990). Au cours de ces dernières années, la sélection du tournesol a porté principalement sur la qualité des graines (taux de protéines et d'huile, aptitude au décorticage, qualité de l'huile), la tolérance aux principaux parasites, adaptations environnementales et l'augmentation du rendement. La production mondiale de tournesol s'est élevée à 31.8 MT en 2009 avec un rendement moyen de 12 q/ha (Bover, 2009).

2.1.4. Description morphologique de la plante

2.1.4.1. Le système racinaire

La racine se développe en une racine principale, le pivot, qui peut atteindre jusqu'à 3m. Ce système permet au tournesol d'exploiter l'eau en profondeur, mais la croissance du pivot est dépendante des conditions du sol. Le système racinaire pivotant occupe un volume très important du sol ce qui permet au tournesol une grande résistance à la sécheresse (Vear, 1992).

2.1.4.2. La partie aérienne

Le tournesol cultivé est normalement non ramifié, mais il existe des génotypes avec des ramifications. La tige est cylindrique et plus ou moins pubescente selon les génotypes. Elle mesure de 1 à 4 cm de diamètre et de 50 à 300 cm de hauteur. Les feuilles sont cordiformes et plus ou moins dentées. En règle générale, les cinq premières paires de feuilles pétiolées sont opposées et les suivantes alternées suivant une phyllotaxie en spirale. La taille et la forme des feuilles sont variables. Les variétés cultivées en possèdent entre 20 à 30. Toute la partie aérienne se tourne vers le soleil du matin au soir; ce mouvement s'arrête à la floraison (le capitule demeurant face au soleil levant) (Vear, 1992).

2.1.4.3. L'appareil reproducteur

Le capitule mesure à maturité entre 5 à 50 cm de diamètre. Il constitue l'inflorescence du tournesol avec à la périphérie des fleurs ligulées (dépourvues d'anthères et de style) et au centre des fleurs tubulées ou « fleurons ». Les fleurs sont hermaphrodites et la pollinisation est croisée la plupart du temps, sauf chez les espèces cultivées où l'auto-pollinisation est permise par l'incorporation de mécanismes d'auto-fertilité dans les génotypes. Le Tournesol est une espèce entomophile, dont la pollinisation est assurée par les abeilles et les bourdons (Vear, 1992).

Les fleurons ont une corolle courte, 2 sépales rudimentaires, 5 étamines à filets libres et à anthères soudés, un ovaire et un style. Ils sont disposés en hélice qui converge vers le centre du capitule. Le capitule porte 50 à 3000 fleurs. La partie parenchymateuse du capitule, appelée éponge, mesure de 1 à 4 cm d'épaisseur. Les anthères libèrent leur pollen, après avoir traversé les corolles. Les pollens sont recouvert d'épines, ce qui facilite leur transport par les insectes pollinisateurs. Ensuite, le style pousse à travers le tube staminal, bifide, qui s'ouvre par-dessus celui-ci. Généralement, la fécondation a lieu le deuxième jour et les stigmates flétrissent ensuite. Un stigmate peut rester fécondable environ une semaine

(Vear, 1992). La morphologie particulière des organes reproducteurs rend la castration manuelle difficile.

2.1.4.4. La graine

La graine est un akène assez gros avec un poids de mille graines de 30 à 100 g. Elle est composée d'un péricarpe sec, la coque (composée de plusieurs couches cellulaires) et d'une amande. L'amande est composée d'un tégument renfermant l'embryon formé de deux cotylédons, la tigelle et la radicule. Les principales réserves de la graine sont sous forme d'huile (entre 20 à 60% de l'akène) et de protéines (environ 25%). La durée de dormance de la graine est d'environ 3 mois. Elle reste viable 5 ans en conditions ambiantes et 10 ans à 7°C et une faible humidité (Vear, 1992).

2.1.5. Cycle de développement

Le cycle de développement du tournesol est défini par des stades repères (Fig. 1) qui correspondent généralement à l'apparition successive de caractères morphologiques déterminés (Merrien, 1992). En plus de ces stades repères de développement, on distingue cinq stades de végétation dans le cycle de développement du tournesol (Rollier, 1972). Selon les variétés, le cycle du tournesol dure entre 120 et 150 jours ce qui correspond en terme d'exigences de sommes de températures de 1570 à 1700°C environ. En fonction de ces exigences de température, chaque variété de tournesol appartient à un groupe de précocité. De ce fait, les variétés sont aujourd'hui classées, en France, en quatre groupes de précocité en fonctions de leurs exigences climatiques et des zones de culture où elles sont préconisées.

2.1.5.1. Phase Semis – Levée

Elle dure de 7 à 20 jours et nécessite des températures d'au moins 6°C (optimum proche de 8°C. Cette phase dépend fortement des conditions environnementales (température, humidité ...). Elle est particulièrement sensible au

stress hydrique, ce qui peut modifier tout le reste du cycle de développement de la plante en perturbant la différenciation des ébauches foliaires (Vear, 1992).

2.1.5.2. Phase Levée – Stade 4-5 paires de feuilles

Cette phase dure en moyenne 30 jours, durant lesquels la partie racinaire se met en place. Le rythme d'accumulation de la matière sèche relativement lent est de 10 Kg/ha/j (Merrien, 1992). L'essentiel de l'azote nécessaire à la plante est absorbé durant cette phase qui s'accompagne d'une synthèse active des protéines dans l'appareil végétatif (Blanchet, 1994). Au cours de cette étape se différencient les ébauches foliaires. L'initiation de la floraison du tournesol est un processus non photopériodique (Almeida, 1992). Cette dernière est prédéterminée très tôt après la germination (Mc Daniel *et al.*, 1992). L'initiation florale du tournesol est sous la dépendance de facteurs hormonaux (gibbérellines), pendant une phase extrêmement brève de 10 à 15 jours après le semis (Almeida et Pereira, 1996). Cette initiation détermine le nombre de fleurons et donc d'akènes présents sur le capitule. On dénombre en général entre 1800 et 2000 fleurons par capitule. Cette période d'initiation florale est très sensible aux conditions environnementales et en particulier à la température. Des accidents climatiques froids peuvent perturber l'initiation florale et conduire à des malformations capitulaires.

2.1.5.3. Stade bouton floral – Début de Floraison

C'est une période de forte croissance avec un rythme d'accumulation de la matière sèche qui passe à 200 Kg/ha/j (Gachon, 1972). Le bouton floral émerge de l'axe de la plante et le système racinaire achève son développement. Une bonne disponibilité en eau et en azote pendant cette phase sont indispensables à une bonne mise en place du système foliaire et par voie de conséquence à une bonne élaboration du rendement. C'est également une période pendant laquelle l'alimentation en bore est nécessaire. Une carence dans cet oligo-élément peut provoquer des pertes de rendement importantes (Vear, 1992).

STADES REPÈRES DU TOURNESOL

Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade.
Les codes "lettres" ou "chiffres" sont équivalents.

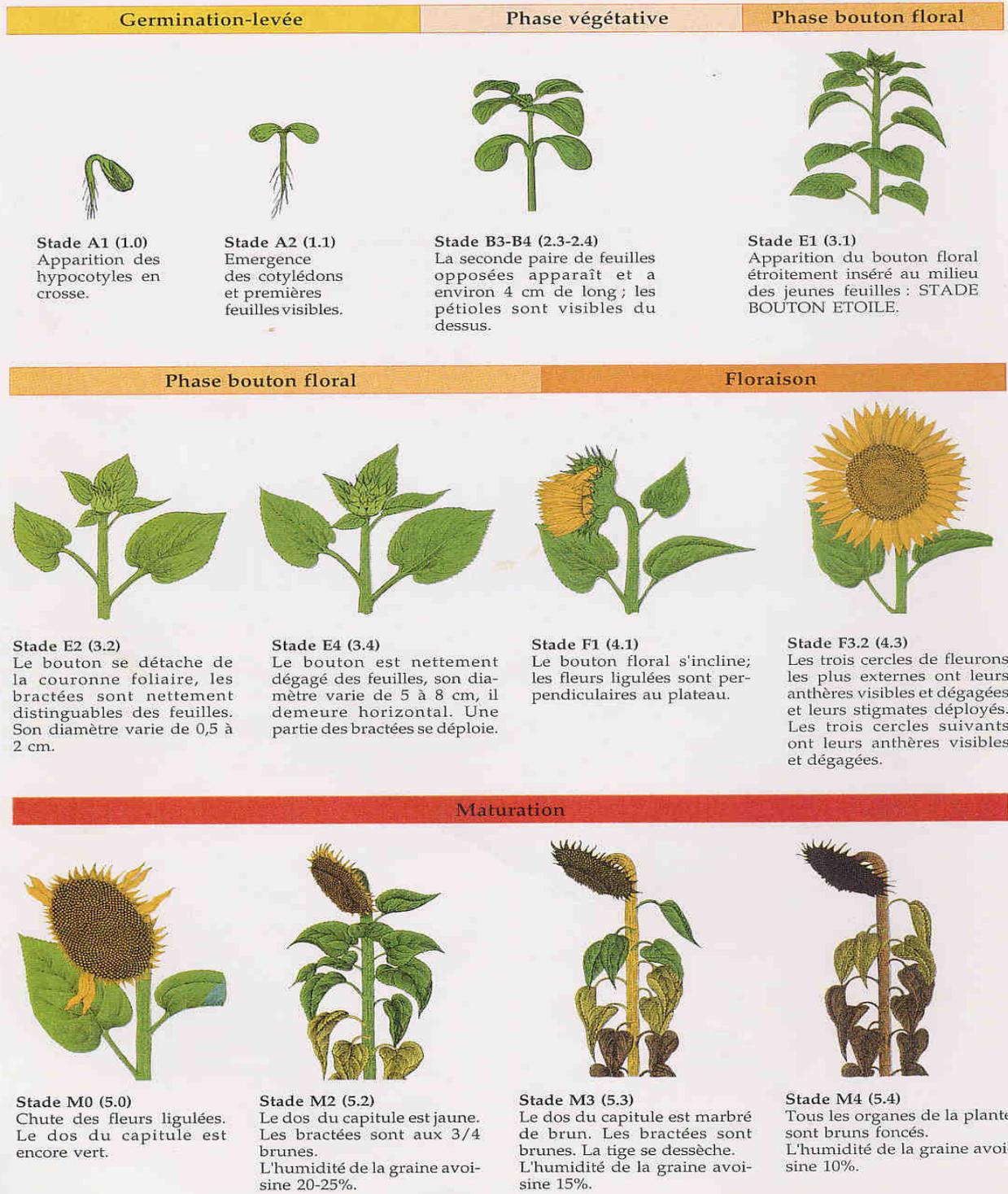


Figure 1 : Cycle de développement du tournesol cultivé décrit par le CETIOM (CETIOM, 2003).

2.1.5.4. Floraison

Au niveau du capitule la floraison dure environ 9 jours, et 20 jours au niveau d'un champ. La floraison est centripète le long des parastiques débutant avec les fleurs ligulées extérieures qui restent présentes jusqu'à la fin de la floraison de toutes les fleurs tubulées. La floraison des fleurs tubulées débute avec l'apparition des étamines qui libèrent leurs grains de pollen, puis du stigmate qui émerge à travers le tube formé par les anthères. La floraison est une période clé pour la productivité car la plante est alors extrêmement sensible au stress hydrique. Avant l'apparition du bouton floral, les assimilats sont majoritairement dirigés vers les racines. A l'apparition du bouton floral, le capitule et les fleurons deviennent l'organe « puits » principal pour les assimilats ainsi que pour les remobilisations foliaires (Blanchet, 1987).

La formation d'un akène résulte de la transformation d'un ovule, après sa fécondation par le grain de pollen. Cet organe de survie et de dissémination des spermaphytes (Végétaux supérieurs) possède à la fois, l'embryon de la future plante ainsi que les réserves qui assureront le développement de cet embryon dans les tous premiers stades de son développement (réserves localisées dans des feuilles primordiales : les cotylédons).

La croissance de l'embryon est initiée par une différenciation sur l'axe embryonnaire de deux méristèmes (caulinaire et radriculaire) ainsi que des deux cotylédons. Cette étape correspond à une période d'intense division cellulaire (Cresti *et al.*, 1992). Cette période de division cellulaire augmente le nombre de cellules par akènes et donc le nombre de réservoirs potentiels pour le stockage de l'huile. Au niveau des structures de réserve, après la période d'intense division, on observe une élongation cellulaire des tissus, accompagnée d'un fort développement des éléments sub-cellulaires (mitochondries, plastes, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique et vacuole) anticipant la période de mise en place des réserves (huile et protéines pour le tournesol) (Blanchet, 1989; Blanchet *et al.*, 1990 ; Blanchet, 1994).

2.1.5.5. Maturation

Pendant cette phase, le rythme d'accumulation de la biomasse totale ralentit, mais la matière sèche des akènes augmente (Merrien, 1992). On assiste à la sénescence foliaire et à une redistribution des assimilats vers les akènes pour la protéogénèse. D'autre part, il existe des mouvements de translocation (saccharose) des feuilles encore actives vers l'organe puits que constitue le capitule. Ces produits de la photosynthèse sont exclusivement destinés à la lipidogénèse (Blanchet *et al.*, 1982 ; Blanchet, 1987 ; 1994).

La mise en place des réserves dans l'embryon s'accompagne d'une baisse progressive de la teneur en eau (9% d'humidité à la maturité complète). Cette accumulation de matière sèche s'accompagne de la transcription et de la traduction des gènes codant pour les enzymes de synthèse des acides gras et de l'huile, ainsi que par ceux associés à la synthèse des protéines de réserves.

2.2. Effets de la sécheresse et réponses adaptatives des plantes

2.2.1. Effet de la sécheresse sur la plante

2.2.1.1. Rendement en condition de sécheresse

Des relations positives, de type linéaire, sont observées entre le rendement du tournesol et l'eau consommée (Merrien *et al.*, 1981a). Le rendement peut être décomposé en deux termes: nombre d'akènes/m² et poids moyen d'un akène. Pour ces deux composantes du rendement, la période de sensibilité maximale à la sécheresse correspond aux 40 jours qui encadrent la floraison (Robelin, 1967). Une contrainte hydrique peut avoir des conséquences de nature et d'intensité variables selon sa position dans le cycle de développement ; tout dépend de la composante du rendement mise en place dans cette période. Le nombre d'akènes est fortement affecté si le déficit hydrique est subi en période végétative, en revanche, c'est plutôt leur poids qui sera diminué si le déficit a lieu après la floraison. A la floraison, un déficit hydrique de 50% réduit de plus de 30% le nombre de graines et de 20% leur

poids moyen (Merrien et Grandin, 1990). Dans le cas d'un déficit hydrique tardif, la lipidogénèse est inhibée et les remobilisations, notamment azotées, sont favorisées.

Cet effet dépressif de la sécheresse est atténué si les capacités de transfert des métabolites des organes végétatifs vers les graines sont améliorées. En effet, le déficit hydrique peut stimuler le transfert des assimilats vers le capitule, qu'ils soient néoformés (Piquemal *et al.*, 1990) ou stockés dans les organes végétatifs (Hall *et al.*, 1990). Cette nutrition privilégiée du capitule permet alors de maintenir, voir d'augmenter, le rendement en grains exprimé par rapport à la masse totale des parties aériennes de la plante (indice de récolte) en conditions sèches.

La plupart des études attribuent à la disponibilité en eau une action déterminante et explicative dans l'élaboration du rendement chez le tournesol par son impact (i) sur la surface assimilatrice de la plante caractérisée par l'indice foliaire ou LAI 'Leaf Area Index qui est le ratio de la surface foliaire sur la surface au sol), (ii) sur la durée de fonctionnement de la surface foliaire caractérisée par le LAD 'Leaf Area Duration' et enfin, (iii) sur le taux d'assimilation de carbone des feuilles étroitement associé au fonctionnement photosynthétique des feuilles (Merrien *et al.*, 1981b).

2.2.1.2. Effets de la sécheresse sur la surface assimilatrice

Le développement végétatif de tournesols cultivés en condition de privation d'eau est fortement perturbé. On note principalement une diminution importante de la taille et de la surface foliaire. La réduction de la surface foliaire provient d'une diminution de l'expansion foliaire et/ou d'une sénescence accélérée de la feuille. Chez le tournesol, la croissance foliaire est stoppée très rapidement par un déficit hydrique, puisqu'elle intervient à des potentiels hydriques foliaires de -0.4 MPa (Boyer, 1968). Au niveau cellulaire, deux facteurs sont déterminants sur la croissance: l'extensibilité de la paroi et la turgescence.

- L'extensibilité de la paroi ne dépend pas uniquement de ses propriétés

élastiques, mais également de phénomènes biochimiques impliqués dans les processus de relaxation de la paroi; ces derniers sont souvent pénalisés lors d'un déficit hydrique (Matthews *et Boyer*, 1984; Cosgrove, 1993 ; Connor et Hall, 1997).

- Il existe une valeur seuil de turgescence cellulaire, conditionnée par l'extensibilité, pour laquelle l'expansion est stoppée, et lorsque la contrainte est plus sévère, la perte de turgescence peut conduire à la sénescence foliaire.

Cette réduction de la surface foliaire en conditions sèches réduit la surface évaporatrice de la plante mais peut aussi limiter considérablement la production primaire. Les plantes soumises au déficit hydrique voient généralement leur sénescence foliaire s'accélérer. En effet, la perte importante d'eau au niveau cellulaire peut conduire à la mort cellulaire et à la sénescence du tissu. La sénescence foliaire en réponse à la sécheresse conduit également à une allocation préférentielle des ressources aux organes reproducteurs. La sénescence foliaire précoce est habituellement corrélée à un faible rendement (Merrien *et al.*, 1981b).

2.2.1.3. Effets de la sécheresse sur le fonctionnement photosynthétique

Presque tous les aspects de la croissance sont affectés par le déficit hydrique, en particulier la photosynthèse. Elle conduit à la production de la quasi-totalité de la matière organique végétale. Différents auteurs, ont noté une diminution significative de la photosynthèse en cas de sécheresse (Le Port *et Turner*, 1995; Maury, 1997; Hopkins, 1999). Santakumari et Berkowitz (1990), ont proposé que le maintien de la turgescence du chloroplaste soit considéré comme un mécanisme important dans la résistance des végétaux à la sécheresse, ce qui conduit à une meilleure assimilation photosynthétique aux faibles potentiels hydriques foliaires.

En effet, le potentiel hydrique est fortement lié à la photosynthèse à cause de

ces effets sur l'ouverture des stomates et les réactions dans le chloroplaste (Maury, 1997). En effet, chez le tournesol, la conductance stomatique devient négligeable à des potentiels proches de -2 MPa (Mojayad, 1993). Quand la réduction de la photosynthèse résulte de la diminution de la concentration interne en CO₂ de la feuille, alors que la capacité photosynthétique des tissus n'est pas affectée, l'effet est qualifié de « *stomatique* » (Wise *et al.*, 1992), il en résulte une perturbation de la balance carboxylation/oxygénation, de la ribulose bi phosphate carboxylase (qui n'a pas beaucoup d'affinité pour le CO₂), et le flux du carbone vers la voie du glycolate augmente, d'où une photorespiration plus importante (Difonzo *et al.*, 2000). Cependant, une inhibition « *non stomatique* » de la photosynthèse a été rapportée chez plusieurs types de végétaux, tels que : le tournesol, le blé, et les céleris ... etc. (Lawlor, 1993; 1995; Pardossi *et al.*, 1998; Pankovic *et al.*, 1999; Maury *et al.*, 2000). L'altération non stomatique de la photosynthèse peut se situer à différents niveaux :

* Inhibition rapide de l'activité des membranes thylakoidiennes (Quartacci *et al.*, 1995; Rekika *et al.*, 1997), plus précisément un changement dans l'interaction protéines lipides du PSII qui entraînerait une moins grande résistance (Allkhverdiev et Sakamoto, 2000).

* L'altération des réactions photosynthétiques, en agissant sur le transport des électrons (Maury, 1997), la photophosphorylation et diverses autres activités enzymatiques impliquées dans ces processus.

* Diminution du nombre des protoplastes, le volume des tissus foliaires (Sinha *et al.*, 1995) et le volume du stroma chloroplastique ainsi que le nombre des chloroplastes (Mahjoub-Boujnah et Lemeur, 1995).

2.2.2. Réponses adaptatives des plantes

D'un point de vue écologique le terme adaptation, fait intervenir la notion de survie et propagation de l'espèce dans les conditions limitantes en eau; du point de

vue plus fonctionnel, le degré d'adaptabilité de la plante influence directement la productivité et de manière générale, elle désigne l'ensemble des mécanismes phénologiques, morphologiques et physiologiques que la plante met en jeu pour poursuivre et finir son cycle de production (Bammoun, 1997; Djebrani, 2000; Hayek *et al.*, 2000 ; Grieu *et al.*, 2008).

Dans les zones arides, les plantes ont développé des régulations assurant leur survie, en général aux dépens de la productivité. En réponse à cette situation, une panoplie de stratégies ont été développées par différents génotypes et dépendent en particulier de la nature des pressions de sélections subies au cours de l'évolution (Lewicki, 1993). Diverses classifications des mécanismes de résistances à la sécheresse ont été élaborées et Turner *et al.* (1987) a défini et proposé une classification des 'stratégies' d'adaptation des plantes à la sécheresse : (1) Esquiver la sécheresse (2) Eviter la sécheresse (3) Tolérer la sécheresse.

2.2.2.1. *Esquiver la sécheresse*

La première façon d'éviter la sécheresse est l'esquive, qui est un changement dans la longévité du cycle phénologique. Elle permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets du stress hydrique en évitant que le stress ne se produise au cours du cycle, en particulier, au cours d'une phase sensible ou critique (Belhassen *et al.*, 1995). Cette stratégie appliquée aux espèces cultivées a amené à décaler la date de semis et/ou à sélectionner des variétés plus précoces permettant d'éviter les déficits hydriques de fin de cycle.

2.2.2.2. *Eviter la sécheresse*

L'évitement de la sécheresse est lié à la capacité de la plante, à garder un potentiel hydrique élevé avec maintien d'un état hydrique satisfaisant. Ceci est rendu possible par la réduction des pertes en eau de la plante par transpiration et/ou l'amélioration de son absorption au niveau racinaire. Parmi les mécanismes permettant de réduire la transpiration, la réduction de la surface foliaire et la

diminution de la conductance stomatique (g_s) jouent un rôle déterminant. Lors de sécheresses précoces, la réduction de la surface foliaire est associée à une diminution de l'expansion foliaire plus qu'à une sénescence accélérée des feuilles. Cependant, chez le tournesol, cette diminution de la surface assimilatrice peut s'accompagner d'une baisse de rendement si l'indice foliaire ou LAI 'Leaf Area Index' chute en-dessous de 2.5 à la floraison (Merrien et Grandin, 1990). Le rendement, corrélé à la durée de vie de la surface foliaire après floraison, est fortement affecté lorsque la sénescence est accélérée par des déficits hydriques tardifs.

La régulation de la conductance stomatique reste le mécanisme majeur intervenant à court terme pour limiter les pertes d'eau: le potentiel hydrique foliaire sera maintenu d'autant plus longtemps que la fermeture des stomates est précoce. Celle-ci peut intervenir à des potentiels hydriques foliaires différents en fonction du génotype (Mojayad, 1993) et du stade de développement (Morizet et Merrien, 1990). En revanche, une telle sensibilité des stomates à la diminution du potentiel hydrique foliaire (Ψ_f) peut augmenter la fréquence des épisodes de photoinhibition conduisant à une altération du fonctionnement chloroplastique, plus ou moins rapidement réversible, mais qui peut contribuer à réduire le bilan journalier d'assimilation nette, suite à la dépression de conductance stomatique à la mi-journée ou en période de post-sécheresse (Maury, 1997).

2.2.2.3. Tolérer la sécheresse et rôle de l'ajustement osmotique

2.2.2.3.1. Tolérer la sécheresse

Les mécanismes de tolérance favorisent le maintien de la turgescence de la plante alors que son potentiel hydrique est très négatif. Cette réponse sur différents processus, comme l'ajustement du potentiel osmotique pouvant être réalisé par l'accumulation d'ions minéraux (vacuole) et des composés organiques (Chimenti *et al.*, 1995 ; Sorrells *et al.*, 2000). Il est généralement accepté que

l'augmentation d'osmoticum non toxique (compatible) s'accompagne d'une pénétration de l'eau et d'une réduction de sa sortie de la cellule qui réalise la turgescence nécessaire pour l'expansion cellulaire et ceci est à la base du phénomène d'ajustement osmotique (Terbea *et al.*, 1995; Hare *et al.*, 1998 ; Chimenti *et al.*, 2006). Les solutés dont l'accumulation permet la diminution du potentiel osmotique et qui contribueraient ainsi au phénomène d'ajustement osmotique sont surtout les sucres solubles (saccharose, fructose, glucose) (Kameli *et Losel*, 1995; 1995) et des composés azotés comme la proline (Shwacke *et al.*, 1999).

D'autres mécanismes encore peuvent intervenir dans le maintien de la turgescence cellulaire, comme l'élasticité membranaire (Sherwin *et al.*, 1995; Maury *et al.*, 1995 ; Bajji *et al.*, 2000), la réduction de la taille des cellules et la résistance protoplasmique qui dépendent de la capacité des cellules à résister à un dommage mécanique et à la dénaturation des protéines au niveau membranaire ou cytoplasmique (Cornaire *et al.*, 1995 ; Lefebvre *et al.*, 2009). Le maintien de la turgescence cellulaire est à la base de la préservation de plusieurs fonctions physiologiques car elle permet de limiter la fermeture des stomates donc de maintenir la photosynthèse, la transpiration, l'assimilation du carbone et l'élongation cellulaire (Bammoune, 1997).

Par ailleurs, l'ajustement osmotique (AO) est un phénomène commun aux différents organismes cellulaires ; il a été reporté chez différentes espèces végétales (Zhang *et al.*, 1999). De plus, il peut intervenir à tous les stades de développement et ainsi favoriser la stabilité du rendement en conditions de déficits hydriques (Monneveux et This, 1997). La capacité d'ajustement osmotique est variable selon les génotypes (Chimenti *et al.*, 2002), les modalités d'installation du déficit hydrique (Jones et Rawson 1979), et de l'âge de la feuille (Jones et Turner 1980; Sadras *et al.*, 1993; Chimenti *et al.*, 2002).

2.2.2.3.2. Ajustement osmotique : un critère de sélection pour la tolérance à la sécheresse

Suite aux variations annuelles des conditions climatiques dans les zones méditerranéennes qui rendent difficiles une sélection uniquement basée sur le rendement (Djekoune, 1995; Merah *et al.*, 1995). Ceci a conduit plusieurs chercheurs à s'intéresser à des caractéristiques culturales qui ont une valeur potentielle dans la résistance à la sécheresse, qui sont de nature morphophysiologiques tel que l'ajustement osmotique, l'un des critères de sélection les plus utilisés (El Jaafari, 2000 ; Chimenti *et al.*, 2006).

La capacité d'ajustement osmotique des plantes sous conditions limitantes en eau est un caractère présentant une forte variabilité génotypique (Chimenti *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1999). Zhang *et al.* (1999) et El Jaafari (1993 ; 2000), ont cependant vu que l'évaluation de ce caractère soulève quelques contraintes méthodologiques :

- L'ajustement osmotique (AO) est proportionnel à l'intensité du stress hydrique, ces mesures chez plusieurs génotypes doivent être réalisées quand toutes les plantes sont sujettes au même type de déficit hydrique, ceci demandant un temps plus ou moins long (Lewicki, 1993). Les techniques de mesures de l'AO sont encore trop lourdes et fastidieuses et peuvent difficilement être envisagées dans le cas d'effectifs importants (populations ségrédantes, ressources génétiques ...) donc elles ne peuvent être utilisées en routine par un sélectionneur (Nachit *et al.*, 2000).

- La recherche d'approches et d'outils permettant d'évaluer plus facilement la variabilité génétique pour l'AO a été entreprise, et les techniques de marquages moléculaires sont dès lors devenues des outils de nombreux programmes de recherche (Belhassen *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1999; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007 a et b).

2.3. Amélioration génétique du tournesol et méthodes d'analyse génétique

Les premiers travaux d'amélioration génétique faisaient appel à la sélection massale ou phénotypique, qui consiste à sélectionner les plantes en fonction de caractères donnés. Comme le tournesol est fortement allogame, il n'y avait pas de contrôle de la pollinisation. Diverses variétés sélectionnées en fonction de caractères tels que la résistance aux maladies, la teneur en huile et certaines caractéristiques des graines ont été créées de cette façon. En URSS, Pustovoit (1964) a mis au point une technique beaucoup plus efficace. Elle consiste à prélever des graines de divers capitules et de les évaluer à l'égard de divers caractères dans une pépinière pendant deux ans, les capitules sélectionnés étant par la suite pollinisés de façon contrôlée. C'est ainsi qu'on est parvenu à accroître de façon spectaculaire la teneur en huile du tournesol, tout en améliorant son rendement.

Les autofécondations successives permettant d'obtenir des lignées homozygotes ont été largement utilisées pour améliorer le tournesol dès 1922. Ce n'est qu'au cours des décennies 1940 et 1950 que les premiers hybrides F1 ont fait l'objet d'une culture commerciale au Canada. La découverte de la stérilité mâle cytoplasmique par Leclercq (1969), en France, suivie de l'identification de gènes restaurateurs de la fertilité, a permis de tirer pleinement partie de l'effet d'hétérosis. Les progrès issus de la sélection d'hybrides ont permis de doubler la production mondiale du tournesol en seulement 20 ans. L'accent a été mis sur la sélection pour la résistance aux maladies responsables d'importantes pertes de rendement (phomopsis, sclérotinia, mildiou, orobanche et Phoma) et a conduit à la création d'hybrides de plus en plus résistants (Leclercq, 1970; Skoric, 1985; Vear et Tourveille de Labrouhe, 1988).

La connaissance simultanée de la variabilité moléculaire d'un allèle et de la variabilité de son effet sur un caractère phénotypique permet de concevoir la sélection assistée par marqueurs (SAM). En effet, la construction de génotypes

cumulant des formes alléliques favorables pour plusieurs locus et plusieurs caractères devient possible avec le recours au marquage moléculaire. Le cas le plus simple d'utilisation de la SAM concerne l'amélioration d'un génotype par le transfert d'un caractère présent dans un autre génotype et gouverné par un seul gène. Ce transfert peut être accéléré si l'on dispose d'un marqueur moléculaire du gène et de marqueurs répartis sur le génome du génotype à améliorer. Ces marqueurs moléculaires permettent de choisir, à chaque génération de rétrocroisement, les descendants se rapprochant le plus du génotype originelle, tout en s'assurant de la présence du caractère introduit (De Vienne et Causse, 1998).

Plus complexe est le cas des caractères quantitatifs tels que le rendement qui sont généralement gouvernés par plusieurs locus (Quantitative Trait Loci ou QTL). Le sélectionneur devra, en conséquence, accumuler les allèles favorables des ces différent locus. C'est là que la SAM offre le plus d'intérêt par la simplification qu'elle peut apporter face à la complexité de telles situations. Donc le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection (De Vienne et Causse, 1998).

2.3.1. Marquage moléculaire

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un bon marqueur doit être à hérédité simple, multi-allélique et co-dominant. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement. De nombreuses techniques de marquage moléculaire sont aujourd'hui disponibles, et de nouvelles sont régulièrement publiées (Price *et al.*, 2000 ; Gupta *et al.*, 2001; Langridge *et al.*, 2001; Rafalski, 2002 a et b ; Al-Chaarani *et al.*, 2004 a ; Poormohammed Kiani *et al.*, 2007 a et b ; Moullet *et al.*, 2008).

Les caractéristiques de chacune de ces techniques, en terme de domaine d'application, de principe et coût sont largement détaillés dans plusieurs articles de synthèse (Gupta *et al.*, 1999 ; Santoni *et al.*, 2000 ; Langridge *et al.*, 2001 ; Sarrafi et Gentzittel, 2004). Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les marqueurs basés sur la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction). Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire.

2.3.1.1. Marqueurs RFLP

La technique RFLP développée par Botstein *et al.* (1980) repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Bien que cette technique soit co-dominante et permette une analyse génétique complète, elle est lente et laborieuse. Les étapes de transfert et d'hybridation empêchent une automatisation du travail.

2.3.1.2. Marqueurs de type PCR

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, iso-enzymatiques et RFLP) et deviennent très nombreux. Les plus largement utilisés chez le tournesol sont les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat) ; l'AFLP, (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Langar *et al.*, 2003). La population de mutants utilisée dans le cadre de cette thèse a été génotypée à l'aide de marqueurs AFLP (Al-Chaarani *et al.*, 2004 a), et celle des lignées recombinantes a été cartographiée à l'aide de marqueurs AFLP et SSR (Poormohammad Kiani , 2007).

2.3.2. La carte génétique

La construction de cartes génétiques permet une meilleure localisation des zones chromosomiques d'intérêt grâce à l'identification des marqueurs flanquants (Knapp *et al.*, 1990). Chez le tournesol, la première carte génétique a été établie en se basant sur des marqueurs RFLP (Gentzbittel *et al.*, 1995). Cette carte a été utilisée dans la cartographie du locus P11 conférant la résistance à la race 1 de *Plasmopara halstedii* et la résistance au *Sclerotinia sclerotiorum* chez le tournesol (Mestries *et al.*, 1998). Deux autres cartes de RFLP ont aussi été publiées chez le tournesol (Berry *et al.*, 1995; Jan *et al.*, 1998 ; Yu *et al.*, 2003). Les marqueurs AFLP ont été utilisés dans la cartographie de plusieurs espèces végétales comme le riz (Mackill *et al.*, 1996), le maïs (Castiglioni *et al.*, 1999 ; Frova *et al.*, 1999; Marsan *et al.*, 2001), la tomate (Haanstra *et al.*, 1999), le melon (Wang *et al.*, 1997), la laitue (Jeuken *et al.*, 2001) et le tournesol (Flores Berrios *et al.*, 2000 a ; Al-Chaarani *et al.*, 2002). Chez le tournesol, une carte génétique basée sur les marqueurs AFLP et SSR, en utilisant des lignées recombinantes, a permis d'identifier des QTLs liés à l'organogénèse (Flores Berrios *et al.*, 2000 b et c), la résistance aux maladies (Al Chaarani *et al.*, 2002), le contenu en huiles et en protéines des graines (Mokrani *et al.*, 2002 ; Ebrahimi *et al.*, 2008 ; 2009) et les traits agronomiques (Al Chaarani *et al.*, 2004 a ; Poormohammed Kiani *et al.*, 2009). Une carte génétique a été construite à l'aide de 273 marqueurs SNP chez le tournesol (Lai *et al.*, 2005), en utilisant la même population de lignées recombinantes et qui a été déjà utilisée par Tang *et al.* (2002) pour la construction d'une carte à base de marqueurs SSR.

En 2007 une carte génétique basée sur 191 SSRs et 304 AFLPs a été développée au sein du laboratoire de biotechnologie et amélioration des plantes de Toulouse (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007 a et b). Cette nouvelle carte génétique est un outil génétique de base important pour l'analyse des caractères quantitatifs et qualitatifs chez le tournesol. Ce travail de thèse s'appuie sur l'utilisation de cette

carte génétique pour l'identification de QTLs associés aux caractères de productivité du tournesol sous contrainte hydrique.

2.3.3. Analyse de la variabilité génétique et identification de QTLs

Le processus de sélection pour un caractère d'intérêt passe avant tout par l'évaluation de la variabilité génétique de ce caractère et de son interaction avec l'environnement. La décomposition de la variance phénotypique est la base des méthodes dites « classique » de sélection mais également de la sélection assistée par marqueur. Il est donc nécessaire d'évaluer pour chaque caractère morphophysiological d'intérêt sa variabilité génétique et le maintien de celle-ci à travers différents environnements (Allinne, 2009).

2.3.3.1. Analyse de la variabilité génétique

2.3.3.1.1. Décomposition de la variance phénotypique

La valeur phénotypique d'un caractère observé pour un génotype donné dépend des conditions environnementales. Pour la plupart des caractères, le phénotype résulte des effets conjoints de 3 composantes : le génotype (G), l'environnement (E) qui contribue toujours pour une part au phénotype et l'interaction entre le génotype et l'environnement (G×E). La valeur pour un phénotype peut se résumer à la formulation additive :

$$P = G + E + G \times E.$$

Cette interaction entre le génotype et l'environnement est très importante car elle signifie que l'expression d'un gène n'est pas indépendante du milieu dans lequel ce gène s'exprime. Si le phénotype est la somme des effets des gènes et de l'environnement et de leurs interactions, alors la variance du phénotype ($\sigma^2 p$) est la somme de la variance génétique ($\sigma^2 g$), de la variance environnementale ($\sigma^2 e$) et du double de la covariance entre les effets génotypiques et environnementaux ($2 \text{cov}(ge)$) selon l'équation :

$$\sigma^2 (p) = \sigma^2 (g) + \sigma^2 (e) + 2 \text{cov} (ge) \quad (\text{Eq. 1})$$

2.3.3.1.2. L'héritabilité

La décomposition de la variance et la mise en évidence de la variabilité génétique permet de définir l'héritabilité (h^2) comme la part de la variance phénotypique attribuable à la génétique selon l'équation 1 où $\sigma^2(g)$ est la variance génotypique et $\sigma^2 (e)$ la variance environnementale.

$$h^2 = \sigma^2 (g) / \sigma^2 (g) + \sigma^2 (e) \quad (\text{Eq. 2})$$

Elle s'exprime en valeur relative comprise entre 0 et 1. Une valeur élevée d'héritabilité signifie que le caractère étudié dépend en grande partie du facteur génétique et qu'il dépend peu de l'effet environnemental. Si un caractère est fortement héritable, cela veut dire qu'il est stable dans différents environnements, et qu'il constitue donc un caractère intéressant pour la sélection. L'héritabilité est un indicateur pour prédire la réponse à la sélection : plus un caractère est héritable et plus la sélection est efficace et rapide pour faire évoluer la moyenne de la population.

2.3.3.1.3. Le gain génétique

Le gain génétique peut être représenté soit comme étant l'écart entre le meilleur parent et le meilleur descendant (GGB), soit comme étant l'écart entre la moyenne des parents et la moyenne des 10% des meilleurs descendants (GG10% B RIL) (Fig. 2).

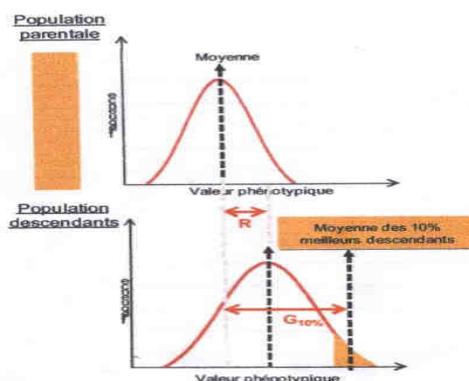


Figure 2 : Sélection différentielle entre une population parentale et sa population de descendants. La réponse à la sélection est la différence entre la moyenne des descendants (R) et le gain génétique est l'écart entre la moyenne des parents et la moyenne des 10% meilleurs descendants ($G_{10\%}$). (Allinne, 2009)

2.3.3.2. Identification de QTLs

La détection de QTLs impliqués dans le contrôle d'un caractère donné repose sur :

- Le choix de parents présentant du polymorphisme afin d'obtenir une descendance en ségrégation.
- La détermination du génotype de chaque descendant (génotypage).
- La mesure de la valeur du caractère quantitatif recherché pour chaque individu, famille ou lignée étudié (phénotypage).
- L'utilisation d'une méthode biométrique afin de corrélérer les locus marqueurs au caractère étudié.

Il existe 3 catégories de méthodes biométriques utilisées pour détecter des QTLs, selon que l'on analyse les marqueurs individuellement, deux par deux ou par groupe.

2.3.3.2.1. Détection de QTL par les marqueurs individuels

Cette méthode de détection est basée sur la comparaison des moyennes aux différents locus, pour chaque génotype. Nous pouvons utiliser l'une des méthodes d'analyse suivantes:

Test « t » de student

Il peut être utilisé chez les populations pour lesquelles il n'existe que deux classes de marqueurs comme le backcross (F1× parent récessif), les lignées haploïdes doublées (DH) et les lignées recombinantes (RILs) (Markel *et al.*, 1996).

Analyse de variance

On considère qu'il existe un QTL lié au marqueur si le test F (σ^2 intra / σ^2

inter) est significatif. Cette méthode peut être utilisée dans les populations F2 présentant trois génotypes pour le marqueur : MM, Mm et mm (marqueurs co-dominants).

Méthode du maximum de vraisemblance

La méthode du maximum de vraisemblance permet l'estimation des effets directs du QTL et du taux de recombinaison. Cette approche est moins puissante que l'analyse de variance surtout lorsque le QTL est très proche du marqueur. La vraisemblance est fonction de la probabilité de disposer d'un génotype QTL et d'avoir une valeur phénotypique associée à ce génotype QTL (Lander et Botstein, 1989).

Ce type d'analyse est simplifié grâce à l'utilisation de logiciels statistiques. L'ordre des gènes ainsi qu'une carte génétique complète ne sont pas nécessaires. Cependant, la carte permet de mieux présenter les résultats (Liu et Zhu, 1998). Par contre, si la densité des marqueurs est faible, cette méthode est peu efficace pour l'estimation de la position et des effets des QTLs (De Vienne et Causse, 1998).

2.3.3.2.2. Méthodes de cartographie d'intervalle

Les méthodes de cartographie d'intervalle partent de l'hypothèse qu'il existe un QTL ou plus dans l'intervalle entre deux marqueurs liés par un taux de recombinaison « r » (De Vienne et Causse, 1998). Trois méthodes ont été décrites : des méthodes linéaires basées sur les moyennes au marqueur, la cartographie d'intervalle par maximum de vraisemblance (SIM Simple Interval Mapping) (Lander et Botstein, 1989) et la cartographie d'intervalle par régression multiple (Haley et Knott, 1992).

Dans ces méthodes, le nombre de QTLs et leurs positions ne sont pas toujours bien résolus et les positions exactes des QTL sont difficiles à déterminer. De même, l'outil statistique est relativement peu puissant. Par ailleurs un seul pic

peut être identifié lorsque deux QTLs sont très proches l'un de l'autre. Le pic, dans ce cas, va être faible et très large. De même, lorsque les QTLs liés présentent des effets répulsifs, le pic sera soit bas, soit complètement éliminé (Liu et Zhu, 1998).

2.3.3.2.3. Méthodes multi-marqueurs

Les méthodes par marqueurs multiples tentent de résoudre les difficultés provenant de la présence éventuelle de plusieurs QTLs liés sur un chromosome ou de réduire le bruit de fond généré par les QTLs ne ségrégant pas aux marqueurs. Kearsey et Hyne (1994 ; 1998) ont proposé une approche basée sur la régression linéaire. Dans cette méthode, la position la plus probable du QTL est celle où la résiduelle du modèle de régression est la plus faible. Cette méthode est simple, cependant, elle ne peut être utilisée avec des marqueurs dominants en F2. La cartographie par composition d'intervalle (CIM : Composite Interval Mapping) combine la méthode du maximum de vraisemblance (SIM) et la régression multiple (Zeng, 1993 ; 1994). Cette méthode a des avantages par rapport au SIM, à l'analyse de marqueurs simples et aux modèles multi-QTLs qui utilisent la régression multiple. Un des avantages de la méthode CIM qui est le plus important est que d'autres marqueurs peuvent être utilisés pour réduire le nombre et les positions du QTL. De plus, la précision de la localisation des QTLs peut être augmentée (Liu et Zhu, 1998).

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel végétal

3.1.1. La population de lignées recombinantes (RILs)

Les lignées recombinantes (RILs) d'*Helianthus annuus* L. utilisées dans nos expérimentations, ont été créées par la méthode SSD (Single Seed Descent) à partir du croisement entre les génotypes 'PAC2' et 'RHA266' (Zhang *et al.*, 2005). Le parent RHA266 est obtenu à partir du croisement entre les espèces sauvages *H. annuus* et *Peredovic* par l'USDA et le parent PAC2 est une lignée de l'INRA-France obtenu à partir du croisement entre *H. petiolaris* et 'HA61' (Gentzbittel *et al.*, 1995). RHA266 est très résistante au mildew avec des valeurs élevées pour le rendement, le poids de 1000 grains et le pourcentage en huile en comparaison à PAC2 (Gentzbittel *et al.*, 1995 ; Al-Chaarani *et al.*, 2004 a). La lignée parentale PAC2 présente une grande résistance à *S. sclerotiorum* (Gentzbittel *et al.*, 1998). Le laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP) de l'ENSA de Toulouse dispose d'un ensemble de 150 lignées recombinantes dont une partie a été utilisée pour la réalisation de nos expérimentations.

3.1.2. La population de mutants (M6)

Le laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP) de l'ENSA de Toulouse a généré une lignée de tournesol appelée 'AS613' issue d'un croisement entre ENSAT-125 et ENSAT-704, elle a été sélectionnée pour son pouvoir organogène élevé (Sarraf *et al.*, 2000). Cette lignée a été choisie comme cible d'un traitement mutagène et des akènes ont alors été soumis à une irradiation gamma (75 grays) au Centre de Recherche du Commissariat de l'Energie Atomique de Cadarache, en France . Le laboratoire possède ainsi actuellement une collection de plus de 2000 mutants (M6) produite par autofécondation. Ce travail concerne l'étude de 31 mutants qui ont été choisis au vu de leurs différences phénotypiques

avec la lignée d'origine AS613.

3.2. Conditions de culture et dispositif expérimental

3.2.1. Cas des LIRs

3.2.1.1. Culture en conditions contrôlées (serre)

78 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC2' et 'RHA266' ont été mis en culture en serre, dans des pots en plastique de 4 litres sur un mélange de 40% terre, 40% terreau et 20% sable à raison d'une plante par pot, dans un dispositif 'split-plot' en blocs randomisés avec deux traitements hydriques (bien-irriguée et stressé) et trois répétitions pour chaque traitement. La croissance des plantes s'effectuait sous éclairage naturel à une intensité lumineuse moyenne estimée à $500 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (l'intensité maximale de l'éclairage enregistrée à 14 heures était de $1600 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) avec une photopériode d'environ 16 h, à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ jour, $18 \pm 2^\circ\text{C}$ nuit. L'humidité relative de l'air était comprise entre 65% et 85%. Les plantes sont arrosées normalement jusqu'au stade bouton floral (R1, Schneider et Miller 1981). A ce stade le déficit hydrique est appliqué sur la moitié des plantes (plantes « stressées »). L'autre moitié des plantes est maintenue à une irrigation non limitante (plantes « bien irriguées »). Cette contrainte hydrique consistait à diminuer progressivement, l'arrosage de 100% à 30% de la fraction d'eau transpirable pendant 15 jours (soit une diminution d'approximativement 10% par trois jours). Les mesures physiologiques sont effectuées chez les plantes 'bien-irriguées' et les plantes « stressées » après la période de déficit hydrique. Des irrigations modérées étaient ensuite effectuées afin de conserver un flétrissement de 50% des feuilles sur les plantes « stressées » jusqu'à la récolte où les différents paramètres agronomiques sont mesurés.

3.2.1.2. Culture en conditions naturelles (champ)

100 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC2' et 'RHA266' ont été

prises en culture au champ à l'INRA Auzeville, dans deux dispositifs (irrigué et non irrigué) en blocs randomisés avec trois répétitions. Chaque répétition, pour un parent ou une lignée recombinante, est constituée d'une parcelle de deux lignes de 4,6 m de longueur. L'intervalle entre les lignes est de 50 cm. La distance entre les plantes sur la ligne est de 25 cm conduisant à un nombre total de 32 plantes par parcelle (soit une densité proche de 6,5 plantes/m²). Deux conditions expérimentales sont appliquées à la culture au champ: « irriguée » et « non irriguée ». Les plantes dans la condition irriguée sont arrosées, deux fois, aux stades avant floraison (33 mm) et remplissage des graines (44 mm) selon le programme habituel de l'INRA-Auzeville. Tandis que la condition non-irriguée n'a pas été arrosée.

3.2.2. Cas des mutants

3.2.2.1. Culture en conditions naturelles (toit roulant)

31 mutants M6 et leur lignée originelle ont été mis en culture au champ sous un toit roulant, dans deux dispositifs (irrigué et non irrigué) en blocs randomisés avec trois répétitions. Chaque répétition est constituée d'une parcelle d'une ligne de 1.6 m de longueur. L'intervalle entre les lignes est de 50 cm. La distance entre les plantes sur la ligne est de 20 cm conduisant à un nombre total de 8 plantes par parcelle.

Le dispositif non irrigué a subi une contrainte hydrique modérée, réalisée au stade bouton floral (stade R1, Schneiter et Miller, 1981) (Fig. 3). A ce stade le déficit hydrique est provoqué par arrêt de l'arrosage jusqu'à la récolte. Une irrigation non limitante a été réalisée pour les plantes bien-irriguées tout au long de l'expérimentation.

3.3. Paramètres étudiés

3.3.1. Caractères morphologiques et agronomiques

Les caractères morphologiques et agronomiques ci-dessous ont été déterminés sur la population de LIRs dans les différents environnements (serre et champ) et pour les différentes conditions hydriques (bien irriguée ou stress hydrique). La précocité de floraison qui est évaluée par le nombre de jours entre le semis et la floraison de 50 pour cent des plantes d'une parcelle (Days from Sowing to Flowring : DSF), la longueur et le diamètre de la tige (Plant Height : PH en cm), le poids du capitule (Head Weight : HW en g), la biomasse totale par plante (Biomass per plant : BIO en g), le nombre de graines par capitule (g), le rendement en poids de graines par plante (Grain Yield per Plant : GYP en g), la surface foliaire à la floraison par plante (Leaf Area at flowring : LAF en cm²) et la durée de surface foliaire post floraison (Leaf Area Duration : LAD en cm² × jours).

3.3.1.1. Caractères du développement (phénologie)

L'identification précise des différents stades de développements des plantes reposait sur l'échelle proposée par le CETIOM et celle de Schneiter et Miller (1981), quant 50 % des plantes par parcelle avait atteint le stade donnée (Fig. 3). Des notations hebdomadaires des différents stades ont été réalisées : la date de levée (stade A2), date de floraison (stade **F**), date début maturation (stade **M0**), date de la maturation physiologique (stade **M2**). La précocité de floraison des différentes lignées, en faisant la différence entre la date de semis et la date de floraison :

Durée du Semis à la Floraison (**DSF**) = Date du semis – Date de floraison

3.3.1.2. Caractères de la croissance

3.3.1.2.1. Surface foliaire à la floraison (LAF)

En serre, la surface foliaire totale des plantes a été mesurée en s'appuyant

sur le modèle du « Profil foliaire complet ». Cette méthode consiste à la mesure de l'ensemble des feuilles impaires (longueur et la largeur maximale du limbe) de la plante au stade de la floraison.

$$\text{Surface foliaire totale à la floraison (LAF)} = \sum_{i=1}^{LN} \text{Surfacefeuille}$$

Surface de la feuille (cm²) = longueur de la feuille (cm) × largeur de la feuille (cm) × 0.76

Nous avons également déterminé le nombre de feuilles à la floraison (Leaf Number : LN).

Au champ, l'estimation de la surface foliaire a été réalisée en s'appuyant sur le modèle du « *profil foliaire simplifié* », qui consiste à évaluer le nombre de feuilles par plante, et à mesurer les surfaces foliaires de la plus grande feuille et de la plus petite feuille. Le calcul de la surface foliaire à la floraison est obtenu comme suit :

Surface foliaire à la floraison (LAF) = (surface foliaire de la plus grande feuille + surface foliaire de la plus petite feuille) / 2 × nombre de feuilles à la floraison

3.3.1.2.2. Durée de la surface foliaire (LAD)

Des mesures de la sénescence des feuilles ont été réalisées à partir de la floraison pour toutes les plantes. Le suivi de la mortalité des feuilles a été évalué en : Nombre de jours depuis la floraison (F1) jusqu'à ce que 25% des feuilles soient sénescentes (n1), de F1 à 50% de feuilles sénescentes (n2–n1), F1 à 75% de feuilles sénescentes (n3–n2), F1 à 100% de feuilles sénescentes (n4–n3). Une feuille est considérée sénescente lorsqu'elle est au 2/3 jaune. Les mesures de sénescences sont faites pour évaluer la durée de la surface foliaire verte (active) qui est représentée par le LAD.

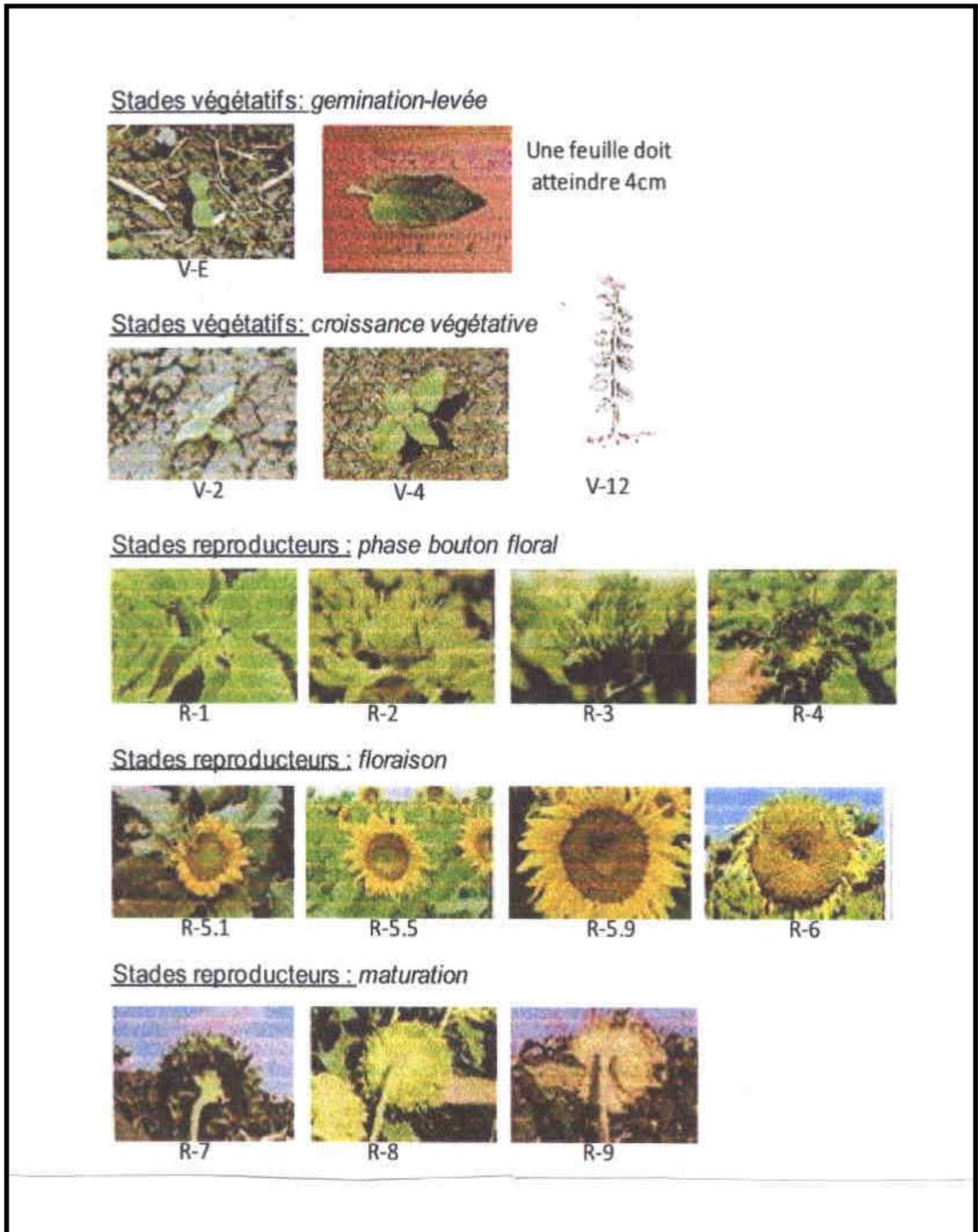


Figure 3 : Représentation des stades phénologiques pour la croissance végétative, la floraison et la maturité physiologique d'après Schneiter et Miller (1981).

L'estimation du LAD suit la formule suivante :

Durée de la surface foliaire (**LAD**, en $\text{Cm}^2 \times \text{Jours}$)

$$= [(n1 \times ((100+75) / 2) \times \text{SF}_{\text{floraison}}) + ((n2-n1) \times ((75+50) / 2)) \times \text{SF}_{\text{floraison}}] \\ + ((n3-n2) \times ((50+25) / 2) \times \text{SF}_{\text{floraison}}) + ((n4-n3) \times ((25+0) / 2) \times \text{SF}_{\text{floraison}})]$$

3.3.1.2.3. Le rendement et ses composantes

A la maturité physiologique, chaque plante (plante entière sauf racine) est placée dans un sachet puis dans l'étuve à 80°C pendant une durée de 48h, pour évaluer par la suite:

- La masse sèche totale de la plante (en gramme) (sauf les racines) (BIO);
- La masse sèche du capitule (akènes compris) (HW);
- La masse sèche des akènes (en gramme), après avoir égrainer le capitule.

3.3.2. Paramètres de l'état hydrique des plantes

Les mesures des différents paramètres caractérisant l'état hydrique des plantes ont été réalisées pour la population de mutants au niveau de la feuille la plus jeune et complètement développée, au stade début floraison (stade R5, Schneiter et Miller, 1981).

3.3.2.1. Teneur en eau relative foliaire

L'importance de l'eau au niveau de la plante pour le maintien de la turgescence requise pour la croissance et sa survie est largement reconnue. La teneur relative en eau figure parmi les différents critères d'évaluation de la tolérance à la sécheresse proposée par Clarck et Mac-Gaig (1982) et Shonfeld *et al.* (1988). Ce paramètre représente le terme le plus satisfaisant pour quantifier le déficit hydrique des tissus d'une plante car il n'est pas influencé par les variations du poids sec des tissus (Turner, 1981). La teneur relative en eau (RWC%), a été obtenue à

partir de la formule de Barrs (1968):

$$\text{Eq. 3 } \text{RWC (\%)} = [(\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})] \times 100$$

Où :

RWC : Teneur relative en eau (Relative Water Content);

FW : Poids frais des feuilles au prélèvement (Fresh Weight);

DW : Poids sec des feuilles (après passage des échantillons prélevés dans l'étuve à 85°C) (Dry Weight);

TW : masse à pleine turgescence des feuilles prélevées (Turgid Weight).

La feuille est prélevée à la base du pétiole puis pesée pour déterminer la masse de la matière fraîche (FW), le limbe est alors placé horizontalement sur une plaque de polystyrène dans un bac humidifié et fermé, seul le pétiole baigne dans de l'eau distillée par une ouverture ménagée dans la plaque. L'ensemble est alors placé à l'obscurité à 4°C pendant 24 heures pour déterminer la masse turgescence (TW). Le poids sec des feuilles (DW) est déterminé après un passage de l'échantillon rehydraté dans une étuve ventilée pendant 48 heures à 80 °c.

3.3.2.2. *Potentiel hydrique foliaire*

Le potentiel de l'eau dans un organe d'une plante ou le potentiel osmotique d'une solution traduit le degré de liaison de l'eau par rapport au système considéré.

Le potentiel de l'eau libre à la pression atmosphérique étant nul, celui de l'eau lié à la même pression est donc négatif (Boyer, 1967 ; 1968 ; 1969). Le potentiel hydrique foliaire dépend de trois composantes :

$$\text{Eq. 4 } \Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_m + \Psi_p \text{ où :}$$

Ψ_{π} : Potentiel osmotique dû aux ions et molécules dissous.

Ψ_m : Potentiel matriciel des forces d'imbibition et capillarité développées dans le

végétal.

Ψ_p : Potentiel de pression de turgescence des cellules végétales et succion dans les vaisseaux conducteurs.

Dans l'apoplaste Ψ dépend de Ψ_m , Ψ_p , et pour une faible part de Ψ_π , alors que dans le symplasma, il dépend principalement de Ψ_π , et Ψ_p (Boyer, 1971 ; 1974 ; 1985), le potentiel matriciel (interaction entre les phases solides et liquide) n'ayant d'effet que sur une très faible fraction d'eau au niveau symplasmique est alors négligeable.

Au niveau du symplasma, l'Eq. 4 s'écrit donc :

$$\text{Eq. 5} \quad \Psi = \Psi_\pi + \Psi_p$$

Cette équation a été largement utilisée pour calculer la turgescence au niveau des cellules foliaires à partir de la mesure de Ψ et de celle du potentiel osmotique.

$$\text{Eq. 6} \quad \Psi_p = \Psi - \Psi_\pi$$

Le potentiel hydrique de la feuille est mesuré à l'aide de la chambre à pression. L'avantage de cette méthode est que la mesure est rapide et ne nécessite pas un contrôle très strict de la température (Scholander *et al.*, 1965). Cette technique consiste à soumettre la feuille prélevée sur le végétal à une pression d'air. La feuille est placée dans une chambre étanche, la partie sectionnée apparaissant à l'extérieur à la pression atmosphérique. La pression est augmentée lentement dans la chambre jusqu'à la valeur pour laquelle la sève apparaît à la surface de la section (observation avec la binoculaire).

3.3.2.3. Potentiel osmotique (Ψ_π)

Le potentiel osmotique du grec (*osmose* = *poussée*) tend à faire pénétrer l'eau du milieu hypotonique vers le milieu hypertonique. Le potentiel osmotique

ψ_o : dépend de la concentration des solutés dans les cellules. Les valeurs de Ψ_π sont calculées par :

Eq. 7 $\Psi_\pi = - RT\Theta = - RT N_s/V$, avec N_s nombre de moles de solutés, V , volume d'eau.

Les échantillons sont dosés à l'aide d'un osmomètre (**WESCOR-INC**). Le principe de la mesure est celui du point de rosée. Les mesures sont effectuées sur la ½ feuille restante au cours des prélèvements effectués lors des mesures de la TRE et introduite dans un eppendorf, l'ensemble est alors placé dans l'azote liquide et conservé à -20°C. La décongélation des échantillons permet d'extraire le contenu cellulaire et ceci en pressant l'échantillon décongelé. 10µl de l'extrait sont utilisés pour imprégner des petits disques de papiers filtre de 6 mm de diamètre qui sont insérés dans la chambre à échantillon de l'appareil dont la fermeture déclenche automatiquement la séquence de mesure qui dure 80 secondes. Les valeurs affichées par l'osmomètre concernent la concentration des jus extraits de nos échantillons exprimée en (Θ , en milliosmol/kg). La valeur du potentiel osmotique au prélèvement (π) est alors calculée : $\Psi_\pi = - RT\Theta$. Avec Θ : en osmol/kg ; π en Mpa, $R = 8.3143 \cdot 10^{-3} \text{ MPa.l.K}_-1.\text{mol}^{-1}$; T : température en °K.

Avant toute mesure on procède à l'étalonnage de l'appareil. Cette opération est effectuée à 25°C à l'aide de solution standard de NaCl à concentrations connues. L'étalonnage de l'appareil est répété après chaque série de mesures.

Cette méthode, permettant de mesurer Ψ_π , présente l'inconvénient de sous estimer la valeur réelle de π . En effet, lors de l'extraction, le contenu cellulaire est dilué par l'eau apoplastique (Maury, 1997). La valeur de Ψ_π peut être corrigée en tenant compte de la dilution par la fraction d'eau apoplastique (A_p):

$$\text{Eq. 8 : } \Psi_\pi = \Psi_\pi / (1 - A_p/TER)$$

Sachant que la fraction de l'eau apoplastique (A_p) du tournesol est estimée à 15% (Maury 1997).

3.3.2.4. *Pression de turgescence*

Le potentiel de pression Ψ_p d'un système dépend des forces de pression externes ou locales qui agissent sur les molécules d'eau, et ses valeurs sont positives ou négatives lorsque la pression est respectivement supérieure ou inférieure à la pression atmosphérique. Dans le cas des cellules végétales, la paroi pectocellulosique, en s'opposant aux augmentations de volumes cellulaires, induit un excès de pression hydrostatique, ou pression de turgescence (P), à l'intérieur de la cellule. Cette pression toujours positive ou nulle, s'équilibre avec la pression exercée par la paroi sur le contenu cellulaire, appelée pression de paroi. Les variations de pression de turgescence sont liées aux variations de volume cellulaire par le module d'élasticité de parois cellulaires. Lors de la déshydratation, la pression de turgescence s'annule lorsque le contenu cellulaire n'induit pas de déformation de la paroi ; la cellule est dite plasmolysée. La pression de turgescence, dont dépendent plusieurs processus physiologiques (ouverture et fermeture des stomates, croissance cellulaire....) est calculée à partir de la mesure du potentiel hydrique et de celle du potentiel osmotique :

$$\text{Eq. 9} \quad \Psi_p = \Psi - \Psi_\pi$$

3.3.2.5. *Ajustement osmotique*

L'ajustement osmotique est calculé par la différence de π à pleine turgescence entre les plantes bien arrosées et les plantes ayant subi un stress hydrique. Suite à la réhydratation de la feuille lors des mesures de teneur relative en eau, une partie de la feuille est prélevée et introduite dans un eppendorf et l'ensemble est alors placé dans l'azote liquide et conservé à -20°C, après décongélation en pressant l'échantillon on collecte l'extrait du contenu cellulaire, et l'on prélève 10 μ l de cette solution. Cet échantillon est alors dosé à l'aide de l'osmomètre pour déterminer l'osmolarité et le potentiel osmotique à saturation en eau (π_{100}) est alors calculé. La capacité d'ajustement osmotique (AO) est alors obtenue comme suit :

$$\text{Eq. 10} \quad \mathbf{AO} = \pi_{100t} - \pi_{100S}$$

Avec : \mathbf{AO} : ajustement osmotique ; π_{100t} : potentiel osmotique de l'échantillon témoin après réhydratation ; π_{100S} : potentiel osmotique de l'échantillon stressé après réhydratation.

3.4. Méthodes d'analyse génétique

3.4.1. Variabilité génétique et gain génétique

Les analyses de variance des données de la population des lignées recombinantes (RILs) ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 14.0. Le gain génétique (GG) est obtenu pour les différents caractères à partir de la différence des moyennes entre les 10% des meilleures RILs sélectionnées et celle des deux parents.

3.4.2. Détection des QTLs pour les LIR

La recherche de QTLs a été effectuée grâce au logiciel WINQTL CART version 2.5 en utilisant le modèle 6 (CIM : Composit Interval Mapping) (Wang *et al.*, 2005). Ce modèle prend en considération deux paramètres : le nombre de marqueurs qui contrôlent le fond génétique et la taille de la fenêtre qui limite des deux côtés des marqueurs flanquant le site testé. Cette procédure rend l'analyse plus sensible à la présence de QTLs dans l'intervalle ciblé. A chaque intervalle, le degré de signification des associations entre mesures et marqueurs est estimé par le LRS (Likelihood Ratio Statistic) traduit comme le rapport statistique de vraisemblance (Haley et Knott, 1992). Ce rapport correspond statistiquement au test χ_2 (Manly et Olson, 1999). Dans cette étude, le nombre de marqueurs pour contrôler le fond génétique était fixé à 15 ($nm = 15$) et la taille de la fenêtre à 15 cM ($w = 15$). Cette analyse de QTLs a été conduite à partir de la carte génétique développée au laboratoire biotechnologies et amélioration des plantes basée sur 191 SSRs et 304 AFLPs (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007).

3.4.3. Identification de marqueurs individuels

L'association entre les marqueurs d'AFLP et les caractères étudiés dans la population de mutants a été estimée par analyse de variance ou analyse de régression multiple par étapes, où les caractères ont été traités comme variables dépendantes tandis que les marqueurs d'AFLP étaient traités en tant que variables indépendantes (Vijayan *et al.*, 2006).

4. Variabilité génétique et identification de QTLs liés à des caractères morphologiques et agronomiques chez le tournesol sous différents traitements hydriques.

4.1. Introduction

Le tournesol (*Helianthus annuus L.*) est l'une des plus importantes sources d'huile végétale dans le monde. L'identification de facteurs génétiques affectant des traits agronomiques majeurs chez le tournesol peut aider dans l'amélioration des méthodes de sélection.

L'amélioration variétale est basée sur la sélection de caractères d'intérêt, rendue possible grâce à la variabilité phénotypique exprimée pour ces caractères dans des conditions environnementales particulières. L'efficacité de la sélection dépend de la variabilité phénotypique des caractères que l'on veut améliorer mais également de leur héritabilité (Falconer et Mackay, 1996 ; Burke *et al.*, 2005). Or la majorité des composantes du rendement comme d'autres traits quantitatifs sont contrôlés par plusieurs loci avec des gènes ayant des effets additifs et non additifs, et une large interaction 'génotype et environnement' (Fick, 1978 ; 1997 ; Alza et Fernandez-Martinez, 1997).

En effet, l'héritabilité du rendement en grains est généralement faible (0.23), comparée à celle d'autres caractères agronomiques comme le poids de 1000 graines (0.55), la précocité (0.32) et le pourcentage d'huile des graines (0.57) (Mokrani *et al.*, 2002). Les progrès pour l'amélioration du rendement et de sa stabilité au travers de la sélection directe se trouvent donc ralentis à cause de sa faible héritabilité, particulièrement en période de sécheresse (Blum, 1988; 1989; Ceccarelli et Grando, 1996 ; Tuberoza *et al.*, 2002). En effet, la sécheresse est considérée comme le facteur le plus limitant de la croissance et de la productivité des plantes cultivées, en ralentissant le taux de division et d'expansion des cellules principalement en raison d'une perte de turgescence liée à l'altération de l'état hydrique cellulaire. De même, le tournesol est particulièrement sensible à la sécheresse lors des périodes d'apparition du bouton floral (R1) et de la floraison. Dans plusieurs travaux sur le tournesol, la contrainte hydrique a été appliquée, dès le stade bouton floral (R1) (Pankovic *et al.*, 1999 ; Maury *et al.*, 2000).

Le rendement en grains, chez le tournesol, est sous la dépendance de plusieurs paramètres, et plus précisément de composantes du rendement qui sont souvent modifiées par l'environnement et les conditions de culture (Tuttobene *et al.*, 2000 ; Lanceras *et al.*, 2004). Les études génétiques montrent que la teneur des graines en huile, ainsi que les composantes du rendement sont contrôlées principalement par les gènes à effet additif (Gupta et Khanna, 1982; Bedov, 1985 ;Ludlow et Muchow, 1990 ; Micic *et al.*, 2005; Ebrahimi *et al.*, 2008). La précocité de floraison est également un critère extrêmement important dans les programmes d'amélioration, du fait de la grande sensibilité du rendement aux conditions environnementales notamment de la floraison à la maturité. La précocité de floraison est un caractère fortement héritable avec des valeurs pouvant aller de 0.62 à 0.95 (Jan et Rutger, 1988). Ce caractère est principalement contrôlé par des gènes à effet additif (Alvarez *et al.*, 1992; El-Hity, 1992). La nature polygénique de la précocité a été également démontrée par Stoenescu (1974) et Machacek (1979). Ces résultats ont été confirmés par l'identification de QTLs à partir d'analyses moléculaires (Mestries *et al.*, 1998; Leon *et al.*, 2000; 2001 ; Al-Chaarani *et al.*, 2004 a).

Les progrès des études réalisées sur l'analyse des génomes des plantes a rendu possible l'examen des variations alléliques permettant de comprendre des caractères aussi complexes que le rendement. Plusieurs études ont été entreprises pour trouver des variations génétiques liées aux traits agronomiques chez le tournesol, et des QTLs contrôlant les composantes du rendements et les caractères morphologiques ont été identifiés chez des lignées recombinantes de tournesol (Al Chaarani *et al.*, 2004 a) ainsi que chez des populations F2/F3 (Mokrani *et al.*, 2002 ; Bert *et al.*, 2002 a). Cependant, les études citées plus haut ont été conduites sous conditions irriguées à notre connaissance il n'a pas été reporté dans la littérature d'études sur l'identification de QTLs de caractères morphologique et agronomiques en conditions de contraintes hydriques chez le tournesol.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif de cette étude qui vise à identifier des QTLs dans une population de lignées recombinantes pour des caractères morphologiques et agronomiques dans des conditions de contraintes hydriques. La carte génétique du laboratoire de biotechnologie et amélioration des plantes de INP-ENSA de Toulouse a été utilisée pour cette étude (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007).

Les résultats ont fait l'objet de l'article suivant :

Premier article :

Poormohammad Kiani S., Maury P., Nouri L., Ykhlef N., Grieu P. et Sarrafi A. (2009) : QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding*. **128**, 363-373.

QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments

S. POORMOHAMMAD KIANI^{1,2,3}, P. MAURY¹, L. NOURI¹, N. YKHFLEF¹, P. GRIEU¹ and A. SARRAFI^{2,4}

¹INP-ENSAT, INRA, UMR 1248, Agrosystèmes & Développement Territorial, F-31326 Castanet Tolosan; ²INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), F-31326 Castanet Tolosan, France; ³Present address: Station de Génétique et Amélioration des Plantes (SGAP), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Route de Saint Cyr, 78026 Versailles, France; ⁴Corresponding author, E-mail: sarrafi@ensat.fr

With 2 figures and 4 tables

Received July 23, 2008/Accepted December 4, 2008

Communicated by R. Tuberosa

Abstract

A set of sunflower recombinant inbred lines (RILs) was used to study agronomical traits under greenhouse and field conditions each with two water treatments and three replications. The difference among RILs was significant for all the traits studied in all conditions; and water treatment \times RILs interaction was also observed for most of the traits in both field and greenhouse conditions. Because of the low rate of drought stress, this part of field data are not informative. Several quantitative trait loci (QTLs) were identified for yield-related traits with the percentage of phenotypic variance explained by QTLs (R^2) ranging from 4% to 40%. Several QTLs for grain yield per plant (GYP) under four water treatments were identified on different linkage groups, among which two were specific to a single treatment (*GYPN.4.1*, *GYP1.7.1*). Three QTLs for GYP were overlapped with several QTLs for drought-adaptative traits detected in our previous study (Poormohammad Kiani et al. 2007b). The whole results do highlight interesting genomic regions for marker-based breeding programmes for drought tolerance in sunflower.

Key words: sunflower — water stress — grain yield — QTL — yield-related traits

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most important sources of vegetable oil in the world. Identification of genetic factors affecting agronomic and economically important traits in sunflower could help to improve breeding methods. Yield components as well as other quantitative traits are controlled by several genetic loci with additive and non-additive gene actions, and genotype \times environment interactions are important components of variance decreasing their heritability (Fick 1978, Fick and Miller 1997).

Progress in increasing yield and its stability through a direct selection has been hampered by the low heritability of yield, particularly under drought and by its large genotype \times environment interaction (Blum 1988, Ceccarelli and Grandi 1996, Tuberosa et al. 2002). As an alternative to the direct selection for yield under drought conditions, morpho-physiological traits genetically correlated with yield, have been targeted in selection programmes pursued in collaboration between physiologists and breeders (Blum 1988, Chimenti et al. 2002, Tuberosa et al. 2002). Correlation coefficients have been used by many researchers in determining interrelationships between seed yield and other characters in sunflower under both well-watered and drought conditions (Feres et al. 1986, Alza and Fernandez-Martinez 1997, Chimenti et al. 2002, Flagella et al. 2002).

Feres et al. (1986) showed that physiological traits responsible for drought tolerance were not correlated with yield

potential in sunflower, indicating that both can be combined in improved cultivars. Chimenti et al. (2002) demonstrated that osmotic adjustment (OA), a parameter directly related to drought tolerance, contributes to yield maintenance of sunflower under pre-anthesis drought conditions. However, the capacity of sunflower for OA was different depending on genotype (Maury et al. 1996). Gimenez and Fereres (1986) and Prieto Iosada (1992) showed that duration of leaf area is related to rainfed sunflower yield. The yield differences were also associated with variation in total biomass (BIO) (Alza and Fernandez-Martinez 1997). However, these phenotypic relationships have not been shown at molecular level, i.e. by mapping quantitative trait loci (QTLs) for yield and morpho-physiological traits in the same mapping population.

Progress in plant genome analysis has made it possible to examine naturally occurring allelic variation underlying complex traits such as yield. There are several reports, especially over the last years that deal with drought tolerance on the physiological and molecular levels in sunflower (Poormohammad Kiani et al. 2007a,b, 2008). Many studies have been undertaken to find genetic variation in agronomical traits in sunflower, and QTLs controlling yield components and morphological traits have been identified in sunflower RILs (Rachid Al-Chaarani et al. 2004) or F_2/F_3 populations (Mokrani et al. 2002, Bert et al. 2003). However, the studies mentioned above have been conducted under well-watered conditions and to our knowledge QTL mapping of agronomical traits and yield in sunflower under drought conditions has not been reported in literature.

The objectives of the present study were to identify QTLs in a population of RILs for yield-related traits by using our recently saturated simple sequence repeat (SSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) linkage map (Poormohammad Kiani et al. 2007b), and to compare QTLs controlling these traits in controlled (greenhouse) and natural (field) well-watered and water-stressed conditions.

Materials and Methods

Plant materials and genetic linkage map: The characteristic of mapping population (RILs) and their parents (PAC2 and RHA266) used in the present study has been explained in detail in our previous study (Poormohammad Kiani et al. 2007b). Briefly, the mapping population was developed through single seed descent from F_2 plants derived from a cross between PAC2 and RHA266 and a map was constructed with 304 AFLP and 191 SSRs. Both parental lines (PAC2 and RHA266) are

public inbred lines of sunflower (Zhang et al. 2005). RHA266 is a branched restorer inbred line, obtained from a cross between wild *H. annuus* and *Peredovik* by USDA and PAC2 is a non-branched restorer inbred line obtained from a cross between *H. petiolaris* and 'HA61' by INRA-France (Gentzbittel et al. 1994, 1995). RHA266 is a branched line with higher values for yield, 1000-grain weight and oil percentage compared with PAC2 (Gentzbittel et al. 1995, Rachid Al-Chaarani et al. 2004). The recent map from the cross PAC2 × RHA266 (Poormohammad Kiani et al. 2007b), was used in the present work for identification of QTLs for yield-related traits under different water treatments.

Greenhouse experiment: A population of 78 RILs were randomly selected and grown together with their parents (PAC2 and RHA266) in the greenhouse under controlled conditions. Plants were individually grown in plastic pots (4.0 l) containing a mixture of 40% soil, 40% compost and 20% sand. Temperature was maintained at $25/18 \pm 2^\circ\text{C}$ (day/night) and relative humidity was about $65\text{--}85 \pm 5\%$. Supplementary light giving an approximately 16-h light and 8-h dark period was maintained during experiment.

A split-plot experimental design with three blocks was used with water treatments (well-watered and water-stressed) as the main plot factor and genotypes (RILs and parental lines) as sub-plot factor. The RILs and their two parents were randomized within each treatment-block combination. To simulate water deficit conditions similar to field, a progressive water stress was imposed at stage near flower bud formation (R1, Scheiner and Miller 1981) by decreasing progressively the irrigation to 30% field capacity during 12 days. Both well-watered and water-stressed plants were weighed and water lost replaced carefully. Well-watered (control) plants received sufficient water to maintain soil water content close to field capacity. Water-stressed plants were subjected to a progressive water stress and irrigated with a water volume of 60%, 50%, 40% and 30% of field capacity (each for 3 days) during 12 days. Water-stressed plants were then irrigated at 30% of field capacity until harvest.

Field experiment: Two experiments were undertaken in the field conditions during April–September in 2005 with irrigated and non-irrigated (rain fed) water treatments and three replications per each water treatment. Both irrigated and non-irrigated experiments were located in the same field to have the same condition with a distance sufficient enough to not allow water to reach non-irrigated field. The experiment consisted of a split-plot design with three replications. The main plot contains water treatments (irrigated and non-irrigated) and genotypes (RILs and parental lines) were considered as sub-plot. A population of 100 RILs comprising 78 RILs used in the greenhouse experiment, together with their parents was sown in each water treatment with three replications. Each replication consisted of two rows 4.6-m long, with 50 cm between rows and 25 cm between plants in rows, giving a total number of about 32 plants per plot. The so-called 'irrigated' field was irrigated two times at two critical stages, just before flowering (33 mm) and at about grain filling (44 mm), according to sunflower irrigation programme determined by INRA-France for the region (Fig. 1). A sprinkler irrigation system was used because of the uniformity of water application. The 'rainfed' experiment was not irrigated. Three plants per genotype per water treatments were randomly chosen for evaluation of the studied traits.

Trait measurements: Days from sowing to flowering (DSF) were recorded when individual plants in greenhouse and 50% of the plants per plot in the field were at anthesis. Leaf number per plants (LN), plant height (PH) and leaf area were measured at flowering stage. Leaf length (*L*) and width (*W*) of all green leaves were measured in both well-watered and water-stressed conditions at flowering stage, and total leaf area at flowering (LAF) was calculated with the formula: $LAF = \sum 0.7L \times W$ (Alza and Fernandez-Martinez 1997). Green leaf area of the plants was determined weekly from flowering to harvest to evaluate green leaf area with respect to time. An integral of weekly leaf

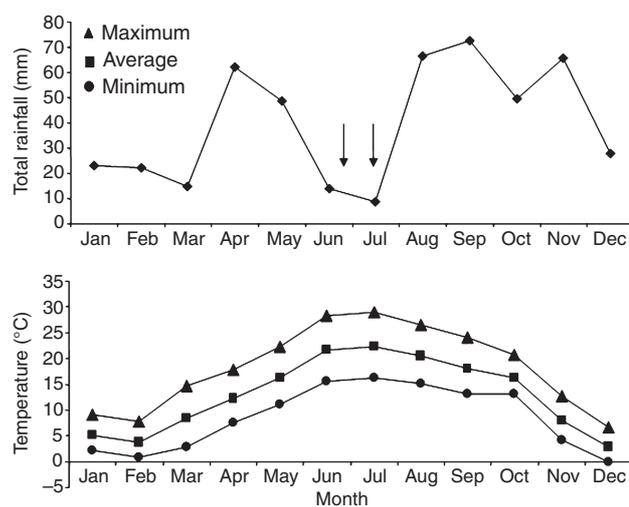


Fig. 1: Total monthly rainfall and the minimum, maximum and average of temperature for the year 2005 at INRA experimental field – Toulouse, France. The arrows show the date of first (33 mm) and second (44 mm) supplementary irrigation for 'irrigated' experiment determined by INRA. Sprinkler irrigation systems was used for irrigation because of the uniformity of water application

area was considered as being an estimate of leaf area duration (LAD, $\text{cm}^2 \text{ days}$). At maturity, total dry matter 'BIO' per plant and head weight per plant (HW) were determined for three plants per genotype per water treatment. All plants of plots were also harvested at maturity and grain yield per plant (GYP) was determined using whole plot weight divided by the number of plants per plot for all genotypes in each replication and water treatment.

Statistical analysis and QTL mapping: Normality of the different traits was assessed according to the Shapiro and Wilk test (SAS PROC UNIVARIATE). The data were analysed using the SAS PROC GLM as a split-plot experimental design (SAS Institute Inc. 2002). A mixed model with water treatment (main plot factor) as fixed effect and genotypes (sub-plot factor) as random effect, was used for analysis of the data in both greenhouse and field conditions. Correlations between GYP and other traits in each of the four conditions and between genotypes for the same traits across water treatments were determined using SAS PROC CORR (SAS Institute Inc. 2002).

Quantitative trait loci mapping of the studied traits was performed by composite interval mapping (CIM) conducted with QTL Cartographer, version 1.16 (Basten et al. 2002) using mean values of three replications for each RIL in each water treatment and growth condition (field or greenhouse). The genome was scanned at 2-cM intervals with a window size of 15 cM. Up to 15 background markers were used as cofactors in the CIM analysis identified with the programme module Smapqtl (model 6; Basten et al. 2002). A LOD threshold of 3.0 was used for considering a QTL significant (Rachid Al-Chaarani et al. 2004). QTLs for different traits were compared on the base of overlapping support intervals: a decrease in the LOD score of 1.0, determined the end point of support interval for each QTL (Lander and Botstein 1989). Additive effects of the detected QTLs were estimated with the Zmapqtl programme (Basten et al. 2002). The percentage of phenotypic variance (R^2) explained by each QTL was estimated by QTL Cartographer (Basten et al. 2002).

Results

Phenotypic variation and effect of water stress

The yield-related traits except GYP and HW under water-stressed condition in the greenhouse did not show deviation from normal distribution. As normalizing data through

transformation may misrepresent differences among individuals by pulling skewed tails toward the centre of the distribution (Doerge and Churchill 1994, Mutschler et al. 1996), all phenotypic analyses were performed on untransformed data.

Considering all the traits studied in different growth conditions, a high transgressive segregation was observed. Phenotypic variation of RILs and their parents (PAC2 and RHA266) in the greenhouse and in the field under two water treatments are shown in Table 1. Under greenhouse conditions, significant water treatment effect was observed for all of the studied traits except for DSF and the number of leaf per plant (LN). Under field conditions, water stress had significant effect on only HW per plant and GYP. Because of low water stress effect under field conditions, the results obtained from non-irrigated field are similar to those obtained from irrigated field. Therefore, the field data are not very informative for the purpose of this study; but the QTLs identified under field conditions were compared with those identified under greenhouse conditions. The variability was significant for all the traits studied in all conditions. Water treatment \times RILs interaction was observed for most of the traits in both field and greenhouse conditions. Parental lines (PAC2 and RHA266) differed significantly for LAF and LAD under both water treatments in the greenhouse and under rainfed treatment in the field. The difference between parental lines was also significant for PH, BIO and HW under both water treatments in the field.

Correlation analysis

Correlations between GYP and other studied traits together with correlations between water treatments for each trait are summarized in Table 2. High significant correlations were observed between water treatments for the studied traits under both greenhouse and field conditions. GYP was correlated with LAF, LAD, HW and BIO in all four water treatments. GYP was correlated with PH only under field conditions. DSF and the number of leaf per plant (LN) were not correlated with GYP.

QTLs mapping

The map position and characteristics of QTLs associated with the studied traits in the greenhouse and in the field, under two water treatments are summarized in Table 3. The QTLs were designated as the abbreviation of the trait followed by 'W' or 'D' for well-watered or water-stressed in the greenhouse, and by 'I' and 'NI' for irrigated and non-irrigated (rainfed) in the field. The corresponding linkage group and the number of QTLs in the linkage group were also indicated for each QTL. For an easier overview of overlapping QTLs between traits and growth conditions, an image of all QTL regions is presented as Fig. 2.

Two to seven QTLs were found depending on the trait and growth conditions. QTLs explained from 4% to 40% of the phenotypic variance of the traits (R^2), and both parental lines contributed to the expression of the different target traits. Overlapping QTLs were found for different traits on several linkage groups (Table 3 and Fig. 2).

Several QTLs were detected for DSF in four different growth conditions (Table 3 and Fig. 2) and most of them were common across at least two growth conditions. The most important QTL for DSF is located on linkage group 7 where

several QTLs under different growth conditions were co-localized. The positive alleles for these overlapped QTLs come from RHA266. Seventeen QTLs were identified for leaf number per plant (LN) under four growth conditions among which, nine were common across at least two growth conditions and eight were detected under only one condition. Both parental lines contributed almost equally to QTL expression. For LAF, 21 QTLs were detected under four growth conditions, their number being from three to six depending on growth conditions. Among 21 QTLs, nine were detected in only one of the growth conditions and 12 were detected in at least two growth conditions. The phenotypic variance explained by each QTL ranged from 5% to 19%, and both parental lines contributed to positive alleles. As far as LAD is concerned, 22 QTLs were identified under four growth conditions, explaining from 4% to 17% of the total variation. Eleven QTLs were specific to single water treatment and 11 were detected in at least two water treatments. The positive alleles for 17 QTLs come from RHA266 and for five QTLs they come from PAC2. A total of 17 QTLs were detected for PH being six unique QTLs and 11 QTLs that were detected in at least two growth conditions. The QTLs explained from 5% to 23% of phenotypic variance and both parental lines contributed to trait expression. However, RHA266 contributed to positive alleles at 10 QTLs. For total dry matter 'BIO' per plant, 19 QTLs were identified, explaining from 5% to 23% of variation. The number of QTLs in four growth conditions varied from two to six; 13 were detected in only one of the growth conditions and six were common across different growth conditions. RHA266 contributed to positive alleles at 14 of 19 QTLs.

A total of 24 QTL were identified for HW per plant under four growth conditions with the phenotypic variance explained from 4% to 24%. The number of QTLs differed from four to seven depending on the growth condition. Among 24 QTLs, 16 were detected in only one of the growth conditions and eight were common across different water treatments. PAC2 contributed positive alleles at 10 QTLs and RHA266 contributed at 14 QTLs. For GYP, 20 QTLs were identified under four water treatments with the phenotypic variance explained ranging from 4% to 40%. Nine of 20 QTLs were identified in only one growth condition and the rest were common across at least two growth conditions. PAC2 and RHA266 contributed equally to QTLs controlling GYP.

Discussion

Phenotypic variation and the effect of water stress

The effect of water stress under greenhouse conditions was significant for all traits except for DSF and the number of leaf per plant (LN); whereas under field conditions, the effect of water stress was significant only for HW and GYP (Table 1), which suggests that water stress occurred earlier in the greenhouse when compared with field conditions. Under field conditions, a low drought stress rate was occurred because of a wet season in 2005, and the data from field conditions are not useful for the comparison of different water treatments, but they were used for the comparison of the QTL locations identified under greenhouse conditions. Water treatment responses were affected by significant 'genotype \times water treatment' interaction for some traits, suggesting that response to water status by a given genotype in relation to other genotypes varies between water treatments (Table 1). A large genetic

Table 1: Performance of parents (PAC2 and RHA266) and recombinant inbred lines (RILs) across two water treatments, grown under greenhouse (well-watered and water-stressed) and field (irrigated and rainfed) conditions

Condition	Trait	Well-watered (greenhouse)/Irrigated (field)				Water-stressed (greenhouse)/Rainfed (field)				Effect
		PAC2	RHA266	RILs		PAC2	RHA266	RILs		
				Mean	Range			Mean	Range	
Greenhouse	DSF	75.6	77.3	76.9 ± 4.7	65.5–95.1	74.8	72.1	77.7 ± 4.3	63.7–96.7	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{**}
	LN	20.7	23.3	23.8 ± 1.8	17.0–34.6	20.0	24.0	23.2 ± 1.7	17.3–33.3	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
	LAF	2855 ¹	3615	3122 ± 493	1585–4388	1978 ¹	3121	2293 ± 401	1156–3368	W ^{***} , R ^{***} , I ^{NS}
	LAD	83511 ¹	126486	117451 ± 28892	35981–277706	36634 ¹	64464	67653 ± 18948	10906–192630	W [*] , R ^{***} , I ^{***}
	PH	121.0 ¹	112.7	116.1 ± 9.0	77.7–136.0	97.7	94.7	91.8 ± 8.1	60.7–118.3	W [*] , R ^{***} , I ^{***}
	BIO	55.6	50.6	58.6 ± 10.9	37.6–82.9	36.8	36.8	34.0 ± 5.4	25.8–52.8	W ^{**} , R ^{***} , I ^{**}
	HW	14.9	14.4	17.5 ± 5.2	7.3–33.5	9.7	8.7	8.9 ± 2.4	4.6–20.5	W ^{**} , R ^{***} , I ^{NS}
	GYP	6.7	6.6	7.7 ± 2.8	0.6–19.3	4.4	3.0	2.9 ± 1.5	0.0–8.6	W ^{**} , R ^{***} , I ^{***}
	Field	DSF	79.7	74.7	82.7 ± 2.2	74.7–94.7	79.7	74.7	82.7 ± 1.9	74.7–94.7
LN		23.3	23.0	27.1 ± 2.3	17.3–37.7	22.3	22.7	26.5 ± 2.6	17.0–38.0	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
LAF		4380	4501	4317 ± 952	1988–7739	4174 ¹	2556	3932 ± 821	2479–6949	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{**}
LAD		107404 ¹	116188	95506 ± 29168	40753–196143	96108 ¹	67760	92733 ± 26892	43384–185865	W ^{NS} , R ^{***} , I [*]
PH		125.7 ¹	102.3	125.0 ± 11.6	74.3–177.7	119.7 ¹	99.3	122.8 ± 16.6	83.3–158.7	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
BIO		131.7 ¹	103.9	125.9 ± 33.3	48.5–255.4	117.3 ¹	58.9	111.0 ± 32.1	37.9–227.2	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{***}
HW		67.1 ¹	48.7	55.3 ± 2.2	13.8–107.0	43.7 ¹	31.4	48.2 ± 3.7	12.0–117.0	W [*] , R ^{***} , I ^{***}
GYP		26.3	27.6	26.9 ± 2.1	2.3–58.2	16.3	17.4	22.4 ± 1.7	2.7–69.1	W ^{**} , R ^{***} , I ^{***}

NS, non-significant.

***, **, *Significant at 0.001, 0.01 and 0.05 probability level.

¹The significant differences between parental lines.The significance is indicated for water treatment (W), RILs (R) and Water treatment × RILs interaction (I) effects. The traits are: days from sowing to flowering (DSF), leaf number per plant (LN), leaf area at flowering (LAF; cm²), leaf area duration (LAD; cm² days), plant height (PH; cm), total dry matter per plant (BIO; g), head weight per plant (HW; g) and grain yield per plant (GYP; g).

Table 2: Phenotypic correlations between studied traits measured under two different water treatments, and correlations between yield and related traits under greenhouse (well-watered and water-stressed) and field (irrigated and rainfed) conditions

Trait	Greenhouse				Field	
	Well-watered with water-stressed	Grain yield per plant with other trait		Irrigated with non-irrigated	Grain yield per plant with other trait	
		Well-watered	Water-stressed		Irrigated	Non-irrigated
DSF	0.77***	NS	NS	0.99***	NS	NS
LN	0.90***	NS	NS	0.89***	NS	NS
LAF	0.72***	0.24***	0.14*	0.67***	0.45***	0.46***
LAD	0.81***	0.55***	0.41***	0.85***	0.68***	0.59***
PH	0.67***	NS	NS	0.81***	0.37***	0.30***
BIO	0.51***	0.66***	0.36***	0.57***	0.74***	0.74***
HW	0.63***	0.69***	0.69***	0.58***	0.92***	0.91***
GYP	0.65***			0.83***		

NS, non-significant.

***, **, *Significant at 0.001, 0.01 and 0.05 probability level.

The traits are: days from sowing to flowering (DSF); leaf number per plant (LN); leaf area at flowering (LAF; cm²); leaf area duration (LAD; cm² days); plant height (PH; cm); total dry matter per plant (BIO; g); head weight per plant (HW; g) and grain yield per plant (GYP; g).

variation and transgressive segregation was observed for all the studied traits under different water treatments, which could be the result of the accumulation of positive alleles coming from different parental lines. Transgressive segregation has already been observed for drought adaptive traits (Poormohammad Kiani et al. 2007b).

Under greenhouse conditions, water deficit was induced in 45-day-old plants near the stage flower bud formation R1 (Schneiter and Miller 1981), with the 14th true leaf fully expanded. Although the RILs differed for plant size, the difference among RILs for the days from sowing to R1 (water stress initiating date) was not significant. The pots were weighed and water lost replaced carefully in both well-watered and water-stressed conditions to control drought stress carefully regarding each plant size. As plant sizes were taken into account during water stress and there was no significant difference among RILs for growth stage, we suggest that, plant size and/or growth stage could not have introduced experimental error during water-stress period.

Highly significant correlations between performances under two water treatments for the traits studied in both greenhouse and field conditions showed that the phenotypic value under well-watered condition explained a large proportion of the variation for performance under drought (Table 2). This result suggests that selection under well-watered and/or irrigated conditions could partly be effective to improve grain yield and other agronomical traits under water-stressed and/or non-irrigated conditions. The same results have been reported in rice RILs (Zou et al. 2005).

The correlation analysis indicated that DSF and LN were not associated with GYP in both greenhouse and field conditions, and PH was correlated with GYP under only field conditions (Table 2). Rachid Al-Chaarani et al. (2004) also reported that, DSF is not correlated with grain yield in sunflower. HW per plant and BIO per plant were the highest contributing factor to GYP, and LAD was more important than LAF in both greenhouse and field conditions. This indicates that maintaining green leaf area longer after anthesis is important for a high yield production under both water treatments. It has been reported that maintaining green leaf area and consequently a longer duration of photosynthetic activity has contributed to increased yield in most of major crops (Evans 1993, Richards 2000). Genetic differences in photosynthetic duration have also been associated with a

longer grain filling duration and higher yield in maize (Russel 1991).

QTLs for GYP and other traits

The QTLs identified in the present study showed that several putative genomic regions are involved in the expression of the studied traits under four growth conditions (Table 3). The percentage of phenotypic variance explained by the QTLs (R^2) ranged from 4% to 40%. Based on overlapping support intervals, the co-location of QTL for all eight traits in four growth conditions was determined. As two important examples, intervals E38M50_1-HA1848 and E41M62_29-E38M60_8 on linkage group 7 were significantly associated with various traits under different growth conditions (Fig. 2). In these two intervals, the QTLs controlling LN (under irrigated condition), LAF (under two growth conditions), LAD (under two growth conditions), PH (under two growth conditions), DSF (under three growth conditions), HW and BIO (under two growth conditions) were overlapped (Fig. 2). Similarly, several other overlapping QTLs were also observed for the studied traits. These overlapping QTLs indicate the existence of a partly common genetic base for agro-morphological traits. Several QTLs for grain yield under four water treatments were overlapped with the QTL of HW on linkage groups 2 (*GYPN.2.1*), 3 (*GYP1.3.1* and *GYPN.3.1*), 4 (*GYPD.4.1*, *GYP1.4.1* and *GYP1.4.2*), 5 (*GYPW.5.1*) and 10 (*GYPW.10.1*, *GYPN.10.1*) as well as with the QTLs controlling several other traits on linkage groups 3, 4, 5, 9, 10, 13, 14 and 16. However, two individual QTLs specific for yield were also identified on linkage groups 4 (*GYPN.4.1*) and 7 (*GYP1.7.1*) under non-irrigated and irrigated field conditions, respectively.

Identification of QTLs influencing several traits could increase the efficiency of marker-assisted selection (MAS) and enhance genetic progress (Upadaya et al. 2006). The correlations among different traits as well as their co-localization observed are relevant to strive for manipulating multiple traits simultaneously. As we identified genetic markers linked to yield-related traits, indirect selection can be targeted at the presence or absence of markers of interest in breeding lines. However, the QTLs and related markers need to be validated in other genetic backgrounds prior to application in MAS. Some successful MAS have already been reported in rice

Table 3: QTLs detected for yield-related traits under greenhouse and field conditions under two water treatments

Well-watered (greenhouse)						Water-stressed (greenhouse)					Irrigated (field)					Non-Irrigated 'Rainfed' (field)				
Trait	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²
DSF	<i>DSFW.5.1</i>	25.5	8.7	-2.23 ¹	0.13	<i>DSFD.1.1</i>	8.0	7.2	3.02	0.15	<i>DSFI.1.1</i>	66.4	7.5	-1.95	0.14	<i>DSFN.7.1</i>	12.4	3.0	-1.75	0.11
	<i>DSFW.5.2</i>	33.3	5.1	-2.29	0.13	<i>DSFD.7.1</i> ²	12.4	3.5	-2.24	0.07	<i>DSFI.7.1</i>	20.1	6.4	-1.59	0.10	<i>DSFN.7.2</i>	20.7	14.1	-3.22	0.37
	<i>DSFW.6.1</i>	75.6	5.9	-2.24	0.13	<i>DSFD.7.2</i>	20.7	6.2	-2.48	0.09	<i>DSFI.10.1</i>	152.4	5.8	1.85	0.09	<i>DSFN.10.1</i>	152.4	5.4	2.14	0.12
	<i>DSFW.9.1</i>	66.8	8.1	2.10	0.11	<i>DSFD.14.1</i>	105.0	5.4	-2.56	0.10	<i>DSFI.11.1</i>	15.9	8.1	-2.56	0.12	<i>DSFN.11.1</i>	19.4	9.5	-2.00	0.17
	<i>DSFW.15.1</i>	20.1	4.0	1.27	0.05	<i>DSFD.14.2</i>	126.1	3.4	-2.17	0.11	<i>DSFI.14.1</i>	111.4	5.6	-1.27	0.06	<i>DSFN.14.1</i>	111.4	9.9	-2.33	0.24
	<i>DSFW.17.1</i>	38.4	6.1	-1.91	0.09	<i>DSFD.16.1</i>	84.8	5.1	2.032	0.07	<i>DSFI.14.2</i>	126.1	3.1	-1.04	0.04	<i>DSFN.14.2</i>	126.1	5.1	-1.82	0.15
	<i>DSFW.17.2</i>	74.1	9.5	2.62	0.17	<i>DSFD.17.1</i>	133.6	5.8	2.56	0.10	<i>DSFI.17.1</i>	130.8	5.9	1.68	0.12					
LN	<i>LNW.7.1</i>	45.2	3.4	2.05	0.14	<i>LND.3.1</i>	46.3	3.2	0.84	0.05	<i>LNI.3.1</i>	44.3	3.1	1.11	0.05	<i>LNN.3.1</i>	44.3	5.0	2.02	0.10
	<i>LNW.12.1</i>	79.2	3.7	1.59	0.13	<i>LND.5.1</i>	27.3	5.1	-1.58	0.16	<i>LNI.7.1</i>	21.6	14.6	-2.64	0.24	<i>LNN.5.1</i>	25.6	25.6	-1.58	0.05
						<i>LND.14.1</i>	79.0	6.1	-1.28	0.11	<i>LNI.7.2</i>	33.1	8.3	-2.38	0.18	<i>LNN.5.2</i>	87.2	6.0	1.99	0.11
						<i>LND.15.1</i>	24.1	5.1	1.21	0.10	<i>LNI.14.1</i>	66.4	3.4	-1.16	0.04	<i>LNN.7.1</i>	60.7	8.5	-2.58	0.18
										<i>LNI.16.1</i>	99.5	5.7	1.57	0.09	<i>LNN.14.1</i>	66.4	8.6	-2.11	0.12	
															<i>LNN.16.1</i>	101.9	5.1	1.46	0.07	
LAF	<i>LAFW.3.1</i>	17.2	4.2	-144	0.05	<i>LAFD.1.1</i>	25.9	6.0	131	0.09	<i>LAFI.7.1</i>	20.7	4.6	-381	0.09	<i>LAFN.3.1</i>	19.2	3.6	252	0.06
	<i>LAFW.7.1</i>	45.1	5.9	202	0.09	<i>LAFD.9.1</i>	114.0	7.9	-175	0.14	<i>LAFI.11.1</i>	15.9	4.1	-579	0.07	<i>LAFN.5.1</i>	85.2	4.0	303	0.08
	<i>LAFW.9.1</i>	133.7	7.6	229	0.13	<i>LAFD.10.1</i>	103.1	10.4	-188	0.19	<i>LAFI.12.1</i>	79.2	3.4	330	0.07	<i>LAFN.7.1</i>	20.7	7.7	-416	0.15
	<i>LAFW.12.1</i>	79.2	8.0	212	0.11	<i>LAFD.12.1</i>	77.7	5.2	138	0.07					<i>LAFN.7.2</i>	34.7	3.3	-270	0.07	
	<i>LAFW.12.2</i>	94.7	3.6	227	0.12	<i>LAFD.13.1</i>	0.0	7.9	-153	0.10					<i>LAFN.11.1</i>	0.0	3.6	-252	0.07	
	<i>LAFW.13.1</i>	0.0	5.2	-175	0.07	<i>LAFD.17.1</i>	109.5	3.4	-103	0.12					<i>LAFN.13.1</i>	2.0	3.7	-297	0.10	
											<i>LADI.1.1</i>	42.9	4.9	-9573	0.07	<i>LADN.1.1</i>	50.9	3.0	-12005	0.05
LAD	<i>LADW.2.1</i>	33.5	6.5	-22930	0.17	<i>LADD.1.1</i>	26.5	7.3	23318	0.14	<i>LADI.3.1</i>	24.0	4.6	10948	0.10	<i>LADN.7.1</i>	16.1	3.0	-9856	0.05
	<i>LADW.3.1</i>	31.0	5.0	-14681	0.10	<i>LADD.2.1</i>	38.3	3.1	-14258	0.08	<i>LADI.4.1</i>	44.2	10.2	15529	0.16	<i>LADN.10.1</i>	49.6	3.4	-12300	0.07
	<i>LADW.10.1</i>	16.3	7.6	24663	0.17	<i>LADD.3.1</i>	31.6	3.3	-10505	0.07	<i>LADI.6.1</i>	0.0	4.1	-14516	0.15	<i>LADN.12.1</i>	55.8	7.3	15768	0.16
	<i>LADW.10.2</i>	38.8	4.6	-20279	0.12	<i>LADD.9.1</i>	103.9	3.1	-12145	0.05	<i>LADI.7.1</i>	21.6	3.1	-7011	0.04					
	<i>LADW.10.3</i>	49.3	6.3	-25265	0.14	<i>LADD.16.1</i>	22.8	5.7	-13892	0.11	<i>LADI.10.1</i>	0.0	5.0	-14286	0.17					
<i>LADW.16.1</i>	22.8	6.7	-17268	0.12	<i>LADD.17.1</i>	112.1	5.4	-13218	0.11											
PH	<i>PHW.9.1</i>	125.7	3.0	4.56	0.15	<i>PHD.1.1</i>	45.7	7.8	5.06	0.13	<i>PHI.4.1</i>	44.2	4.0	5.04	0.05	<i>PHN.7.1</i>	12.4	4.7	-6.63	0.12
	<i>PHW.15.1</i>	24.1	3.4	4.35	0.14	<i>PHD.2.1</i>	22.7	4.9	-8.13	0.20	<i>PHI.7.1</i>	14.4	3.9	-6.11	0.08	<i>PHN.7.2</i>	20.6	12.3	-9.19	0.22
						<i>PHD.9.1</i>	116.0	10.4	-6.74	0.20	<i>PHI.7.2</i>	20.6	10.1	-8.72	0.17	<i>PHN.7.3</i>	33.1	9.5	-8.74	0.20
						<i>PHD.13.1</i>	18.4	8.4	-7.16	0.23	<i>PHI.7.3</i>	34.7	4.2	-5.94	0.08	<i>PHN.11.1</i>	8.0	4.6	-5.45	0.09
						<i>PHD.14.1</i>	79.0	3.9	-3.90	0.08	<i>PHI.11.1</i>	11.3	3.1	-4.58	0.05	<i>PHN.16.1</i>	142.3	4.5	5.79	0.08
BIO	<i>BIOW.1.1</i>	66.4	3.3	3.18	0.07	<i>BIOD.1.1</i>	61.6	3.3	1.87	0.11	<i>BIOI.3.1</i>	0.0	4.9	-13.60	0.09	<i>BION.1.1</i>	50.9	4.8	-16.13	0.07
	<i>BIOW.10.1</i>	38.8	3.1	-4.03	0.09	<i>BIOD.13.1</i>	0.0	4.5	0.39	0.15	<i>BIOI.3.2</i>	21.2	6.5	14.53	0.14	<i>BION.7.1</i>	12.4	4.3	-12.04	0.08
	<i>BIOW.10.2</i>	49.3	9.2	-5.28	0.20						<i>BIOI.7.1</i>	20.7	4.7	-12.65	0.08	<i>BION.7.2</i>	20.1	6.8	-14.51	0.16
	<i>BIOW.12.1</i>	10.9	3.2	-2.89	0.06						<i>BIOI.7.2</i>	34.7	3.1	-10.49	0.05	<i>BION.7.3</i>	34.7	5.0	-12.51	0.08
	<i>BIOW.12.2</i>	79.2	7.3	4.45	0.16						<i>BIOI.8.1</i>	52.5	4.5	-13.74	0.08	<i>BION.10.1</i>	170.7	5.5	-16.81	0.08
	<i>BIOW.16.1</i>	169.5	4.1	-6.68	0.23						<i>BIOI.10.1</i>	135.9	3.0	-14.33	0.05					
HW	<i>HWW.5.1</i>	86.9	4.3	1.47	0.17	<i>HWD.1.1</i>	64.4	11.5	1.52	0.24	<i>HWI.3.1</i>	0.0	6.3	-7.53	0.10	<i>HWN.2.1</i>	100.6	4.9	-5.36	0.07
	<i>HWW.6.1</i>	80.0	4.3	-1.47	0.15	<i>HWD.4.1</i>	80.6	5.4	0.93	0.13	<i>HWI.3.2</i>	19.2	5.1	5.59	0.06	<i>HWN.3.1</i>	21.2	5.4	6.93	0.08
	<i>HWW.10.1</i>	38.8	3.1	-1.72	0.13	<i>HWD.6.1</i>	79.7	4.5	-1.26	0.17	<i>HWI.4.1</i>	44.2	9.7	8.67	0.13	<i>HWN.7.1</i>	16.1	6.0	-6.24	0.08
						<i>HWD.10.1</i>	169.4	5.6	-1.17	0.11	<i>HWI.8.1</i>	48.1	4.9	-6.26	0.06	<i>HWN.10.1</i>	49.4	3.3	-5.51	0.05
						<i>HWD.16.1</i>	91.3	7.8	-1.19	0.15	<i>HWI.10.1</i>	135.9	7.0	-7.69	0.10	<i>HWN.10.2</i>	170.6	5.5	-8.33	0.09
					<i>HWD.16.2</i>	143.0	6.9	1.15	0.14	<i>HWI.12.1</i>	19.1	6.2	-6.82	0.08	<i>HWN.14.1</i>	99.9	7.4	7.95	0.10	
										<i>HWI.14.1</i>	118.4	4.4	5.24	0.05	<i>HWN.14.2</i>	122.1	4.0	-5.12	0.04	
GYP	<i>GYPW.5.1</i>	87.5	4.0	1.87	0.20	<i>GYPD.4.1</i>	80.5	10.6	0.90	0.19	<i>GYPI.3.1</i>	21.2	4.4	3.59	0.07	<i>GYPN.2.1</i>	98.6	9.2	-5.75	0.19
	<i>GYPW.10.1</i>	49.3	4.9	-1.99	0.16	<i>GYPD.9.1</i>	116.1	10.0	0.90	0.19	<i>GYPI.4.1</i>	44.2	4.2	3.81	0.06	<i>GYPN.3.1</i>	19.2	3.5	2.51	0.04
	<i>GYPW.14.1</i>	73.8	15.6	1.68	0.40	<i>GYPD.13.1</i>	0.0	3.3	0.49	0.05	<i>GYPI.4.2</i>	83.8	4.1	3.17	0.06	<i>GYPN.4.1</i>	50.2	5.6	3.37	0.09
						<i>GYPD.14.1</i>	75.3	4.7	1.14	0.31	<i>GYPI.5.1</i>	29.9	13.9	-7.28	0.27	<i>GYPN.10.1</i>	46.1	11.7	-13.72	0.30
						<i>GYPD.16.1</i>	22.0	6.5	0.89	0.15	<i>GYPI.7.1</i>	51.2	7.3	5.93	0.07	<i>GYPN.14.1</i>	73.3	3.0	2.15	0.04
											<i>GYPI.12.1</i>	23.8	8.9	-6.61	0.17	<i>GYPN.14.2</i>	99.9	5.6	4.31	0.10

The traits are: days from sowing to flowering (DSF), leaf number per plant (LN), leaf area at flowering (LAF; cm²), leaf area duration (LAD; cm² days), plant height (PH; cm), total dry matter per plant (BIO; g), head weight per plant (HW; g) and grain yield per plant (GYP; g). The QTLs were designated as the abbreviation of the trait followed by 'W' or 'D' for well-watered or water-stressed in the greenhouse, and by 'I' and 'NT' for irrigated and non-irrigated (rainfed) in the field.

¹The positive additive effect shows that PAC2 allele increases the trait and negative additive effect shows that RHA266 allele increases the trait.

²The common QTLs across water treatments are shown as *bold-face*.

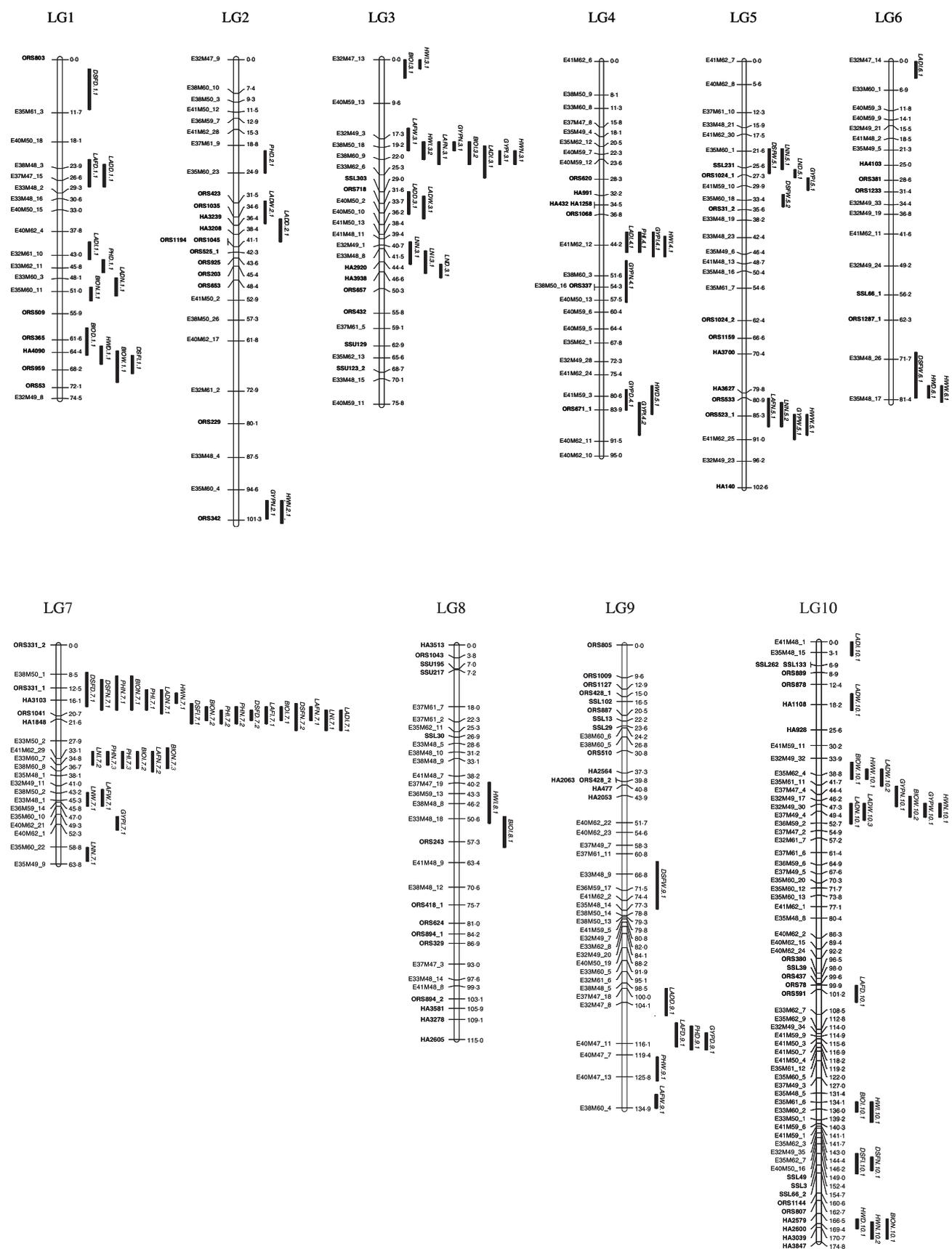


Fig. 2: Genetic linkage map and the positions of QTLs for the studied traits under different conditions. The QTLs were designated as the abbreviation of the trait followed by 'W' or 'D' for well-watered or water-stressed in the greenhouse, and by 'I' and 'N' for irrigated and non-irrigated (rainfed) in the field. The traits are: days from sowing to flowering (DSF), leaf number per plant (LN), leaf area at flowering (LAF), leaf area duration (LAD), plant height (PH), total dry matter per plant (BIO), head weight per plant (HW) and grain yield per plant (GYP)

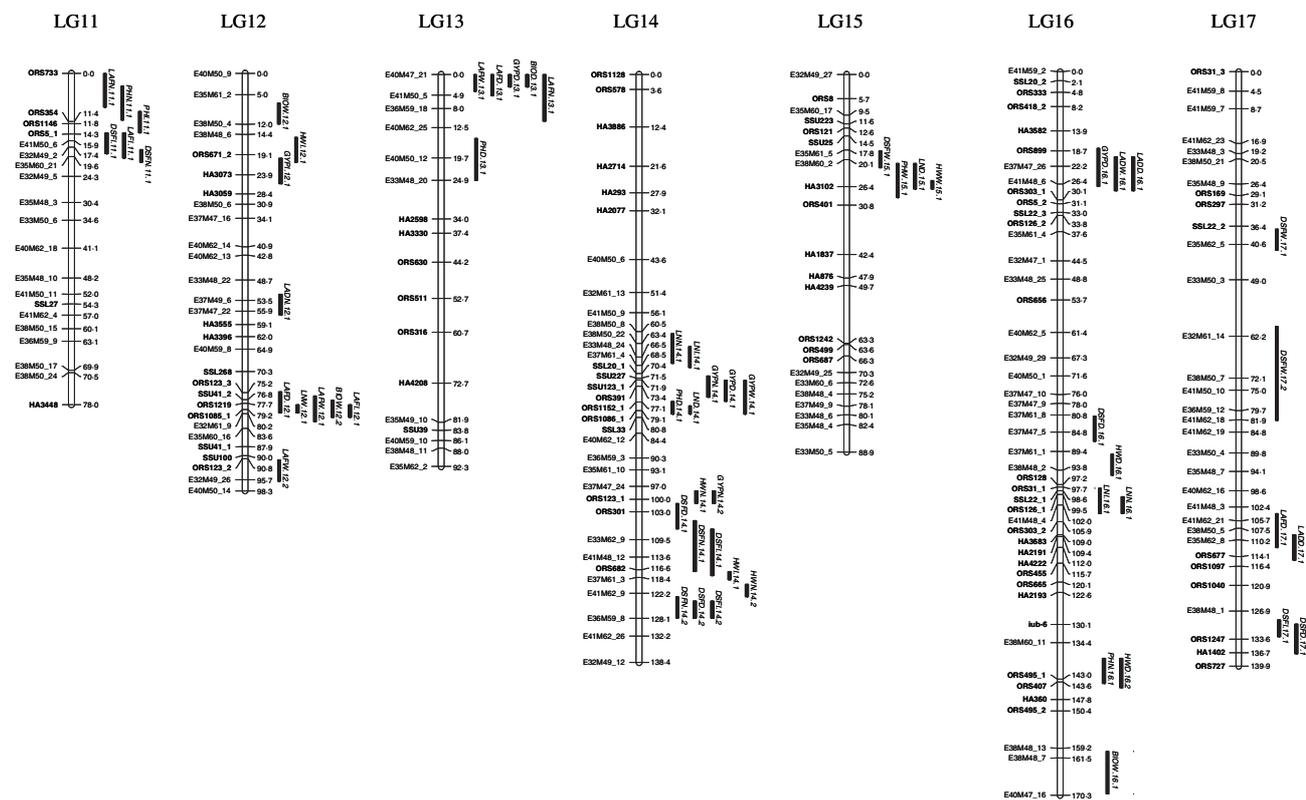


Fig. 2: Continued

breeding programmes. For example, Cho et al. (1994) used molecular markers for selection of semi-dwarf characteristic in rice. Wang et al. (2005) successfully introgressed three QTLs with large effects on spikelet fertility into near isogenic lines using marker-assisted selection. Introgression of QTLs for OA, associated with drought tolerance, has been also achieved in rice by Robin et al. (2003). However, as far as we know, MAS for drought tolerance has not been reported for sunflower in the literature.

QTLs identified for a given trait under several growth conditions

Some QTLs are associated with the same trait under different growth conditions (greenhouse and field) and/or water treatments (well-watered and water-stressed). For example, the QTLs for BIO, LAD, LAF and LN, located on linkage groups 1 (*BIO1.1* and *BIO1.1*; interval 61.6–66.4 cM), 2 (*LAD2.1* and *LAD2.1*; interval 33.5–38.3 cM) and 3 (*LAF3.2* and *LAF3.1*; *LNI3.1*, *LNN3.1* and *LND3.1*; intervals 17.2–19.2 and 44.3–46.3 cM) were detected in more than one environment (Fig. 2). Besides these QTLs, several additional QTLs for a given trait in at least two growth conditions were detected on different linkage groups, which shows that some QTLs are detectable under multiple conditions. For GYP 11 of 20 QTLs were detected in two or three growth conditions and nine under only one of the four growth conditions. The QTLs for GYP in two or three growth conditions, are located on linkage groups 3 (*GYP1.3.1* and *GYP1.3.1*), 4 (*GYP1.4.1*, *GYP1.4.2*, *GYP1.4.1* and *GYP1.4.1*), 10 (*GYP10.1* and *GYP10.1*) and 14 (*GYP14.1*, *GYP14.1* and *GYP14.1*). The most consistent QTL for yield, which is linked to SSR marker ORS391, is

located on linkage group 14 (interval 73.3–75.3 cM), which is a relatively major QTL explaining 40%, 31% and 4% of total phenotypic variance of yield in three growth conditions (well-watered and water-stressed treatments under greenhouse and non-irrigated treatment under field conditions, respectively). It was also overlapped with the QTLs controlling LN and PH explaining 11% and 8% of phenotypic variance, respectively, indicating a relationship between grain yield and plant architecture (Fig. 2). This finding was not supported by phenotypic correlation between yield and LN. The positive alleles for the QTLs controlling yield in this region come from PAC2 and for QTLs conferring PH and LN, the positive alleles come from RHA266. This DNA region could be important in marker-based selection for grain yield, as it was detected in three different growth conditions (Fig. 2).

In the previous study, QTLs controlling plant water status traits and OA were mapped in the same mapping population under well-watered and water-stressed conditions (Poormohammad Kiani et al. 2007b). Comparing the QTLs found in the present study for grain yield and agro-morphological traits with those previously reported, overlapping QTL indicates a physiological link between plant water status, OA and agronomical traits (Table 4). However, increasing the map resolution would be necessary to determine if this physiological link is because of pleiotropy or tight linkage. Some of the overlapped QTLs were located practically at the same positions. As an example on linkage group 5, four overlapped QTLs detected in the present study for GYP, LN and LAF, (*GYP5.1*, *HWW5.1*, *LNN5.2* and *LAF5.1*) has been previously detected as the most important DNA region for plant water status traits, such as relative water content (RWC) in well-watered and water-stressed conditions as well as for

Table 4: QTLs controlling agronomical traits under four growth conditions identified in the present study, which are overlapped with QTLs for plant water status and osmotic adjustment identified in our previous study (Poormohammad Kiani et al. 2007b)

Linkage group	Agronomical traits in the present study	Water status traits and osmotic adjustment (Poormohammad Kiani et al. 2007b)	Overlapped QTLs
LG1	Leaf area at flowering	Turgor potential (Ψ_t),	'LAFD.1.1', 'LADD.1.1' 'TP.WS.1.1',
LG5	Leaf area duration	Osmotic potential (Ψ_s)	'OP.WS.1.1'
LG5	Days from sowing to flowering	Osmotic potential (Ψ_s)	'DSFW.5.2', 'OP.WS.5.2'
LG5	Grain yield per plant	Osmotic adjustment (OA),	'YPW.5.1', 'LNN.5.2', 'LAFNN.5.1',
LG5	Head weight per plant	Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}),	'HWW.5.1', 'OA.5.2', 'OPF.WS.5.1',
LG5	Leaf number per plant	Relative water content (RWC),	RWC.WS.5.1', 'RWC.WW.5.1',
LG5	Leaf area at flowering	Leaf water potential (Ψ_w)	'LWP.WS.5.1'
LG6	Leaf area duration	Relative water content (RWC),	'RWC.WW.6.1', 'TP.WW.6.1',
LG7	Several traits (Fig. 2)	Turgor potential (Ψ_t)	'LADI.6.1'
LG7	Leaf number per plant	Turgor potential (Ψ_t)	'Several QTLs (Fig. 2)', 'TP.WS.7.1'
LG7	Leaf number per plant	Leaf water potential (Ψ_w),	'LWP.WS.7.1', 'RWC.WS.7.1',
LG7	Leaf number per plant	Relative water content (RWC)	'LNN.7.1'
LG9	Days from sowing to flowering	Leaf water potential (Ψ_w)	'DSFW.9.1', 'LWP.WS.9.1'
LG12	Grain yield per plant	Turgor potential (Ψ_t),	'YPI.12.1', 'HWI.12.1',
LG12	Head weight per plant	Osmotic adjustment (OA)	'TP.WW.12.1', 'OA.12.1', 'OA.12.2'
LG13	Plant height	Osmotic adjustment	'PHD.13.1', 'OA.13.1'
LG16	Grain yield per plant	Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}),	'YPD.16.1', 'LADW.16.1',
LG16	Grain yield per plant	Turgor potential (Ψ_t), Leaf water potential (Ψ_w),	'LADD.16.1', 'OPF.WS.16.1',
LG16	Leaf area duration	Relative water content (RWC)	'OPF.WS.16.2', 'OPF.WW.16.1', 'TP.WS.16.1',
LG16	Days from sowing to flowering	Leaf water potential (Ψ_w),	'LWP.WS.16.1', 'RWC.WS.16.1'
LG16	Days from sowing to flowering	Relative water content (RWC),	'DSFD.16.1', 'LWP.WS.16.2', 'RWC.WS.16.2',
LG16	Days from sowing to flowering	Osmotic potential (Ψ_s),	'OP.WS.16.1', 'OPF.WS.16.2'
LG16	Days from sowing to flowering	Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT})	
LG16	Leaf number per plant	Turgor potential (Ψ_t)	'LNI.16.2', 'LNN.16.1'
LG16	Total dry matter per plant (biomass)	Osmotic potential (Ψ_s)	'BIOW.16.1', 'OP.WW.16.1'
LG17	Days from sowing to flowering	Relative water content (RWC)	'DSFW.17.1', 'RWC.WW.17.2', 'RWC.WS.17.1'

leaf water potential, osmotic potential at full turgor and OA (Poormohammad Kiani et al. 2007b).

On linkage group 7, the QTLs controlling LN (under irrigated condition), LAF (under two growth conditions), LAD (under two growth conditions), PH (under two growth conditions), DSF (under three growth conditions), HW and BIO (under two growth conditions) detected in the present study (Fig. 2, Table 4), were overlapped with the QTL controlling turgor potential identified in our previous work (Poormohammad Kiani et al. 2007b). Maintaining turgor potential under drought conditions is necessary for cell division and expansion, and consequently for plant growth and productivity. It has been reported that various biochemical and physiological responses, such as photosynthesis, photochemistry and stomatal conductance under drought conditions depend on turgor potential in sunflower (Turner and Jones 1980, Morgan 1984, Maury et al. 1996, 2000). Therefore, overlapping QTLs for turgor potential and agronomical traits suggest the common genetic basis for turgor maintenance and plant growth and development in this genomic region. Although many other overlapping QTLs are observed on several linkage groups for various drought-adaptive and morphological and developmental traits (Table 4), we are especially interested in relationship between drought-adaptive and productivity QTLs. Three QTLs for GYP identified in the present study are overlapped with several QTLs for drought-adaptive traits. One of them located on linkage group 5 (*GYPW.5.1*), is overlapped with the QTLs for OA (*OA.5.2*), leaf water potential (*LWP.WS.5.1*) and RWC

under both water treatments (*RWC.WW.5.1* and *RWC.WS.5.1*) (Table 4). Another QTL for GYP, located on linkage group 12 (*GYPI.12.1*), is overlapped with one QTL for turgor potential (*TP.WW.12.1*) and two QTLs for OA (*OA.12.1* and *OA.12.2*). Seemingly, the third QTL for GYP, located on linkage group 16 (*GYPD.16.1*) is overlapped with the QTLs for turgor potential (*TP.WS.16.1*), osmotic potential at full turgor (*OPF.WS.16.2* and *OPF.WW.16.1*), leaf water potential (*LWP.WS.16.1*) and RWC (*RWC.WS.16.1*) (Table 4).

We have shown a partly common genetic basis for plant water status, OA and productivity. Detailed characterization of these genomic regions through the development and evaluation of near-isogenic lines will lead to an improved understanding of drought tolerance and might set the stage for the positional cloning of drought tolerance genes. Prior results of plant water status and OA have been largely based on phenotypic association with yield under drought stress in sunflower (Chimenti et al. 2002). Overlapping QTLs for water status traits, OA and productivity has been observed in cotton (Saranja et al. 2004) and barley (Teulat et al. 1998).

In the present study, a mapping population was evaluated for agronomical traits under greenhouse and field conditions each with two water treatments. Using the same mapping population under different water regimes helped us on the identification of consistent genomic regions (QTL) from those expressed under specific conditions for several agronomical and yield-related traits. Although QTLs induced only by drought may be associated with mechanism(s) of sunflower

drought response, we suppose that the QTLs that can reduce trait difference between well-watered (irrigated) and water-stressed (non-irrigated) conditions should have an effect on drought tolerance because of their contribution to trait stability. Therefore, the QTLs, which are common across water treatment are of more interest and most useful for MAS. Regarding to these points, the most stable genomic region controlling yield is located on linkage groups 14 (SSR marker: ORS391), where three QTLs for yield under three water treatments were overlapped.

One of the major goals for plant breeders is to develop genotypes with high yield potential and the ability to be stable across environments. There are two main ways in which a cultivar can achieve stability. The first one is identification of the non-environment-specific QTLs or QTLs with minor interaction with environments (as those located on linkage group 14), which should be particularly useful in MAS for yield. The second is the development of widely adapted cultivars by pyramiding different QTLs each controlling adaptation to a different range of environments (as nine environment-specific QTLs for yield).

We compared the position of QTLs obtained in the present study with the results obtained by Rachid Al-Chaarani et al. (2004) for yield-related traits using the same mapping population (PAC2 × RHA266) under well-watered conditions. According to the authors, the most important DNA regions controlling thousand grain weight and yield are located on linkage groups 4, 6 and 9, which correspond to the linkage groups 7, 5 and 10 in the present study with public common linkage group nomenclature. One QTL for yield reported by Rachid Al-Chaarani et al. (2004) on linkage group 6 was confirmed in the present study on the corresponding linkage group 5 (*GYP1.5.1*). Their two other QTLs are co-located with the QTLs controlling biomass on linkage groups 7 (*BION.7.3* and *BIOI.7.2*) and 10 (*BIOW.10.1*) in the present study. The latter, however, is close to two QTLs controlling GYP (*GYPN.10.1* and *GYPW.10.1*).

Another application of QTL analysis is the genetically determination of the trait association by evaluation of overlapping QTLs. In the present study we identified the genomic regions controlling productivity (BIO per plant, HW per plant and GPY), which overlapped with the QTLs previously reported for plant water status and OA (Poormohammad Kiani et al. 2007b). The results showed a partly common genetic basis for physiological traits (plant water status and OA) and grain yield in RILs. The whole results do highlight interesting genomic regions for marker-based breeding programme for drought tolerance in sunflower. Knowledge of the number and likely position of loci for drought adaptive traits and yield can provide the information required to select optimal combinations of alleles by the use of marker-assisted selection. For example, combining the major QTL for yield on linkage group 14 (nearest SSR marker ORS391) with another QTL of yield on linkage group 5 (nearest SSR marker ORS523_1), considering that the latter marker was also linked to the QTLs for several plant water status traits and OA with high phenotypic variance explained, could be beneficial for pyramiding higher grain yield and drought tolerance QTLs in the same genotype. However, like any other quantitative trait, there is a requirement to confirm the position of the QTL and carry out fine-scale mapping before MAS becomes a viable proposition.

References

- Alza, J. O., and J. M. Fernandez-Martinez, 1997: Genetic analysis of yield and related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in dryland and irrigated environments. *Euphytica* **95**, 243–251.
- Basten, C. J., B. S. Weir, and Z. B. Zeng, 2002: QTL Cartographer Version 1.16: Program in Statistical Genetics. Department of statistics, North Carolina State University, Cary.
- Bert, P. F., I. Jouan, D. Tourvielle de Labrouhe, F. Serre, J. Philippon, P. Nicolas, and F. Vear, 2003: Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3 Characterisation of QTL involved in developmental and agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.* **107**, 181–189.
- Blum, A., 1988: Plant Breeding for Stress. CRC Press Inc, Boca Raton, FL.
- Ceccarelli, S., and S. Grando, 1996: Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regul.* **20**, 149–155.
- Chimenti, C. A., J. Pearson, and A. J. Hal, 2002: Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* **75**, 235–246.
- Cho, Y. G., M. Y. Eun, S. R. McCouch, and Y. A. Chae, 1994: The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 54–59.
- Doerge, R. W., and G. A. Churchill, 1994: Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, **138**, 963–971.
- Evans, L. E., 1993: Crop Evolution, Adaptation and Yield. Cambridge University Press, New York/Cambridge.
- Fereres, E., C. Gimenez, and J. M. Fernandez, 1986: Genetic variability in sunflower cultivars under drought. I. Yield relationships. *Aust. J. Agric. Res.* **37**, 573–582.
- Fick, G. N., 1978: Sunflower breeding and genetics. In: Carter, JF (ed.), *Sunflower Science and Technology*, 279–327. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI.
- Fick, G. N., and J. F. Miller, 1997: The genetics of sunflower. In: Shneither, AA (ed.), *Sunflower Technology and Production*, 441–495. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI.
- Flagella, Z., T. Rotunno, E. Tarantino, R. Di Caterina, and A. De Caro, 2002: Changes in seed yield and fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *Eur. J. Agron.* **17**, 221–230.
- Gentzbittel, L., Y. X. Zhang, F. Vear, B. Griveau, and P. Nicolas, 1994: RFLP studies of genetic relationships among inbred lines of the cultivated sunflower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germplasm pools. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 419–425.
- Gentzbittel, L., F. Vear, Y. X. Zhang, A. Bervillé, and P. Nicolas, 1995: Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **90**, 1079–1086.
- Gimenez, C., and E. Fereres, 1986: Genetic variability in sunflower cultivars under drought. II. Growth and water relations. *Aust. J. Agric. Res.* **37**, 583–597.
- Lander, E. S., and D. Botstein, 1989: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**, 185–199.
- Maury, P., F. Mojayad, M. Berger, and C. Planchon, 1996: Photosynthesis response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiol. Plant* **98**, 57–66.
- Maury, P., M. Berger, F. Mojayad, and C. Planchon, 2000: Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant Soil* **223**, 153–160.
- Mokrani, L., L. Gentzbittel, F. Azanza, L. Fitamant, G. Al-Chaarani, and A. Sarrafi, 2002: Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **106**, 149–156.
- Morgan, J. M., 1984: Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 299–319.

- Mutschler, M. A., R. W. Doerge, S. C. Liu, J. P. Kuai, B. E. Liedl, and J. A. Shapiro, 1996: QTL analysis of pest resistance in the wild tomato *Lycopersicon pennellii*: QTLs controlling acylsugar level and composition. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 709–718.
- Poormohammad Kiani, S., P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel, and A. Sarrafi, 2007a: Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **114**, 193–207.
- Poormohammad Kiani, S., P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, and A. Sarrafi, 2007b: Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* **172**, 773–787.
- Poormohammad Kiani, S., P. Maury, A. Sarrafi, and P. Grieu, 2008: QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Sci.* **175**, 565–573.
- Prieto Iosada, H., 1992: Response to Drought Conditions of Sunflower Genotypes Differing in Yield Potential and Length of Cycle. PhD Thesis University of Cordoba (in Spanish).
- Rachid Al-Chaarani, G., L. Gentzbittel, X. Huang, and A. Sarrafi, 2004: Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits using AFLP and SSR in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **109**, 1353–1360.
- Richards, R. A., 2000: Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* **51**, 447–458.
- Robin, S., B. Pathan, B. Courtois, R. Lafitte, S. Carandang, S. Lanceras, M. Amante, H. T. Nguyen, and Z. Li, 2003: Mapping osmotic adjustment in an advanced backcross inbred population of rice. *Theor. Appl. Genet.* **107**, 1288–1296.
- Russel, W. A., 1991: Genetic improvement of maize yields. *Adv. Agron.* **46**, 245–298.
- Saranja, Y., C. X. Jiang, R. J. Wright, D. Yakir, and A. H. Paterson, 2004: Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity. *Plant Cell Environ.* **27**, 263–277.
- SAS Institute Inc., 2002: SAS Guide for Personal Computers. 9th edn, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schneiter, A. A., and J. F. Miller, 1981: Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* **21**, 901–903.
- Teulat, B., D. This, M. Khairallah, C. Borries, C. Ragot, P. Sourdille, P. Leroy, P. Monneveux, and A. Charrier, 1998: Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* **96**, 688–698.
- Tuberosa, R., S. Salvi, M. C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri, and S. Conti, 2002: Mapping morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann. Bot.* **89**, 941–963.
- Turner, N. C., and M. M. Jones, 1980: Turgor maintenance by osmotic adjustment; a review and evaluation. In: Turner, N., and Kramer, P.J. (eds), *Plants to Water and High Temperature Stress*, 87–107. Wiley, New York City, NY.
- Upadyayula, N., H. S. da Silva, M. O. Bohn, and T. R. Rocheford, 2006: Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence and architecture. *Theor. Appl. Genet.* **112**, 592–606.
- Wang, G. W., Y. Q. He, C. G. Xu, and Q. Zhang, 2005: Identification and confirmation of three neutral alleles conferring wide compatibility in inter-subspecific hybrids of rice (*Oryza sativa* L.) using near-isogenic lines. *Theor. Appl. Genet.* **111**, 702–710.
- Zhang, L. S., V. Le Clerc, S. Li, and D. Zhang, 2005: Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. *Can. J. Bot.* **83**, 66–72.
- Zou, G. H., H. W. Mei, H. Y. Liu, G. L. Liu, S. P. Hu, X. Q. Yu, M. S. Li, J. H. Wu, and L. J. Luo, 2005: Grain yield responses to moisture regimes in a rice population: association among traits and genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* **112**, 106–113.

Tableau 5 : Gain génétique pour les paramètres agro-morphologiques en conditions contrôlées pour les deux traitements hydrique (W : plantes bien irriguées ; D : plantes stressées)

	W DSF	D DSF	W LN	D LN	W LAF	D LAF	W LAD	D LAD
PAC2 = P1	75.67	74.83	20.67	20.00	2855.08	1978.60	83510.79	36634.29
RHA_266 = P2	77.33	72.17	23.33	24.00	3615.07	3121.38	126486.21	64464.43
P1 - P2	-1.67^{NS}	2.67 ^{NS}	-2.67^{NS}	-4.00 ^{NS}	-759.99^{NS}	-1142.79 ^{NS}	-42975.43^{NS}	-27830.14 ^{NS}
\overline{X} P = (P1+P2)/2	76.50	73.50	22.00	22.00	3235.07	2549.99	104998.50	50549.36
\overline{X} RILs	76.94	78.10	23.90	23.35	3119.52	2319.37	117779.48	69045.80
\overline{X} RILs - \overline{X} P	0.44^{NS}	4.60 ^{NS}	1.90^{NS}	1.35 ^{NS}	-115.55^{NS}	-230.62 ^{NS}	12780.98^{NS}	18496.44 ^{NS}
BRILs	95.12	96.74	34.67	33.33	4388.81	3368.64	277705.89	192630.00
L RILs	65.55	67.93	17.00	17.67	1585.55	1469.40	35981.30	19718.10
GGB= BRILs-BP	17.78*	21.90*	11.33*	9.33*	773.74^{NS}	247.25 ^{NS}	151219.68*	128165.57*
\overline{X} 10%BRILs	86.88	90.10	32.13	30.08	4089.53	2993.18	200540.90	141891.81
GG10%= \overline{X} 10%BRILs- \overline{X} P	10.38*	16.60*	10.13*	8.08*	854.46*	443.19 ^{NS}	95542.40*	91342.45*
LSD.	7.04	7.03	3.03	2.78	806.47	657.90	47152.21	31155.90
<i>h</i> ²	49.35	34.83	92.88	75.91	46.47	41.99	52.21	63.63

	W PH	D PH	WBIO	DBIO	WHW	DHW	WGYP	DGYP
PAC2 = P1	121.00	97.67	55.66	36.85	14.99	9.71	6.71	4.45
RHA_266 = P2	112.67	94.67	50.57	36.85	14.37	8.66	6.61	3.01
P1 - P2	8.33^{NS}	3.00 ^{NS}	5.09^{NS}	0.00 ^{NS}	0.62^{NS}	1.05 ^{NS}	0.09^{NS}	1.44 ^{NS}
\overline{X} P = (P1+P2)/2	116.83	96.17	53.11	36.85	14.68	9.19	6.66	3.73
\overline{X} RILs	116.10	92.49	58.75	37.26	17.60	9.05	7.73	2.99
\overline{X} RILs - \overline{X} P	-0.74^{NS}	-3.68 ^{NS}	5.64^{NS}	0.41 ^{NS}	2.92^{NS}	-0.14 ^{NS}	1.07^{NS}	-0.74 ^{NS}
BRILs	136.00	118.33	82.89	52.83	33.52	20.55	19.26	8.61
L RILs	77.67	69.83	37.56	26.18	7.37	5.00	0.62	0.58
GGB= BRILs-BP	15.00*	20.67*	27.23*	15.98*	18.53*	10.84*	12.55*	4.16*
\overline{X} 10%BRILs	132.21	111.50	79.02	47.25	25.58	14.18	15.02	6.71
GG10%= \overline{X} 10%BRILs- \overline{X} P	15.38*	15.33*	25.90*	10.40*	10.90*	4.99*	8.36*	2.98*
LSD.	14.92	13.57	17.80	8.93	8.73	3.92	5.94	2.40
<i>h</i> ²	52.85	28.30	31.95	47.82	35.42	48.74	54.01	60.59

PAC2 (1) et RHA_266 (2) : les lignées parentales; \overline{X} P : moyenne des lignées parentales; \overline{X} RILs : moyenne des lignées recombinantes; BRILs : la meilleure lignée recombinante; BP : le meilleur parent; \overline{X} 10% BRILs : moyenne des 10% meilleures lignées recombinantes sélectionnées; GGB : gain génétique quand la meilleure lignée recombinante est comparée avec le meilleur parent; GG10% : gain génétique quand les 10%BRILs sont comparés avec la moyenne des parents ; NS : non-significatif ; * : significatif pour p < 0.05.

Tableau 6 : Gain génétique pour les paramètres agro-morphologiques au champ pour les deux traitements hydrique (W : plantes bien irriguées ; D : non irriguées).

	W DSF	D DSF	W LN	D LN	W LAF	D LAF	W LAD	D LAD
PAC2 = P1	79.67	79.67	23.33	22.33	4380.26	4174.21	107404.85	96108.75
RHA_266 = P2	74.67	74.67	23.00	22.67	4501.86	2556.26	116188.29	67760.08
P1 - P2	5.00*	5.00*	0.33^{NS}	-0.33 ^{NS}	-121.60 ^{NS}	1617.95*	-8783.45 ^{NS}	28348.67*
\overline{X} P = (P1+P2)/2	77.17	77.17	23.17	22.50	4441.06	3365.23	111796.57	81934.41
\overline{X} RILs	82.87	82.82	27.22	26.60	4314.58	3944.04	95173.29	92953.41
\overline{X} RILs - \overline{X} P	5.70*	5.65*	4.05*	4.10 ^{NS}	-126.48 ^{NS}	578.80^{NS}	-16623.28 ^{NS}	11018.99^{NS}
BRILs	94.67	94.67	37.67	38.00	7739.40	6949.06	196142.91	185865.03
L RILs	75.33	75.33	17.33	17.00	1988.35	2479.12	40753.10	43384.16
GGB= BRILs-BP	15.00*	15.00*	14.33*	15.33*	3237.54*	2774.86*	79954.61*	89756.29*
\overline{X} 10%BRILs	90.67	90.50	35.67	35.90	6563.04	5735.57	163830.48	147634.63
GG10%= \overline{X} 10%BRILs- \overline{X} P	13.50*	13.33*	12.50*	13.40*	2121.98*	2370.34*	52033.91*	65700.22*
LSD.	3.34	3.40	3.77	4.37	1558.42	1345.05	47674.79	43939.31
<i>h</i> ²	<i>86.11</i>	<i>84.53</i>	<i>92.67</i>	<i>55.88</i>	<i>53.57</i>	<i>57.05</i>	<i>66.43</i>	<i>51.78</i>

	W PH	D PH	W BIO	DBIO	W HW	D HW	WGYP	DGYP
PAC2 = P1	125.67	119.67	131.70	117.35	67.10	43.75	26.30	16.33
RHA_266 = P2	102.00	99.33	103.90	58.86	48.70	31.37	27.57	17.41
P1 - P2	23.67^{NS}	20.33*	27.80^{NS}	58.49*	18.40^{NS}	12.38 ^{NS}	-1.27^{NS}	-1.07 ^{NS}
\overline{X} P = (P1+P2)/2	113.83	109.50	117.80	88.11	57.90	37.56	26.93	16.87
\overline{X} RILs	123.07	125.31	111.52	126.08	48.49	55.30	22.57	26.91
\overline{X} RILs - \overline{X} P	9.23^{NS}	15.81 ^{NS}	-6.28^{NS}	37.97 ^{NS}	-9.41^{NS}	17.75 ^{NS}	-4.36^{NS}	10.04 ^{NS}
BRILs	158.67	177.67	227.20	255.37	117.00	107.05	69.10	58.25
L RILs	83.33	74.33	37.90	48.50	11.99	13.85	2.69	2.30
GGB= BRILs-BP	33.00*	58.00*	95.50*	138.02*	49.90*	63.30*	41.53*	40.84*
\overline{X} 10%BRILs	149.90	159.87	185.17	209.73	87.93	96.03	48.45	49.96
GG10%= \overline{X} 10%BRILs- \overline{X} P	36.07*	50.37*	67.37*	121.62*	30.03*	58.47*	21.52*	33.09*
LSD.	27.14	19.11	52.56	54.77	27.85	29.90	18.20	17.94
<i>h</i> ²	<i>37.72</i>	<i>55.90</i>	<i>64.01</i>	<i>68.34</i>	<i>69.83</i>	<i>69.75</i>	<i>62.28</i>	<i>61.40</i>

PAC2 (1) et RHA_266 (2) : les lignées parentales; \overline{X} P : moyenne des lignées parentales; \overline{X} RILs : moyenne des lignées recombinantes; BRILs : la meilleure lignée recombinante; BP : le meilleur parent; \overline{X} 10% BRILs : moyenne des 10% meilleures lignées recombinantes sélectionnées; GGB : gain génétique quand la meilleure lignée recombinante est comparée avec le meilleur parent; GG10% : gain génétique quand les 10%BRILs sont comparés avec la moyenne des parents ; NS : non-significatif ; * : significatif pour p < 0.05.

4.2. Synthèse des résultats et discussion

4.2.1. Variation phénotypique et effet du stress hydrique

Les variations phénotypiques observées pour les LIR et leurs parents PAC2 et RHA266 en conditions contrôlées (serre) et conditions naturelles (champ) pour les deux types de traitements hydriques sont présentées dans le Tableau (1) de l'article, page 56. En conditions contrôlées, un effet significatif du traitement hydrique a été observé pour la presque totalité des paramètres étudiés exception faite pour deux paramètres : la précocité de floraison (DSF) et le nombre de feuilles par plante (LN). Dans les conditions naturelles (champ), le stress hydrique a un effet significatif seulement sur deux paramètres à savoir le poids du capitule (HW) et le rendement en grains par plante (GYP). Ce résultat s'explique par le fait que la contrainte hydrique au champ a été imposée à un stade plus tardif du développement (post-floraison) comparativement à la situation en serre (préfloraison).

Des différences significatives sont aussi relevées au sein des lignées recombinantes (RIL) pour tous les caractères étudiés dans les différentes conditions (Tableau 1 de l'article , page 56).

De même, une interaction significative entre le traitement hydrique et les lignées recombinantes a été observée pour la majorité des caractères étudiés dans les deux conditions de culture (serre et champ).

En prenant en considération tous les caractères étudiés sous les différentes conditions de croissance, une grande ségrégation transgressive est observée que ce soit en serre ou au champ pour les deux types de traitements hydriques.

4.2.2. Variabilité génétique et héritabilité des caractères morphologiques et agronomiques

Les performances phénotypiques des lignées recombinantes et de leurs parents pour tous les caractères agro - morphologiques mesurés pour les deux

traitements hydriques (plantes bien alimentées en eau et plantes soumises au stress hydrique) pour les deux conditions de culture (en serre et au champ) sont représentées respectivement dans les tableaux (5 et 6).

Les différences entre les parents sont significatives pour la précocité de la floraison (Day from Sowing to Flowring : DSF), la Biomasse sèche par plante (Biomass per plant : BIO), Surface Foliaire à la Floraison (Leaf Area at Flowring : LAF), la Hauteur de la Plante (Plant Height : PH) et la Durée de la Surface Foliaire (Leaf Area Duration : LAD) en conditions naturelles respectivement pour les deux traitements (irrigué et non irrigué) pour la DSF et pour le traitement non irrigué pour les quatre autres variables. Cependant les différences n'étaient pas significatives pour le nombre des feuilles (LN), le Poids du Capitule (HW) et le rendement en grains par Plante (GYP) pour les deux traitements hydriques que ce soit sous conditions contrôlées ou au champ (Tableau 5 et 6).

Par ailleurs, en comparant la moyenne des deux parents (\overline{X} P) avec celle des lignées recombinantes (\overline{X} RILs), des différences significatives sont observées seulement au champ pour la DSF dans les deux conditions : irriguée et non irriguée et pour le nombre de feuilles à la floraison (Leaf Number : LN) pour la condition irriguée. Pour tous les autres caractères : Biomasse sèche par plante (Biomass per plant : BIO), Surface Foliaire à la Floraison (Leaf Area at Flowring : LAF), la Hauteur de la Plante (Plant Height : PH), la Durée de la Surface Foliaire (Leaf Area Duration : LAD), Poids du Capitule (Head Weight : HW) et le Rendement en Graine par Plante (Grain Yield per Plant : GYP) il n'existe aucune différence significative entre ces deux moyennes. Cela suggère que les 78 lignées recombinantes sont représentatives de l'ensemble des recombinaisons qu'il est possible d'obtenir à partir du croisement 'PAC2' x 'RHA266'.

L'un des principaux critères recherchés par le sélectionneur, à partir d'un croisement, est l'obtention d'un gain génétique (GG) qui se manifeste par la supériorité d'un ou de plusieurs recombinants par rapport aux parents. En effet, la

comparaison entre le meilleur parent et la meilleure lignée recombinante (GGB) montre une différence significative pour tous les caractères étudiés quelque soit la condition (serre et champ) et le type de traitement hydrique (irrigué ou non irrigué), excepté pour la surface foliaire à la floraison de la plante (LAF) en conditions contrôlées. Un gain génétique significatif est également observé en comparant la moyenne des parents avec la moyenne des 10% de lignées recombinantes sélectionnées (GG10%), et ceci pour la quasi totalité des caractères étudiés dans les différentes conditions, excepté pour la surface foliaire à la floraison (LAF) en condition contrôlé pour les plantes bien irriguées. Ce gain génétique qui traduit une ségrégation transgressive positive pourrait être dû à l'accumulation des allèles favorables venant des deux parents chez certains descendants du croisement. Les signes positifs et négatifs des effets additifs pour les différents Loci (Tableau 3 de l'article, page 58), indiquent une contribution des deux lignées parentales et confirme ainsi la ségrégation transgressive observée au niveau phénotypique. Une ségrégation transgressive pour des caractères morphologiques et agronomiques a été reportée sur ces même lignées recombinantes issues du croisement 'PAC-2' x 'RHA-266' mais sous des conditions de bonne alimentation hydrique (Mokrani *et al.*, 2002 ; Al Chaarani *et al.*, 2004 a).

Une héritabilité élevée a été observée pour la majorité des caractères étudiés quelque soit la condition de culture et le type de traitement hydrique (Tableau 5 et 6). Le rendement en grains par plante (GYP) présente des valeurs d'héritabilité importantes qui s'échelonnent de 54.00 à 60.60 % (respectivement irriguée et non irriguée en serre) et de 61.4 à 62.3% (respectivement non irrigué et irrigué au champ). De même, pour la durée de la surface foliaire (Leaf Area Duration : LAD) et le nombre de feuilles à la floraison (Leaf Number : LN) les valeurs observées sont élevées (Tableau 5 et 6). La forte héritabilité observée pour certains caractères pourrait être associée à l'existence d'une différence génétique élevée pour ces caractères dans les lignées parentales PAC-2 et RHA-266.

4.2.3. Corrélations phénotypiques et identification des caractères

corrélés au rendement en grains

Les corrélations phénotypiques entre traitements hydriques pour les caractères mesurés et les corrélations entre le rendement en grains par plante avec ces mêmes caractères (pour les deux traitements hydriques dans les conditions serre et champ) sont présentées dans le tableau 2 de l'article, la page 57. Des corrélations hautement significatives ont été observées entre les traitements hydriques pour les différents caractères étudiés dans l'expérimentation serre et champ. Le rendement en grains par plante (GYP) est corrélé avec la surface foliaire à la floraison (LAF), la durée de la surface foliaire (LAD), la masse du capitule (HW) et la masse sèche de la plante (BIO) pour les deux traitements hydriques en serre et au champ. Le rendement en grains par plante (GYP) est corrélé avec la hauteur de la plante (PH) seulement en condition naturelle (champ) sous les deux traitements hydriques (irriguée et non irriguée). Quant au nombre de jours depuis le semis à la floraison (DSF) et le nombre de feuilles par plante (LN), ils ne sont pas corrélés avec le rendement en grains par plante (GYP).

Les corrélations hautement significatives observées sous les deux traitements hydriques pour les caractères étudiés en serre et au champ montrent que les valeurs phénotypiques sous les conditions de bonne alimentation en eau expliquent une large proportion de variation des performances en condition de manque d'eau (Tableau 2 de l'article, page 57). Ces résultats suggèrent que la sélection dans les conditions de bonne alimentation en eau que ce soit sous serre ou au champ, peut être efficace dans l'amélioration du rendement en grains et d'autres caractères agronomiques sous des conditions limitantes en eau (serre ou champ). Des résultats similaires sont reportés pour des lignées recombinantes de riz (Zou *et al.*, 2005).

4.2.4. Identification des QTLs

La position sur la carte et les caractéristiques des QTLs associés avec les caractères étudiés en serre et au champ, sous les deux types de traitements

hydriques sont résumés dans le tableau 3 de l'article, page 58. Les QTLs sont désignés par des abréviations basées sur le caractère, suivi par les lettres 'W' et 'D' qui font respectivement référence aux plantes bien alimentées en eau et à celles stressées sous conditions contrôlées, ou par les lettres 'I' et 'NI' qui font respectivement référence aux plantes irriguées et non irriguées sous conditions naturelles. Les groupes de liaisons correspondants ainsi que le numéro du QTL dans le groupe de liaison sont aussi indiqués pour chaque QTL. Pour une vue d'ensemble simplifiée des QTLs, et en particulier pour repérer les QTLs communs entre les caractères étudiés et les conditions de cultures des plantes (traitements hydrique en serre et au champ), une image du positionnement des QTLs sur les groupes de liaison est présentée (Fig. 2 de l'article, page 59 et 60). Selon le caractère analysé et les conditions de cultures, deux jusqu'à sept QTLs ont été identifiés. En ce qui concerne les caractères agronomiques, pour l'ensemble des 8 paramètres étudiés, le pourcentage de la variance phénotypique (R^2) expliqué par chaque QTL se situe entre 4% et 40%. Des QTLs communs ont été trouvés pour les différents caractères sur plusieurs groupes de liaisons (Tableau 3 de l'article page 58 et Fig. 2 de l'article, page 59 et 60). Les phénotypes transgressifs observés pour quelques caractères peuvent s'expliquer par la présence de l'effet additifs de signes opposés chez les RILs (Tableau 3 de l'article, page 58).

Plusieurs QTLs sont détectés pour la DSF dans les différentes conditions de cultures (Tableau 3 de l'article page 58 et Fig. 2 de l'article, page 59 et 60) et la majorité d'entre eux sont détectés au moins sous deux conditions. Le QTL le plus important pour la DSF est localisé dans le groupe de liaison 7 où sont co-localisés plusieurs QTL pour les quatre conditions de culture. Les allèles positifs pour cette ensemble de QTLs viennent de RHA266. Dix sept QTLs sont identifiés pour le nombre de feuilles à la floraison (LN) sous les quatre conditions, 9 d'entre eux sont communs au moins à deux conditions de culture et les 8 autres sont détectés pour une seule condition. Pour la surface foliaire à la floraison (LAF), 21 QTLs ont été identifiés pour les quatre conditions. Sur les 21 QTLs, 9 sont détectés pour une

seule condition et les 12 autres sont détectés au moins dans deux conditions. La variance phénotypique expliquée pour chaque QTL varie entre 5% à 19%, et les deux lignées parentales contribuent avec des allèles positifs dans l'expression de ces QTLs chez les LIRs. Pour la durée de la surface foliaire (LAD), 22 QTLs sont identifiés pour les quatre conditions, ils expliquent de 4% à 17% de la variance phénotypique, 10 QTLs sont détectés pour un seul traitement hydrique et 12 sont détectés pour au moins deux conditions. Les allèles positifs pour 17 des 22 QTLs viennent de RHA266. Pour la hauteur de la plante (PH), 17 QTLs sont détectés, ils expliquent de 5% à 23% de la variance phénotypique et les deux lignées parentales contribuent dans l'expression de ce caractère. Pour la masse sèche totale de la plante (BIO), 19 QTLs ont été identifiés, expliquant de 5% à 23% de la variance phénotypique. Le nombre de QTLs varie de 1 à 6 selon les différentes conditions. Les valeurs de l'additivité montrent que RHA266 contribue significativement dans l'expression de ce caractère.

Un total de 24 QTLs sont identifiés pour le poids du capitule (HW) sous les quatre conditions, avec une variance phénotypique expliquée par les différents QTLs qui varie de 4% à 24%. Sur les 24 QTLs, 16 sont détectés pour une seule condition et 8 sont détectés pour les quatre conditions. Les deux parents contribuent équitablement sur ce caractère. Pour le rendement en grains par plante (GYP), 20 QTLs sont identifiés pour l'ensemble des conditions et traitements hydriques, avec des valeurs de R^2 comprises entre 4% et 40%. Neufs sur 21 sont identifiés pour une seule condition et les autres sont communs à au moins deux conditions. Les deux lignées parentales participent dans le contrôle du rendement en grains par plante.

La présente étude a permis de démontrer que dans de nombreux cas, un QTL s'est avéré être associé à plusieurs caractères dans les différentes conditions (Tableau 3 de l'article page 58). Par exemple, les intervalles 'E38M50_1-HA1848' et 'E41M62_29-E38M60_8' dans le groupe de liaison 7 sont associés au nombre de feuilles (LN), surface foliaire à la floraison (LAF), la durée de la surface foliaire

(LAD), hauteur de la plante (PH), précocité de la floraison (DSF), le poids du capitule (HW) et la masse sèche de la plante (BIO) dans les différentes conditions étudiées; suggérant l'existence d'une région chromosomique commune pour les caractères morphologiques et agronomiques.

La majorité des QTLs pour le rendement par plante (GYP) sont co-localisés avec les QTLs associés aux caractères agronomiques ou morphologiques (Tableau 3 de l'article page 58). Par exemple, 5 QTLs liés au rendement par plante (GYP) et ceux associés au poids du capitule (HW) et également plusieurs QTLs contrôlant les caractères morphologiques et agronomiques qui se trouvent sur les groupes de liaisons 2, 4, 5 et 10 sont situés dans la même position. Seulement deux QTLs associés au rendement par plante sont individuellement situés sur les groupes de liaisons 4 (*GYPN.4.1*) et 7 (*GYP1.7.1*). Les co-localisations des QTLs associés au rendement avec les QTLs associés aux différents caractères morphologiques et agronomiques confirment les corrélations génétiques entre le rendement et les caractères morphologiques ou agronomiques. Ceci a été déjà observé chez le tournesol (Mokrani *et al.*, 2002; Bert *et al.*, 2002 a et b; Al-Chaarani *et al.*, 2004 a). L'identification de QTLs influençant plusieurs caractères peut augmenter l'efficacité de la sélection assistée par marqueurs (SAM) (Specht *et al.*, 2001; Upadyayula *et al.*, 2006).

De même, plusieurs QTLs sont associés avec les mêmes caractères sous différentes conditions (serre et champ) et/ou avec le traitement hydrique (plantes bien irriguées et plantes stressées). En effet, les QTLs de la masse sèche de la plante (BIO), de la durée de la surface foliaire (LAD), de la surface foliaire à la floraison (LAF) et du nombre de feuilles (LN) sont localisés sur les groupes de liaisons 1 (*B1OW.1.1* et *B1OD.1.1*; intervalle 61.6-66.4 cM), 2 (*LADW.2.1* et *LADD.2.1*; intervalle 33.5-38.3 cM) et 3 (*LAFW.3.2* et *LAFN.3.1*; *LNI.3.1*, *LNN.3.1* et *LND.3.1*; intervalles 17.2-19.2 et 44.3-46.3 cM) co-localisent pour les deux types de traitements hydriques (Fig. 2 de l'article, page 59 et 60).

Pour le rendement en grains par plante sur les 20 QTLs identifiés pour ce caractère, 11 QTLs sont détectés dans deux ou trois conditions différentes, et 9 QTLs sont détectés pour une seule condition sur les quatre. Ces QTLs du rendement en grains par plante (GYP) en relation avec deux ou trois des conditions d'expérimentations, sont sur les groupes de liaisons 3, 4, 10 et 14 (Fig. 2 de l'article, page 59 et 60). Le QTL le plus important pour le rendement par plante, qui est lié à un marqueur SSR (ORS391), est situé sur le groupe de liaison 14 (intervalle 73.3-75.3 cM). C'est un QTL majeur qui explique 40%, 31% et 4% de la variance phénotypique pour le rendement dans trois conditions (bien irrigué, stressé en serre, et non irriguée au champ). Ce QTL est co-localisé avec les QTLs contrôlant le nombre de feuilles par plante (LN) et la hauteur de la plante (PH). Ce résultat confirme les relations entre rendement et l'architecture des plantes. Les allèles positifs pour le QTLs contrôlant le rendement en grains par plante dans cette région viennent du parent PAC2 quant aux allèles positifs pour les QTLs contrôlant le nombre de feuilles (LN) et la hauteur de la plante (PH) viennent du parent RHA266. Cette région chromosomique peut être importante pour la sélection assistée par marqueurs pour le rendement en grains par plante (GYP), vu qu'elle est détectée dans trois conditions différentes (Fig. 2 de l'article, page 59 et 60).

5. Variabilité génétique et identification de marqueurs moléculaires de l'ajustement osmotique et les caractères associés chez des mutants de tournesol (*Helianthus annuus L.*) en conditions de sécheresse.

5.2. Introduction

L'utilisation de la radiation ionisante, telle que des rayons X, des rayons gamma, des neutrons et des agents mutagènes (produit chimique) pour induire des variations génétiques est bien établie et des mutants induits ont souvent été employés pour l'amélioration de caractères agronomiques et autres (Soldatov, 1976 ; Arabi *et al.*, 1991; Encheva *et al.*, 2003; Ahloowalia *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Branch, 2006). Chez le tournesol, des rayons gamma ont été utilisés pour induire une variabilité génétique pour différents caractères morphologiques (Nabipour *et al.*, 2004), d'organogénèse (Al-Chaarani *et al.*, 2004 b), de germination et qualité des graines (Pejic *et al.*, 1998 ; Alejo-James *et al.*, 2004 ; Ebrahimi *et al.*, 2008 ; 2009) et pour la résistance aux maladies (Darvishzadeh *et al.*, 2008). Dans toutes les études mentionnées, quelques mutants possédant des valeurs plus élevées que celle de la lignée originelle ont été identifiés. En outre, une stérilité mâle a été également obtenue chez le tournesol par mutation (Jan et Rutger, 1988 ; Jan, 1992). Par conséquent, des mutants induits peuvent être employés comme source de variabilité pour des caractères agronomiques ou physiologiques chez le tournesol.

Plusieurs travaux de recherche ont révélé que l'ajustement osmotique est lié à la tolérance à la sécheresse chez les plantes cultivées, comme le montrent différents travaux réalisés chez le tournesol (Morgan, 1984 ; Chimenti *et al.*, 2002 ; Jongdee *et al.*, 2002). Chimenti *et al.* (2002 ; 2004), ont démontré que l'ajustement osmotique contribue dans le maintien du rendement chez le tournesol dans des conditions de sécheresse. Au niveau cellulaire, l'ajustement osmotique est un processus majeur dans le maintien de la turgescence aux faibles potentiels hydriques. Les capacités d'ajustement osmotique sont variables chez le tournesol et dépendent du génotype (Conroy *et al.*, 1988; Chimenti et Hall, 1993 ; 1994), des modalités d'installation du déficit hydrique (Jones et Rawson 1979), et de l'âge de la feuille (Jones et Turner, 1980; Sadras *et al.*, 1993). Les solutés impliqués sont essentiellement des ions

inorganiques, des sucres solubles, des acides aminés et organiques. Le coût énergétique d'un tel ajustement est plus faible chez le tournesol, que chez d'autres espèces comme le blé (Munns et Weir 1981), étant donné que la contribution des ions inorganiques est plus importante (Jones *et Turner*, 1980).

Les génotypes sélectionnés sur la seule base des caractères phénotypiques peuvent ne pas donner les résultats recherchés parce que ces caractères sont fortement influencés par les conditions environnementales. L'utilisation de marqueurs moléculaires pour choisir des génotypes avec des caractères souhaitables par 'Sélection-Assistée par Marqueur' s'est avérée efficace chez certaines espèces. L'identification de tels marqueurs liés aux caractères d'intérêts dans un groupe de génotypes par l'étude de l'association entre le marqueur et le caractère par analyse de la variance ou régressions multiples offre des perspectives intéressantes pour la sélection assistée par marqueurs. Par exemple, Virk *et al.* (1996) ont rapporté l'association entre des marqueurs de RAPD et des caractères agronomiques chez le riz. Vijayan *et al.* (2006), ont identifié plusieurs marqueurs d'ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) liés aux caractères associés à la productivité chez le mûrier. Des marqueurs d'AFLP associés aux caractères agronomiques ont été également identifiés chez le blé par Roy *et al.* (2006).

Il serait intéressant d'identifier des marqueurs reliés à l'aptitude des plantes à s'ajuster osmotiquement vu l'intérêt de ce phénomène dans le maintien de plusieurs fonctions physiologiques associées à la productivité en conditions de contraintes hydriques. L'identification de tels lien entre un marqueur et un caractère important dans les phénomènes de tolérance à la sécheresse est un préalable afin d'envisager un programme de sélection assistée par marqueurs pour l'obtention de génotypes performants en conditions sèches.

Une première étape de ce travail a été d'évaluer la variabilité génétique pour un caractère majeur de la tolérance des plantes à la sécheresse : l'ajustement osmotique. Les autres paramètres caractérisant l'état hydrique du végétal, comme la

teneur relative en eau et la turgescence ont également été analysés chez des plantes soumises ou non à une contrainte hydrique. Ces différents caractères ont été évalués chez une population de mutants de tournesol obtenue suite à un traitement mutagène aux rayons gamma. Une deuxième étape du travail a été de rechercher des marqueurs moléculaires pour l'ajustement osmotique et les paramètres qui lui sont associés chez cette même population.

Les expérimentations sont conduites au champ (toit roulant).

Les résultats des expérimentations ont fait l'objet de l'article suivant:

Deuxième article :

1) Poormohammad Kiani S, Nouri L, Maury P, Ykhlef N., Darvishzadeh R., Grieu P. et Sarrafi A. (2008) : Genetic variation and identification of molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits in gamma irradiation-induced mutants of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Journal of Genetics and Breeding* (publié).

Genetic variation and identification of molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits in gamma irradiation-induced mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.).

S. Poormohammad Kiani¹, L. Nouri¹, P. Maury¹, N. Ykhlef¹, R. Darvishzadeh², P. Grieu¹, A. Sarrafi²

¹INP-ENSAT, INRA, UMR 1248 Agrosystèmes & Développement Territorial, F-31326 Castanet Tolosan, France

²INP-ENSAT, IFR 40, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), F-31326 Castanet Tolosan, France

Journal of Genetics and Breeding (Publié)

Corresponding author: Professor Ahmad Sarrafi

Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France

e-mail : sarrafi@ensat.fr

Tel: + 33 5 62193580

Fax: + 33 5 62193581

ABSTRACT

The objectives of the present study were to evaluate the genetic variability and to identify molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits among a population of gamma-induced M6 mutants of sunflower grown under two water treatments. The gamma-induced mutants and original line (AS613) were grown under a fully automated mobile rainout shelter. The experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot consisted of water treatments (well-watered and water-stressed) and the subplot contained genotypes (AS613 and 31 M6 mutant lines). Water stress was imposed in flower bud formation stage and relative water content (RWC), osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) and osmotic adjustment (OA) were studied under well-watered and water-stressed conditions at the beginning of flowering. A wide range of variation was observed and some mutant lines with higher values than the original line were identified for osmotic adjustment-related traits. This showed the efficiency of gamma irradiation for inducing genetic variation for drought tolerance in sunflower. Marker-trait analysis showed that some AFLP markers were associated with each trait in both water treatments (stable markers) and some others are specific for a given water treatment. Furthermore, some AFLP markers were associated with more than one trait. The identified markers could be used in marker-based selection programmes for improving drought tolerance in sunflower.

Key words : *Helianthus annuus* L. · Gamma irradiation · Genetic variation · AFLP · Water stress · Osmotic adjustment

INTRODUCTION

Gamma rays has been widely used for inducing mutants in genetics and breeding programmes. For example gamma rays has been applied to induce genetic variation for morphological traits in sesame (CAGIRGAN, 2006) and aluminum tolerance in wheat (TULMANN *et al.*, 2001) and for inducing large-seeded mutant lines in the ‘Georgia Brown’ peanut cultivar (BRANCH, 2006).

Morphological mutants in plants occasionally have higher agronomic values when comparing with original genotype (KOHET and BIRD, 2002). In sunflower, gamma-irradiation has been used for inducing genetic variation for different characters such as morphological traits (NABIPOUR *et al.*, 2004), organogenesis (AL-CHAARANI *et al.*, 2004a), resistance to *Phoma macdonaldii* (ABU AL FADIL *et al.*, 2004) and germination traits (ALEJO-JAMES *et al.*, 2004). In all mentioned studies, some mutant lines with higher value than original line have been identified. High oleic acid genotypes were obtained by mutation in sunflower (SOLDATOV, 1976; PEREZ-VICH *et al.*, 2000). In addition, sunflower mutants with higher contents of saturated fatty acids have been also obtained (IVANOV *et al.*, 1988; OSORIO *et al.*, 1995). To our knowledge, the efficiency of gamma rays to induce genetic variation for drought tolerance-related traits has not been evaluated in sunflower.

Water stress decreases plant growth and productivity, by slowing rate of cell division and expansion mainly due to loss of turgor, which results in a decline of the water status components of the plant cells. Drought tolerance is complex, and may be associated with several traits such as rooting depth, antioxidant production and osmotic adjustment (OA) (CHIMENTI *et al.*, 2002). Because yield and drought resistance are controlled by separate genetic loci, improved drought tolerance involves the identification and transfer of physiological traits responsible for drought tolerance to high-yielding and agronomically acceptable cultivars (CHIMENTI *et al.*, 2002). Osmotic adjustment (OA) is a cellular adaptation by which, under water stress, plants are able to actively accumulate solutes. This results in a lower osmotic potential and the maintenance of higher turgor

(CHIMENTI *et al.*, 2002). OA contributes to drought tolerance in sunflower, maize, rice and sugar beet (CHIMENTI *et al.*, 2002, 2006; ROBIN *et al.*, 2003; JONGDEE *et al.*, 2003; OBER *et al.*, 2005). The contribution of OA to yield maintenance under pre-anthesis drought conditions was demonstrated in sunflower genotypes (CHIMENTI *et al.*, 2002).

Utilization of molecular markers to aid breeders in selecting genotypes with desirable traits through marker-assisted selection has proved to be very effective in plants. However, the success of marker-assisted selection largely depends on the extent of genetic linkage between markers and Quantitative Trait Loci (VIRK *et al.*, 1996). Mapping of QTLs is carried out with materials obtained from systematic breeding such as F₂ populations, or recombinant inbred lines. Identification of markers associated with important traits in a group of genotypes through ANOVA or regression analysis offers an alternative mean, as has been used in several plants species. As examples, VIRK *et al.*, (1996) reported the association between RAPD markers and agronomical traits in rice. VIJAYAN *et al.*, (2006) identified several ISSR markers associated with yield traits in mulberry; and AFLP markers associated with agronomic traits in 55 bread wheat genotypes were identified by ROY *et al.* (2006). Furthermore, single-marker regression and ANOVA methods have been also used to identify molecular markers associated with osmotic adjustment in rice (ROBIN *et al.*, 2003) and barley (LILLEY *et al.*, 1996) as well as root-penetration ability in rice (PRICE *et al.*, 2000). The objectives of the present study were to evaluate the genetic variability and to identify molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits among a population of gamma-induced M6 mutant lines grown under two water treatments.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and experimental design

The 'AS613' pure inbred line was developed in our department from a cross between two genotypes (ENSAT-125 and ENSAT-704) following a single seed descent (SSD) programme. This line was selected for its high organogenesis response (SARRAFI *et al.*, 2000). The 1500 seeds of 'AS613' were exposed to

gamma rays at the Atomic Energy Center (Cadarache, France) with a dose of 75 Grays. Irradiated seeds were grown in the field and M1 to M6 generations were advanced by self-pollination through a modified SSD method. Among a population of about 2000 M6 lines, 31 M6 mutants showing morphological differences compared with the original line (AS613), were selected for this study. The mutants and 'AS613' were grown under a fully automated mobile rainout shelter. The experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot consisted of water treatments (well-watered and water-stressed) and the subplot contained genotypes (AS613 and 31 M6 mutant lines). The 32 mutant and AS613 were randomized within each treatment-block combination. Each block consisted of one row 1.6-m long, with 50 cm between rows and 20 cm between plants in rows, giving a total number of about 8 plants per plot with two rows as borders on all sides. Plots were extra seeded and the extra seedlings were thinned at the two to four leaf stage. On the basis of soil test results 80 kg N/ha was applied before sowing.

Water stress treatments and observations

All plants received sufficient water to maintain soil water close to field capacity until flower bud formation stage (stage R1, SCHNEITER and MILLER, 1981). Water stress was imposed by withholding water from water-stressed plots and measurements were made at the beginning of flowering (stage R5.1).

The upper most fully expanded leaves were used for all water status measurements, and observations were made between 10h00 and 14h00. Relative water content (RWC) was determined ($RWC = \frac{F_w - D_w}{T_w - D_w}$), where: F_w is fresh weight and T_w is turgid weight after 24 h rehydration at 4 °C in dark room by placing the petioles in a container, with distilled water. D_w is dry weight after oven drying for 24 h at 80 °C. In all cases half the lamina of sampled leaf was used for RWC determination and the remaining half was used for measurement of leaf osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) after measurement of turgid weight. Leaf osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) were measured on expressed sap of frozen and thawed leaves using 10 μ l aliquots placed in an osmometer (Wescor Model

5520, Logan, Utah, USA) calibrated with manufacturer solutions. Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) was determined by converting the osmometer reading (mmol kg^{-1}), using the van't Hoff relation ($\Psi_s = -RTdc$), Where: R is the gas constant, T the temperature in Kelvin, d the density of water at temperature T , and c the concentration of osmotically-active solutes, given by the osmometer. Osmotic adjustment (OA) is the accumulation of solutes induced by water stress, which was calculated using rehydration method (Blum 1989). Then OA was determined using the following equation: $OA = \Psi_{sFT (WW)} - \Psi_{sFT (WS)}$, Where $\Psi_{sFT (WW)}$ is the osmotic potential at full turgor of well-watered plants and $\Psi_{sFT (WS)}$ is the osmotic potential at full turgor of water-stressed plants.

Genomic DNA isolation and AFLP genotyping

The genomic DNA of 'AS613' and M6 mutant lines were isolated from two-week old seedlings according to the method of extraction and purification presented by Fulton et al (1995). Different *MseI/EcoRI* primer combinations were used for AFLP genotyping (Table 1). The AFLP procedure was conducted as described by AL-CHAARANI *et al.*, (2004b). AFLP bands were scored from the gel as presence (1) or absence (0).

Statistical analysis

Data were analyzed using the SAS PROC GLM (SAS Statistic). A mixed model with water treatment as fixed effect, and genotypes (Mutants and AS613) as random effect, was used for evaluation of experimental data. The SNK test was used for mean comparisons of all mutants and LSD test was used for a priori pairwise comparisons. The association between AFLP markers and the quantitative traits was estimated through single-marker regression analysis (PRICE *et al.* 2000) and the mean trait values of the two marker classes were calculated using ANOVA by the SAS programme as described in PRICE *et al.* (2000).

RESULTS

Analysis of variance of the 31 mutants and original line showed a highly significant genotype and water stress effects for relative water content (RWC) as well as osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) (Table 2). 'Mutant \times water treatment'

was significant for both traits indicating differences among mutant lines in the responses to drought. A significant difference was observed among mutant lines for osmotic adjustment (OA).

Results concerning mean comparisons and the range of variation for different traits are summarized in Table 3. In both water treatments a large range of variation was observed among mutant lines for the studied traits. RWC ranged from 82.1 to 92.8% in well-watered condition and from 61.8 to 82.5% in water-stressed condition. Osmotic potential at full turgor (Ψ_{SFT}) ranged from -1.04 to -0.74 MPa in well-watered condition whereas it ranged from -1.49 to -0.92 MPa in water-stressed condition. The range of osmotic adjustment was from 0.00 to 0.61 MPa (Table 3). For each trait in each water treatment, three mutant lines presenting the highest value are presented in table 3 (bold-face values). Some mutants showed higher values for more than one trait (M6-36-2; M6-381-1-1; M6-286-1 and M6-652-1). A high variation was observed for osmotic adjustment (up to 0.61 MPa) and the mutant lines M6-286-1, M6-575-1 and M6-862-1NI showed significant higher value than the original line (Table 3).

The number of polymorphic markers varied from eight for three primer combinations ('E33M61'; 'E37M48'; 'E38M62') to 27 for 'E37M50' (Table 1). The results of marker identification summarized in Table 4 show that the number of markers associated with different traits is seven for osmotic adjustment, eight and nine for RWC under water-stressed and well-watered conditions respectively, and eleven and twelve for osmotic potential at full turgor (Ψ_{SFT}) in well-watered and water-stressed conditions respectively. The positive or negative value for the difference between presence and absence of a marker (M1-M0) shows that for some traits the presence of the identified marker, and for some others the absence of the marker is associated with a higher value of the trait (Table 4). Among the markers associated with different traits, some are in common across water treatments (bold-face) and some others are specific for a given water treatment. The markers 'E37M50_10' and 'E33M49_6' were identified for RWC in both water treatments.

Similarly the markers 'E37M50_26', 'E33M50_17' and 'E33M50_8' were associated with osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in both water treatments.

Seven markers were detected for osmotic adjustment (OA), among which five ('E38M62_2', 'E38M62_3', 'E38M62_4', 'E33M47_7' and E33M47_12) were in common between OA and osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) under water-stressed conditions and two others ('E33M47_3' and 'E33M47_13') were in common with osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) as well as with RWC both in well-watered conditions.

DISCUSSION

A significant genetic variation was observed among mutant lines for the studied traits (Table 2). Water stress affected relative water content and caused the accumulation of solutes (osmotic adjustment) in our study. In addition, the water treatment responses were affected by genotype (significant 'Mutant \times treatment'), suggesting that water status of a given mutant in relation to other mutants vary between water treatments (Table 2). The large genetic variation (range of variation) observed among mutant lines for the studied traits revealed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for osmotic adjustment and osmotic adjustment-related traits (Table 3). Generally the variation is larger among water-stressed mutants when compared with well-watered mutants, and some mutant lines were more tolerant than their original line under water-stressed condition. These mutants could be used in breeding programmes for drought tolerance. Among the mutant studied here, some have advantages over 'AS613' for the studied traits. Three mutant lines (M6-286-1, M6-575-1 and M6-862-1NI) showed higher capacity of solute accumulation (OA) when compared with 'AS613' but some others have a value close to original line or below. The line 'M6-286-1' maintained high RWC under water stress and also presented a high osmotic adjustment capacity. Since the maintenance of relative water content (RWC) and a high osmotic adjustment (OA) are known to contribute to drought tolerance in sunflower (CHIMENTI *et al.*, 2002), the mutant line 'M6-286-1' might be the best mutant for drought tolerance. However mutants with high value for RWC but low

capacity of OA (M6-381-1-1, M6-792-2) and also inversely the lines with high capacity of OA but a low RWC values (M6-862-1NI, M6-575-1) were also identified. These contrasted mutant lines could be used as parental lines of genetic populations for further analysis of drought stress in the future studies.

The results of single-marker regression analysis (Table 4) show that the phenotypic variation explained by the locus (R^2) ranged from 10.1% to 36%. It has been reported that the phenotypic variation (R^2) explained by the QTLs ranged from 5.8% to 26.7% for osmotic adjustment-related traits in barley (Teulat et al., 1998, 2001). R^2 ranged from 6% to 29% for the QTLs controlling osmotic adjustment-related traits in sunflower (POORMOHAMMAD KIANI *et al.*, 2007). To our knowledge, the association between molecular markers and osmotic adjustment-related traits in sunflower has not been reported. The positive or negative value for the difference between presence or absence of a marker (M1-M0) shows which class of a marker (presence or absence) is associated with a higher value of a trait (Table 4). As shown in table 4, both the presence and absence of a marker could be associated with the high phenotypic value of the traits. However, in the case of OA only the presence of AFLP markers is associated with the higher phenotypic value of the trait (Table 4). Some markers are common across water treatments and some others are specific for a given water treatment. Markers common for both water treatments seem to be more important as it gives a constitutive performance for the traits without being affected by water treatment. As example, the markers 'E37M50_10' and 'E33M49_6' were identified for RWC in both water treatments. Similarly for osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) the markers 'E37M50_26', 'E33M50_17' and 'E33M50_8' are stable across water treatments. However, the number of specific markers in each water treatment and their effect (R^2) was much more than stable markers, which explain the significant 'Mutant-water treatment' interaction presented in Table 2. The markers which are specific for a given water treatment could be useful for marker-based breeding programmes in a given water treatment.

In the present study seven markers were identified to be associated with OA. Robin et al., (2003) identified 13 RFLP and SSR markers correlated with OA in an advanced back-cross inbred population of rice using single-marker analysis of variance. Our results show that five markers ('E38M62_2', 'E38M62_3', 'E38M62_4', 'E33M47_7' and E33M47_12) are common for OA and osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in water stressed conditions (Table 4). The presence of these five markers increases OA (positive value for M1-M0) and decrease Ψ_{sFT} (negative value for M1-M0) simultaneously (Table 4). Osmotic adjustment is defined as a decrease of osmotic potential within the cells, due to solute accumulation during water stress (LUDLOW and MUCHOW, 1990). The identification of five common markers between OA and Ψ_{sFT} genetically confirms that OA variation depends upon osmotic potential at full turgor in water-stressed conditions as a result of solute accumulation. OA maintains cell turgor at low soil moisture and contributes in drought tolerance of several crop species such as rice, sunflower and maize (JONGDEE *et al.*, 2002; CHIMENTI *et al.*, 2002, 2006). The common markers identified here could be used in marker-based selection for OA and therefore drought tolerance in sunflower.

In conclusion, the present study constitutes the first attempt to evaluate the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for osmotic adjustment and osmotic adjustment-related traits. Some mutant lines with higher values than the original line were identified for osmotic adjustment-related traits, which showed the efficiency of gamma irradiation for inducing genetic variation for drought tolerance in sunflower. These mutants could be included in breeding programme for drought tolerance. Moreover, the AFLP markers associated with adjustment-related traits could be also used in breeding sunflower for water stress tolerance.

REFERENCES

ABOU AL FADIL T, DECHAMP-GUILLAUME G, POORMOHAMMAD KIANI S, SARRAFI A (2004) Genetic variability and heritability for resistance to

- black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). J Genet Breed 58: 323-328
- AL-CHAARANI G, GENTZBITTEL L, BARRAULT G, LENOBLE S, SARRAFI A (2004a) The effect of gamma rays and genotypes on sunflower organogenesis traits. J Genet Breed 58: 73
- AL-CHAARANI G, GENTZBITTEL L, HUANG X, SARRAFI A (2004b) Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits using AFLP and SSR in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theor Appl Genet 109: 1353-1360
- ALEJO-JAMES A, JARDINAUD M F, MAURY P, ALIBER J, GENTZBITTEL L, SARRAFI A, GRIEU P, PETITPREZ M (2004) Genetic variation for germination and physiological traits in sunflower mutants induced by gamma rays. J Genet Breed 58: 285
- BLUM A (1989) Osmotic adjustment and growth in barley genotypes under drought stress. Crop Sci 29: 230–233
- BRANCH ZD (2006) Variability among advanced gamma-irradiation induced large-seeded mutant breeding lines in the ‘Georgia Brown’ peanut cultivar. Plant Breed 121: 275-277
- CAGIRGAN MI (2006) Selection and morphological characterization of induced determinate mutants in semase. Field Crop Res 96: 19-24
- CHIMENTI C A, PEARSON J, HAL AJ (2002) Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. Field Crops Res 75: 235–246
- CHIMENTI C A, MARCANTONIO M, HAL AJ (2006) Divergent selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) in both early growth and flowering phase. Field Crops Res. 95: 305–315
- FULTON TM, CHUNWONGSE J, TANKSLEY S D (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants, Plant Mol. Biol. Report 13:207–209

- IVANOV P, PETAKOV D, NIKOLOVA V, PETCHEC E (1988) Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. p. 463–465. In: Proc. 12th Int. Sunflower Association, Toowoomba, Australia.
- JONGDEE B, FUKAI S, COOPER M (2002) Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice, *Field Crop Res.* 76: 153-163
- KOHET RJ, BIRD L S (2002) Inheritance and linkage analysis of the yellow Pulvinus mutant of cotton. *J Cotton Sci* 6: 115-118
- LILLEY JM, LUDLOW MM, MCCOUCH SR, O'TOOLE JC (1996) Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J Exp Bot* 47: 1427-1436
- LUDLOW MM, MUCHOW RC (1990) A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Adv Agron* 43: 107-153
- NABIPOUR A, YAZDI-SAMADI B, SARRAFI A (2004) Genetic control of some morphological mutants in sunflower. *J Genet Breed* 58: 157-162
- OBER E S, LE-BLOA M, CLARK CJA, ROYAL A, JAGGARD KW, PIDGEON JD (2005) Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crops Res* 91: 231–249
- OSORIO J, FERNANDEZ-MARTINEZ J, MANCHA M, GARCES R (1995) Mutant sunflower with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci* 35: 739–742
- PEREZ-VICH B, GRACES R, FERNANDEZ-MARTINEZ JM (2000) Genetic characterization of sunflower mutants with high content of saturated fatty acids in seed oil. *Helia* 23: 77-87
- PRICE A H, STEELE K A, MOORE B J, BARRACLOUGH P B, CLARK L J (2000) A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryz Sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. *Theor Appl Genet* 100 : 49-56
- POORMOHAMMAD KIANI S, TALIA P, MAURY P, GRIEU P, HEINZ R, PERRAULT A, NISHINAKAMASU V, HOPP E, GENTZBITTEL L,

- PANIEGO N, SARRAFI A (2007) Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* (2007) 172: 773-787
- ROBIN S, PATHAN MS, COURTOIS B, LAFITTE R, CARANDANG S, LANCERASE S, AMANTE M, NGUYEN HT, LI Z (2003) Mapping osmotic adjustment in an advanced back-cross inbred population of rice. *Theor Appl Genet* 107: 1288–1296
- ROY JK, BANDOPADHYAY R, RUSTGI S, BALYAN HS, GUPTA PK (2006) Association analysis of ergonomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr Sci* 90: 683-689
- SARRAFI A, KAYYAL H, RACHID AL-CHAARANI G, CANTIN F, CHALINE AS, DURIELLE AS (2000) Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Genet Breed* 54: 227-231
- SCHNEITER AA, MILLER JF (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Sci* 21: 901-903
- SOLDATOV K I (1976) Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In: *Proceeding of the 7th International Sunflower Conference*. Vol. 1. Krasnodar, pp. 352-357.
- 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
- TEULAT B, BORRIES C, THIS D (2001) New QTLs identified for plant water status, water soluble carbohydrates and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth- chamber under two water regimes. *Theor Appl Genet* 103: 161-170
- TULMANN NETO A, DE OLIVEIRA CAMARGO CE, LOPES DE CASTRO J, FERREIRA FILHO AWP (2001) Evaluation of ‘Anahuac’ wheat lines for aluminum tolerance. *Euphytica* 120: 339-343.

VIJAYAN K, SRIVATSAVA PP, NAIR CV, AWASTHI AK, TIKADER A, SREENIVASA B, URS SR (2006) Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed* 125: 298-301

VIRK PS, FORD-LLOYD BV, JACKSON MT, POONI HS, CLEMENO TP, NEWBURY HJ (1996) Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* 76: 296-304

TABLE 1. 17 AFLP primer combinations and their polymorphic markers used for genotyping M6 mutants and their original line (AS613) of sunflower.

Primer combinations	Number of polymorphic markers	Primer combinations	Number of polymorphic markers
E31M50(E _{AAA} ×M _{CAT})	13	E33M48(E _{AAG} ×M _{CAC})	9
E31M62(E _{AAA} ×M _{CTT})	10	E33M59(E _{AAG} ×M _{CTA})	15
E31M48(E _{AAA} ×M _{CAC})	9	E37M50(E _{ACG} ×M _{CAT})	27
E33M50(E _{AAG} ×M _{CAT})	16	E37M48(E _{ACG} ×M _{CAC})	8
E33M60(E _{AAG} ×M _{CTC})	11	E37M62(E _{ACG} ×M _{CTT})	9
E33M61(E _{AAG} ×M _{CTG})	8	E38M62(E _{ACT} ×M _{CTT})	8
E33M47(E _{AAG} ×M _{CAA})	13	E40E50(E _{AGC} ×M _{CAT})	9
E33M49(E _{AAG} ×M _{CAG})	15	E40M59(E _{AGC} ×M _{CTA})	9
E33M62(E _{AAG} ×M _{CTT})	10	Total	200

TABLE 2 . Results of analysis of variance (mean squares) for relative water content (RWC), osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) and osmotic adjustment (OA) in a population of sunflower mutants and original line (AS613) under two water treatments

Source of variation	<i>d.f.</i>	RWC(%)	Ψ_{sFT} (Mpa)	OA*(MPa)
Block	2	230.4 ^{ns}	0.57*	0.01 ^{ns}
Water treatment	1	9751.93*	2.29**	-
Block× water treatment (E1)	2	150.09**	0.01 ^{ns}	-
Genotype (Mutant)	31	61.14***	0.04***	0.05**
Mutant × water treatment	31	50.55**	0.03**	-
Error (E2)	124	23.02	0.01	-
Total	191			

* OA was calculated as difference in osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) between well-watered and water-stressed plants; then analysis of variance was performed using the data of the mutants in three blocks (error mean square was 0.02).

TABLE 3. Characteristics of sunflower M6 mutant lines in well-watered (WW) and water-stressed (WS) conditions

	RWC		Ψ_{sFT}		OA
	WW	WS	WW	WS	WW <i>vs</i> WS
‘AS613’	88.4 ^a	73.6 ^{bc}	-0.82 ^{ab}	-1.16 ^{bc}	0.28 ^b
M6-36-2	92.8^a	79.8 ^{ab}	-0.74^a	-1.01 ^{ab}	0.27 ^b
M6-381-1-1	92.6^a	82.5^a	-0.93 ^{ab}	-0.93^a	0.00 ^d
M6-286-1	91.9^a	80.8^a	-0.77^{ab}	-1.14 ^{bc}	0.37^a
M6-652-1	85.6 ^a	73.3 ^{bc}	-0.76^{ab}	-0.93^a	0.17 ^c
M6-792-2	82.8 ^a	82.3^a	-1.04 ^b	-1.14 ^{bc}	0.10 ^c
M6-39-2-2	89.0 ^a	74.7 ^{bc}	-0.90 ^{ab}	-0.92^a	0.02 ^d
M6-575-1	85.0 ^a	68.3 ^{bc}	-0.87 ^{ab}	-1.48 ^c	0.61^a
M6-862-1NI	87.1 ^a	74.3 ^{bc}	-0.88 ^{ab}	-1.36 ^c	0.48^a
Range	82.1/92.8	61.8/82.5	-1.04/-0.74	-1.49/-0.92	0.00/0.61
Mean	87.6	73.1	-0.88	-1.11	0.22

RWC: relative water content.

Ψ_{sFT} : osmotic potential at full turgor.

OA: osmotic adjustment.

In each column, the values are the mean of three replicates and means followed by different letters are significantly different at the P=0.05 level (Newman-Keuls test).

* and ns: significant at 0.05 probability level and non significant (LSD).

TABLE 4. Markers correlated with relative water content (RWC), osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in two water treatments as well as with osmotic adjustment (OA) revealed by single-marker regression analysis

Trait	Well-watered				Water-stressed			
	Marker	Probability ^a	R ² % ^a	M1-M0 ^b	Marker	Probability ^a	R ² % ^a	M1-M0 ^b
RWC	E37M50_10 ^c	*	12.4	2.0	E37M50_10	**	21.1	4.3
	E37M50_12	*	13.9	2.7	E37M48_6	***	15.1	6.3
	E37M50_16	*	14.1	-2.2	E33M60_11	*	15.1	4.6
	E40M59_1	*	13.1	2.2	E37M62_1	*	17.6	-4.0
	E33M61_8	*	16.7	2.3	E31M48_1	*	17.3	-4.5
	E33M47_13	*	12.2	2.0	E31M48_7	*	14.4	-3.6
	E33M59_1	*	13.8	-2.4	E33M48_1	**	17.4	-4.2
	E33M59_10	*	14.2	-2.2	E33M49_6	**	12.5	-4.1
	E33M49_6	*	16.2	-2.3				
Ψ_{sFT}	E40M59_7	*	17.0	-0.08	E37M50_6	*	18.6	0.12
	E33M47_3	*	15.0	0.06	E33M50_17	*	17.2	0.13
	E31M50_9	*	13.5	0.07	E38M62_2	*	14.0	-0.10
	E37M62_1	*	12.0	0.06	E38M62_3	*	16.0	-0.10
	E33M47_5	*	13.7	0.05	E38M62_4	*	11.3	-0.08
	E37M50_26	*	16.5	0.06	E33M47_12	*	16.0	-0.11
	E31M48_6	*	15.2	0.06	E33M47_7	*	12.6	-0.08
	E33M50_17	*	13.3	0.06	E37M50_26	*	16.5	-0.11
	E33M50_8	*	16.5	0.11	E31M48_3	*	12.8	0.09
	E33M48_6	*	15.2	0.06	E33M50_8	*	16.5	0.06
	E33M49_1	***	36.0	0.11	E33M48_3	*	12.8	0.10
				E33M49_5	*	14.0	0.09	
Water stress <i>versus</i> well-watered								
OA	E38M62_2	*	10.1	0.09				
	E38M62_3	*	17.0	0.12				
	E38M62_4	*	13.4	0.10				
	E33M47_3	*	13.2	0.10				
	E33M47_12	*	11.1	0.08				
	E33M47_13	*	10.1	0.08				
	E33M47_7	*	11.9	0.09				

^a as revealed by regression of the trait on marker genotype.

^b difference between two marker classes as revealed by analysis of variance of trait by marker genotype.

^c the bold-face markers are in common (stable) across water treatments for each trait.

*, **, *** and ns: significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability level and non significant.

5.2. Synthèse des résultats et discussion

5.2.1. Variabilité génétique de l'ajustement osmotique et des caractères hydriques associés

L'analyse de variance effectuée chez les 31 lignées de mutants et la lignée originelle (AS613) révèle un effet significatif du traitement hydrique pour la teneur en eau relative (RWC), le potentiel osmotique à plein turgescence (Ψ_{sFT}) et l'ajustement osmotique (AO). La différence entre les mutants est hautement significative pour tous les caractères étudiés. Nous avons observé une interaction significative entre traitement hydrique et génotype, suggérant que la réponse au stress hydrique pour un génotype donné par rapport à d'autres génotypes change suivant les traitements hydriques subis par la plante. Le stress hydrique imposé a induit l'accumulation d'osmolytes dans les cellules chez les mutants présentant un ajustement osmotique significatif (Tableau 2 de l'article, page 91).

On a observé une variation génétique significative entre les mutants pour tous les caractères de l'état hydrique étudiés. La teneur en eau relative (RWC) varie de 82.1% à 92.8% en condition 'irriguée' et de 61.8% à 82.5% en condition 'non irriguée'. Le potentiel osmotique à pleine turgescence (Ψ_{sFT}) varie de -1.04 MPa à -0.74 MPa chez les mutants 'irrigués' tandis qu'il varie de -1.49 MPa à -0.92 MPa en condition 'non irriguée'. La variabilité d'ajustement osmotique s'étend de 0.00 à 0.61 MPa (Tableau 3 de l'article, page 92).

La grande variabilité génétique observée entre les mutants pour les caractères étudiés indique l'efficacité de l'irradiation gamma pour induire des variations génétiques chez le tournesol pour l'ajustement osmotique et les caractères associées, donc pour la tolérance à la sécheresse. Parmi les mutants étudiés, certains ont des performances supérieures par rapport à la lignée originelle 'AS613'. Par exemple, trois mutants (M6-286-1, M6-575-1 et M6-862-1NI) ont montré une capacité plus élevée d'ajustement osmotique en comparaison avec le génotype 'AS613'. Ces

mutants peuvent être utilisés dans des programmes d'amélioration pour la tolérance à la sécheresse. La lignée 'M6-286-1' a maintenu une forte RWC en condition de contrainte hydrique et également a présenté une capacité d'ajustement osmotique très élevée. Chimenti *et al.* (2002) ont montré que le maintien de la teneur en eau relative (RWC) et un fort ajustement osmotique sont connus pour contribuer à la tolérance à la sécheresse chez le tournesol.

Nous pouvons noter que la lignée 'M6-286-1' pourrait être un mutant d'intérêt pour améliorer la tolérance du tournesol à la sécheresse (Tableau 3 de l'article, page 92).

5.2.2. Identification de marqueurs individuels pour l'ajustement osmotique et les paramètres hydriques associés

Les résultats de l'identification de marqueurs pour différents caractères liés à l'ajustement osmotique ont montré que le nombre de marqueurs associés aux différents caractères varie de deux à huit selon le caractère et les traitements hydriques ('irrigué' et 'soumis à une contrainte hydrique'). Parmi les marqueurs liés à différents caractères, certains sont communs aux différents traitements hydriques et les autres sont spécifiques pour un seul traitement. Par exemple, les marqueurs 'E37M50_10' et 'E33M49_6' ont été identifiés pour la teneur en eau relative (RWC) dans les deux traitements hydriques. De même pour le potentiel osmotique en pleine turgescence, trois marqueurs stable (non spécifiques) ont été identifiés (Tableau 4 de l'article page 93). Dans l'ensemble, le nombre de marqueurs spécifiques est plus élevé que celui des marqueurs non spécifiques pour les différents caractères étudiés (Tableau 4 de l'article, page 93).

Dans cette étude sept marqueurs ont été détectés pour l'ajustement osmotique. Robin *et al.* (2003) ont identifié 13 marqueurs RFLP et SSR qui étaient corrélés avec l'ajustement osmotique (AO) chez le riz. Parmi les marqueurs pour l'ajustement osmotique, cinq ('E38M62_2', 'E38M62_3', 'E38M62_4', 'E33M47_7'

et 'E33M47_12') sont communs au potentiel osmotique à pleine turgescence (Ψ_{sFT}) pour les plantes soumises à la contrainte hydrique (Tableau 4 de l'article, page 93). La présence de ces cinq marqueurs en commun pour ces deux caractères augmente l'ajustement osmotique (valeurs positives pour M1-M0) et diminue le potentiel osmotique en pleine turgescence Ψ_{sFT} (valeurs négatives pour M1-M0) (Tableau 4 de l'article, page 93). Ceci est en accord avec la littérature, où l'ajustement osmotique est défini comme étant l'aptitude des plantes à garder des teneurs en eau élevées au niveau cellulaire par accumulation de solutés (Jamaux *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999) induisant un abaissement du potentiel osmotique dont le résultat serait une augmentation de la turgescence au niveau cellulaire (Maury, 1997). L'ajustement osmotique est associé à l'échelle cellulaire par une accumulation de solutés compatibles qui remplaceraient l'eau dans le maintien de plusieurs réactions biochimiques, et contribueraient par association avec des lipides et des protéines à prévenir la désintégration des membranes cellulaires, ou la dissociation de complexes protéiques ou l'inactivation des enzymes (Bohnert *et al.*, 1996 a ; Zhang *et al.*, 1999).

L'identification des marqueurs AFLP liés à un caractère aussi important que l'ajustement osmotique vu son implication dans la tolérance à la sécheresse et aux caractères qui lui sont associés est un préalable à la sélection assistée par marqueur (SAM) pour améliorer la tolérance à la sécheresse chez le tournesol (Jamaux *et al.*, 1997 ; Allinne *et al.*, 2009) . De même, si un marqueur est associé à un caractère physiologique dans différents environnements, celui-ci pourrait être employé dans de tels programmes de sélection. Dans cette étude, les marqueurs détectés pour la teneur relative en eau et pour le potentiel osmotique à pleine turgescence qui se révèlent stables dans différentes conditions, pourraient être ainsi retenus.

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6.2. *Variations phénotypiques des caractères morphologiques et agronomiques chez le tournesol*

Les résultats montrent qu'il existe une variabilité génotypique significative pour les paramètres morphologiques et agronomiques sous contrainte hydrique au sein de la population des lignées recombinantes de tournesol étudiées. La lignée parentale PAC2 a montré une supériorité significative concernant la masse sèche totale de la plante (Biomass per plant : BIO), la Surface Foliaire à la Floraison (Leaf Area at Flowring : LAF) et la Hauteur de la Plante (Plant Height : PH) en condition de sécheresse par rapport au parent RHA266, alors qu'ils ne présentent pas de différences significatives en condition témoin (Tableau 5 et 6 pages 64 bis et 65 bis). Ce qui prouve l'existence des gènes contrôlant la résistance à la sécheresse pour ces caractères chez la lignée PAC2.

Un gain génétique significatif a été observé pour tous les caractères étudiés quelque soit la condition (serre et champ) ou le traitement hydrique (irrigué ou non irrigué) excepté pour la Surface Foliaire à la Floraison (Leaf Area at Flowring : LAF) en conditions contrôlées pour les plantes bien irriguées. Ce gain génétique qui traduit une ségrégation transgressive positive pourrait être dû à l'accumulation des allèles favorables venant des deux parents chez certains descendants du croisement et à la nature polygénique des caractères agronomiques. Une ségrégation transgressive pour des caractères morphologiques et agronomiques a été reportée pour ces mêmes lignées recombinantes sous des conditions de bonne alimentation hydrique (Al Chaarani *et al.*, 2004), ainsi que pour des caractères liés à la résistance aux maladies, des traits physiologiques de la tolérance à la sécheresse ainsi que ceux liés à la qualité des graines et de leurs germination chez des lignées recombinantes de tournesol (Roustae *et al.*, 2000 a; Hervé *et al.*, 2001; Al-Chaarani *et al.*, 2002 ; 2005 ; Abou Al Fadil *et al.*, 2004 ; 2007 ; Darvishzadeh *et al.*, a et b, 2007 ; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007 a et b; Ebrahimi *et al.*, 2008 ; 2009).

6.3. Les régions chromosomiques d'intérêt pour le rendement et ses composantes chez le tournesol

Des QTLs associés au rendement et les paramètres qui lui sont associés ont été identifiés pour l'ensemble des 8 paramètres étudiés, le pourcentage de la variance phénotypique (R^2) expliqué par chaque QTL se situe entre 4% et 40%. Les phénotypes transgressifs observés pour quelques caractères ont pu être expliqués par la présence de QTLs de signes opposés chez les deux parents. La majorité des QTLs identifiés pour les caractères agronomiques étudiés sont spécifiques aux conditions de traitements hydriques, et un nombre moins important de QTLs sont communs (non spécifiques) aux deux conditions de traitements hydriques.

Concernant le rendement en grains par plante (GYP), 21 QTLs au total ont été identifiés dont neuf sont spécifiques à une seule condition. Les deux lignées parentales participent équitablement dans l'expression des QTLs qui contrôlent le rendement en grains par plante. Les QTLs communs aux différentes conditions (constitutifs) contrôlent l'expression d'un caractère agronomique sans être influencés par le traitement hydrique, à l'opposé les QTLs adaptatifs sont ceux qui interviennent sur les caractères dans un traitement hydrique donné. L'existence de QTLs spécifiques, et d'effets différentiels des QTLs dans les deux traitements hydriques peuvent expliquer les interactions 'génotype x traitement hydrique' qui ont été démontrés également par Beavis et Kim (1996) et par Allinne *et al.* (2009).

Dans de nombreux cas, un QTL s'est avéré être associé à plusieurs caractères dans les différentes conditions (champ et serre ; bien-irriguée et non irriguée). Par exemple, dans le groupe de liaison 7 sont associés les caractères : Nombre de Feuilles par plante (Leaf Number : LN), Surface Foliaire à la Floraison (Leaf Area at Flowring : LAF), Durée de la Surface Foliaire (Leaf Area Duration : LAD), la Hauteur de la Plante (Plant Height : PH), Précocité de la Floraison (Days from Sowing to Flowring :DSF), le Poids du Capitule (Head Weight : HW) et la masse sèche totale par plante (Biomass per plant : BIO) dans les différentes conditions

étudiées, suggérant l'existence d'une région chromosomique commune pour les caractères morphologiques et agronomiques.

La majorité des QTLs pour le rendement par plante (GYP) sont co-localisées avec les QTLs associés aux caractères agronomiques ou morphologiques (Article 1, Tableau 3 page 58). Par exemple, 5 QTLs liés au rendement par plante (GYP) et ceux associés au poids du capitule (HW) et également à plusieurs QTLs contrôlant les caractères morphologiques et agronomiques sur les groupes de liaisons 2, 4, 5 et 10 sont situés dans la même position. Seulement deux QTLs associés au rendement par plante sont individuellement situés sur les groupes de liaisons 4 (*GYPN.4.1*) et 7 (*GYPI.7.1*). La co-localisation des QTLs associés au rendement avec les QTLs associés aux différents caractères morphologiques et agronomiques confirme les corrélations génétiques entre le rendement et les caractères morphologiques ou agronomiques. Ceci a été déjà observé chez le tournesol (Mokrani *et al.*, 2002; Bert *et al.*, 2002 a; Al-Chaarani *et al.*, 2004 a).

Le QTL le plus important pour le rendement par plante, qui est lié à un marqueur SSR (ORS391), est situé sur le groupe de liaison 14 (intervalle 73.3-75.3 cM). Ce QTL majeur explique 40%, 31% et 4% de la variance phénotypique pour le rendement dans trois conditions (bien irrigué et stressé en serre, et non irrigué au champ). Ce QTL est co-localisé avec les QTLs contrôlant le nombre de feuilles par plante (LN) et la Hauteur des Plantes (PH). Ce résultat confirme les relations entre rendement et l'architecture des plantes. De même, le poids du capitule (HW) et la masse sèche de la plante (BIO) sont les caractères majeurs qui contribuent dans l'élaboration du rendement en grain par plante. La durée de la surface foliaire (Leaf Area Duration : LAD), comparativement à la surface foliaire à la floraison (Leaf Area at Flowring : LAF), présente une corrélation plus élevée avec le rendement et ceci dans toutes les conditions. Ce résultat indique que le maintien d'une surface foliaire verte le plus longtemps possible après l'anthèse est important pour avoir un rendement en grains élevée sous les différents types de traitement

hydrique. Il a été reporté que le maintien d'une surface foliaire verte pour une durée plus longue en période de post floraison, et par voie de conséquences le maintien d'une certaine activité photosynthétique, contribue à augmenter le rendement de la majorité des plantes cultivées (Evans *et al.*, 1993 ; Richards, 2000).

6.4. Comparaison des QTLs des caractères agronomiques avec ceux des caractères associés à la tolérance à la sécheresse

Un intérêt majeur est attribué à l'identification des QTLs et à l'analyse des associations entre les différents caractères notamment en conditions de stress hydrique. Nous avons pu noter des co-localisations de QTLs contrôlant les caractères agromorphologiques de notre étude et les caractères adaptatifs associés à la tolérance à la sécheresse (Poormohammad Kiani *et al.*, 2007 b) présentés dans le tableau 4 de l'article 1, page 61. Un tel résultat pourrait s'expliquer par des effets pléiotropiques des gènes (QTLs) ou par des loci étroitement liés. Par exemple, les quatre QTLs liés aux différents caractères morphologiques et au rendement par plante (*GYPW.5.1*, *HWW.5.1*, *LNN.5.2* et *LAFN.5.1*) sont tous situés dans la même région que cinq QTLs liés aux caractères adaptatifs ('*OA.5.2*', '*OPF.WS.5.1*', '*RWC.WS.5.1*', '*RWC.WW.5.1*' et '*LWP.WS.5.1*') sur le groupe de liaison 5. Cette région, qui est liée à un marqueur SSR (*ORS523-1*), semble être très importante dans la tolérance au stress hydrique et également pour la productivité .

La co-localisation de QTLs associés aux paramètres adaptatifs (la teneur en eau relative et l'ajustement osmotique) avec ceux associés aux caractères agronomiques (l'architecture des plantes et la productivité) sur le groupe de liaison 5 peut être due à l'existence d'un lien physiologique entre la tolérance au stress hydrique et la productivité. On observe également ce phénomène sur différents groupes de liaisons notamment sur les groupes de liaisons 7 et 16 (Tableau 4 de l'article 1 page 61). Ce dernier montre une co-localisation entre potentiel de turgescence (Ψ_t) et les paramètres de développement dans la même position sur le groupe de liaison 7.

Au total, trois QTLs contrôlant le rendement par plante dans différentes conditions ('*GYPW.5.1*', '*GYPI.12.1*' et '*GYPD.16.1*') sont situés dans la même position que certains QTLs associés aux caractères physiologiques impliqués dans la tolérance à la sécheresse (voir les groupes de liaisons 5, 12 et 16). Ces résultats montrent que des régions génomiques peuvent être associées à la fois à la tolérance à la sécheresse et aux caractères agronomiques, ainsi cette région présente un intérêt majeur pour la sélection de génotypes performants pouvant concilier une bonne production et une aptitude à tolérer une situation de sécheresse.

Nous avons remarqué l'association entre différents caractères par co-localisation des QTLs. Cette étude nous a permis d'identifier des QTLs constitutifs (communs aux différents environnements) et adaptatifs (spécifiques aux différents environnements) pour un grand nombre de caractères impliqués dans l'élaboration du rendement et ceux liés à la tolérance à la sécheresse chez le tournesol. L'identification de telles régions génomiques, sera utile au développement de programmes de sélection pour la tolérance à la sécheresse chez le tournesol.

6.5. Variabilité génétique et identification de marqueurs moléculaires pour l'ajustement osmotique et les paramètres hydriques associés chez une population de mutants de tournesol

Il apparaît important d'identifier des marqueurs associés à l'aptitude d'un génotype à développer un ajustement osmotiquement en raison de l'intérêt de ce phénomène dans le maintien de plusieurs fonctions physiologiques associées au rendement chez les plantes cultivées (Zhang *et al.*, 1999 ; Teulat *et al.*, 2001). L'identification de tels liens entre un marqueur et un caractère important dans les phénomènes de tolérance à la sécheresse pourrait ainsi contribuer au développement de programmes de sélection assistée par marqueurs.

Dans cette perspective, l'étude réalisée au sein de la population de mutants (lignées M6) et la lignée originelle (AS613) , a démontré un effet significatif du

traitement hydrique pour la teneur en eau relative (RWC), le potentiel osmotique à pleine turgescence (Ψ_{sFT}) et l'ajustement osmotique (AO). Une variation génétique significative entre les mutants pour tous les caractères de l'état hydrique étudiés a été observée. La variabilité d'ajustement osmotique s'étend de 0.00 à 0.61 MPa. Poormohammad kiani *et al.* (2007a), en faisant l'analyse génétique des paramètres liés à l'état hydrique et à l'ajustement osmotique sur une population de lignées recombinantes de tournesol a identifié une gamme de variation comparable pour l'ajustement osmotique.

Nous avons observé une interaction significative entre traitement hydrique et génotype, suggérant que la réponse au stress hydrique pour un génotype donné par rapport à d'autres génotypes change suivant les traitements hydriques subis par la plante.

La grande variabilité génétique observée entre les mutants pour les caractères étudiés indique l'efficacité de l'irradiation gamma pour induire la variation génétique chez le tournesol pour l'ajustement osmotique et les caractères associés, donc pour la tolérance à la sécheresse. Trois lignées M6 parmi les mutants étudiés M6-286-1, M6-575-1 et M6-862-1NI, ont des performances supérieures par rapport à la lignée originelle 'AS613'. Ces mutants pourraient être utilisés dans des programmes d'amélioration pour la tolérance à la sécheresse. La lignée 'M6-286-1' présente une forte RWC en condition de contrainte hydrique et également une capacité d'ajustement osmotique très élevée. Ce génotype présente un intérêt particulier en terme de tolérance à la sécheresse. Chimenti *et al.* (2002), ont démontré que le maintien de la teneur relative en eau et un fort ajustement osmotique sont connus pour contribuer à la tolérance à la sécheresse chez le tournesol. De nombreuses études ont montré l'aptitude du tournesol à l'ajustement osmotique au cours de la chute du potentiel hydrique foliaire (Jones et Turner 1980, Maury *et al.*, 1996, Chimenti *et al.*, 2002). Jones et Turner (1980) ont montré que les ions inorganiques (K^+ , Na^{++} , Ca^{++} , NO_3^-) sont impliqués dans l'ajustement

osmotique chez le tournesol, suggérant un faible coût énergétique pour ce dernier chez cette espèce. Des corrélations significatives entre l'ajustement osmotique (AO) et le potentiel de turgescence (Ψ_t) ont été démontrées, suggérant que l'aptitude des génotypes à maintenir la turgescence est reliée à la capacité d'ajustement osmotique (Zhang *et al.*, 1999; Maury *et al.*, 2000; Poormohammad Kiani *et al.*, 2007a).

L'ajustement osmotique est considéré comme un mécanisme adaptatif important pour le maintien de plusieurs fonctions physiologiques comme l'activité photosynthétique pendant la déshydratation (Conroy *et al.*, 1988, Nouri et Ykhlef, 2002), par son rôle positif dans le maintien de la turgescence (Turner et Jones, 1980; Maury *et al.*, 2000; Ober *et al.*, 2005 ; Poormohammad Kiani, 2007). Ces résultats, montrent que les caractères inductibles par une large gamme d'intensité de contrainte hydrique, comme l'AO, et présentant une variabilité génétique élevée sont des caractères importants pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse (Zhang *et al.*, 1999).

Une corrélation négative entre le niveau d'ajustement osmotique et la teneur relative en eau a été relevée chez des lignées recombinantes de tournesol sous conditions sèches (Poormohammad Kiani, 2007). La population de mutants analysée ici a permis l'identification de lignées ayant des comportements contrastés ; en effet, deux mutants l'un caractérisé par une forte capacité d'ajustement osmotique mais avec une teneur relative en eau faible (M6-575-1) et l'autre avec une faible capacité d'ajustement osmotique pour une teneur en eau relative élevée (M6-381-1-1) ont été identifiés. Ces deux mutants qui révèlent des stratégies d'adaptations différentes en conditions sèches, pourraient être utilisés comme lignée parentale pour la création d'une nouvelle population en ségrégation pour des études complémentaires sur la tolérance du tournesol au stress hydrique.

Des marqueurs individuels liés à l'ajustement osmotique et les caractères associés ont été identifiés. Certains marqueurs sont communs entre les différents traitements hydriques (non spécifiques) et certains sont spécifiques à un traitement

hydrique. Nous avons identifié sept marqueurs AFLP pour l'ajustement osmotique. Robin *et al.* (2003) ont également identifié 13 marqueurs du type RFLP et SSR corrélés avec l'ajustement osmotique (AO) chez une population hybride de riz. Les marqueurs AFLP identifiés pour l'ajustement osmotique et les paramètres qui lui sont associés pourraient être utilisés dans les programmes de sélection du tournesol pour la tolérance à la sécheresse.

6.6. Perspectives

Concernant les perspectives de cette thèse, plusieurs axes de recherches pourraient être envisagés.

Un premier axe de recherche pourrait concerner la validation des QTLs identifiés dans cette étude. En effet, les caractères quantitatifs ont été décomposés en composantes mendéliennes (QTLs) pour mieux comprendre l'architecture génétique des caractères étudiés au sein du génome. A moyen terme, l'utilisation de cette information et son intégration dans les programmes de sélection assistée par marqueurs pourrait entraîner des gains génétiques importants (Ribaut et Ragot, 2007). Cependant, la sélection assistée par marqueurs reste encore très controversée (Dudley, 1993 ; Strauss *et al.*, 1992). La stabilité de l'expression des 'QTLs' selon le milieu (Ribaut et Ragot, 2007 ; Beavis et Grant, 1991; Paterson *et al.*, 1991), vis-à-vis du fond génétique (Charcosset *et al.*, 1993), à travers les générations et selon le stade de développement (Bradshaw et Stettler, 1995) sont autant d'aspects qui pourraient ralentir l'utilisation des marqueurs identifiés en sélection. La validation des QTLs pourrait être envisagée dans d'autres environnements pédoclimatiques, en particulier dans les conditions de cultures Algériennes, où les périodes sèches sont plus précoces et plus intenses.

Un deuxième axe de recherche visant à identifier d'une manière plus précise les zones du génome impliquées dans l'expression des caractères agro - physiologiques liés à la tolérance à la sécheresse du tournesol pourrait être développé. Pour cela, les lignées recombinantes présentant un polymorphisme dans

l'intervalle de la zone identifiée pourraient être croisées entre elles pour générer des génotypes présentant des recombinaisons dans cette zone. L'identification de marqueurs moléculaires dans cette zone permettrait d'identifier des marqueurs étroitement liés aux caractères étudiés. La zone du groupe de liaison 5 où des QTLs associés aux caractères agronomiques (l'architecture des plantes et la productivité) sont co-localisés avec des QTLs associés aux paramètres adaptatifs (la teneur en eau relative et l'ajustement osmotique) pourrait être plus spécifiquement étudiée dans cette perspective.

Les mutants présentant des aptitudes contrastées quant à leurs capacités d'ajustement osmotique pourraient être également utilisés comme lignées parentales pour la création de populations en ségrégation. Ainsi, les bases génétiques de l'ajustement osmotique, caractère impliqué dans le maintien de plusieurs fonctions physiologiques sous contrainte hydrique, pourraient être mieux précisées pour cette population de tournesols. L'ajustement osmotique est qualifié de «fonction large» permettant de favoriser la stabilité du rendement en conditions de déficits hydriques intermittents et modérés. A long terme, la localisation précise des gènes qui affectent les caractères quantitatifs comme ceux associés à la tolérance à la sécheresse devrait permettre de caractériser et utiliser ces gènes dans des programmes de sélection du tournesol.

Enfin, un troisième axe de recherche pourrait consister à identifier des idéotypes pour des environnements cibles en Algérie. En effet, le phénotypage de ces deux populations de tournesol, lignées recombinantes et mutants, a permis d'identifier des génotypes présentant des réponses contrastées à la contrainte hydrique. Il pourrait être envisagé de sélectionner les génotypes les plus contrastés, de les évaluer *in situ* en Algérie, afin d'identifier les caractéristiques génotypiques les plus performantes dans les conditions de contraintes hydriques des zones de cultures potentielles. Cette recherche d'idéotype pourrait s'appuyer également sur des expérimentations virtuelles à partir du modèle de culture développé à Toulouse

sur le tournesol (modèle SUNFLO). Ainsi, la combinaison de la génétique quantitative (QTL) et de tels modèles de cultures devraient permettre de prévoir quels allèles seraient favorables pour des scénarios de sécheresse variés (Reymond *et al.*, 2003; Hammer *et al.*, 2005 ; Tardieu et Zivy, 2006). Une telle démarche associant la génétique, l'écophysiologie et la modélisation agronomique permettrait à la fois d'identifier des génotypes adaptés aux conditions sèches algériennes et de proposer des conduites culturales adaptées, et ainsi valoriser les interactions génotype et environnement dans une perspective de développement de la culture du tournesol en Algérie.

7. Références bibliographiques

- Abou Al Fadil, T., Dechamp-Guillaume, G., Poormohammad Kiani, S. and Sarrafi, A. (2004)* : Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed.* **58** : 323-328.
- Abou Al Fadil, T., Poormohammad Kiani, S., Dechamp-Guillaume, G., Darvishzadeh, R. and Sarrafi, A. (2007)* : Genetic control of partial resistance to collar and root isolates of *Phoma macdonaldii* in sunflower. *Eur. J. Plant Pathol.* **117** : 341-346.
- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M. and Nichterlein, K. (2004)* : Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica.* **135**: 187-204.
- Al-Chaarani, G.R, Roustae, L., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G. and Sarrafi, A. (2002)* : A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theor. Appl. Genet.* **104** : 490–496.
- Al-Chaarani, G.R., Gentzbittel, L., Huang, X.Q. and Sarrafi, A. (2004 a)* : Genotypic variation and identification of QTLs for agronomic traits, using AFLP and SSR markers in RILs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **109** : 1353–1360.
- Al-Chaarani, G.R., Gentzbittel, L., Wedzony, M. and Sarrafi, A. (2005)* : Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci.* **169** : 221–227.
- Al-Charrani, G., Gentzbittel, L., Barrault, G., Lenoble, S. and Sarrafi, A. (2004b)* : The effect of gamma rays and genotypes on sunflower organogenesis traits. *J. Genet. Breed.* **58** : 73.
- Alejo-James, A., Jardinaud, M.F., Maury, P., Alibert, J., Gentzbittel, L., Sarrafi, A., Grieu, P. and Petitprez, M. (2004)* : Genetic variation for germination and physiological traits in sunflower mutants induced by gamma rays. *J. Genet. Breed.* **58** : 285-294.
- Allinne, C. (2009)* : Modélisation écophysiological et analyse génétique pour la

recherche de géotypes de tournesol adaptés aux basses températures associées aux semis précoces. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Pp 159.

Allinne, C., Maury, P., Sarrafi, A. and Grieu, P. (2009) : Genetic control of physiological traits associated to low temperature growth in sunflower under early sowing conditions. *Plant Science*. **177** : 349-359.

Allkhverdiev, S.L. et Sakamoto, A.A. (2000) : Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus* : contribution of water channel. *Plant Physiol*. **122** : 1201-1208.

Almeida, J.A.S. (1992) : Contrôle da iniciação floral em *Helianthus annuus* L. (Girassol). Thèse. Universidade Estadual de Campinas. Brasil 131p.

Almeida, J.A.S. and Pereira, M.F.D.A. (1996) : The control of flower initiation by gibberellin in *Helianthus annuus* L. (sunflower), a non-photoperiodic plant. *Plant Growth Regulation*. **19** : 109-115.

Alvarez, D., Ludueña, P. and Fructos, E. (1992) : Variability and genetic advance in the sunflower. Proc 13th Sunflower Int Conf, Pisa, Italy. Pp 963-968.

Alza, J.O. and Fernandez-Martinez, J. M. (1997) : Genetic analysis of yield and related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in dryland and irrigated environments. *Euphytica*. **95** : 243-251.

Arabi, M. I., Barrault, G., Sarrafi, A. et Albertini, L., (1991) : Effet de l'irradiation des semences d'orge (*Hordeum vulgare*) sur la croissance des jeunes plantules et la résistance au *Drechslera teres*. *Can. J. Bot.* **69** : 2197-2200.

Bajji, M., Lutts, S. et Kinet, J.M. (2000) : La résistance au stress hydrique chez le blé dur : comparaison des comportements au niveau cellulaire et au niveau de la plante toute entière. *Option Méditerranéennes N°40* , 227-231.

Bammoun, A. (1997) : Contribution à l'étude de quelques caractères morphophysiologicals, biochimiques et moléculaires chez des variétés de blé dur, *Triticum turgidum* esp. *durum*, pour l'étude de la tolérance à la sécheresse dans la région des hauts plateaux de l'ouest Algérien. Thèse de Magistère, p. 1-33.

- Barrs, H.D. (1968)** : Determination of water deficits in plant tissues. In *Water Deficits and Plant Growth* (ed. T.T. Kozlowski), pp. 235–368. Academic Press, New York.
- Beavis, W.D. and Grant, D. (1991)** : A linkage map based on information from F2 populations of maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* **88** : 636-644.
- Beavis, W.D. and Kim, P. (1996)** : Identification of quantitative trait loci that are affected by environment. In: M.S. Kang, H. G. Gauch (eds) Genotype-by-environment interaction. C.R.C. Press. Boca Raton, pp. 123–149.
- Bedov, S. (1985)**. A study of combining ability for oil and protein contents in seed of different sunflower inbred. In Proc. 10th Int. Sunflower Conf. Mar del Plata, Argentina. 10-13 Mar. 1985. *Int. Sunflower assoc. Paris, France*, p 675-682.
- Bedrani, S. (2008)** : Algérie. L’agriculture, l’agro-alimentaire, la pêche et le développement rural. Les monographies de CIHEAM (Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes) . INA. El Harrache. Alger.
- Belhassen, E., This, D. et Monneveux, P. (1995)** : L’adaptation génétique face aux contraintes de la sécheresse. *Cahiers Agricultures*, **4** : 251-261.
- Benassi, J.L. (2009)** : Les marchés des oléagineux, synthèse hebdomadaire. Oil World, les Marchés, la Dépêche, SAIPOL, USDA. 4 pp.
- Benassi, J.L. et Labonne, M. (2004)** : Prospects for the oilseeds in the Maghreb countries: Algeria, Morocco and Tunisia 2000-2015. OCL. Oléagineux, corps gras, lipides ISSN 1258-8210. **Vol. 11**, n°2, pp. 92-96.
- Berry, S.T., Leon, A.J., Hanfrey, C.C., Challis, P., Burkholz, A., Barnes, S.R., Rufener, G.K., Lee, M. and Caligari, P.D.S. (1995)** : Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **91** : 195-199.
- Bert, P. F., Jouan, I., Tourvielle de Labrouhe, D., Serre, F., Philippon, J., Nicolas, P. and Vear, F. (2002 a)** : Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3. Characterisation of QTL involved in developmental and agronomic traits. *Theor. Appl. Genet.* **107** : 181-189.
- Bert, P.F., Jouan, I., Tourvielle de Labrouhe, D., Serre, F., Nicolas, P., and Vear, F.**

- (2002 *b*) : Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor. Appl. Genet.* **105** : 985–993.
- Blanchet, R. (1987)** : Principaux caractères agronomiques et physiologiques déterminant la production des graines de tournesol. *Revue Française des Corps Gras.* **2** : 75-80.
- Blanchet, R. (1989)** : Physiologie agronomique du tournesol. Rapports d'activité, INRA station.
- Blanchet, R. (1994)** : Ecophysiologie et élaboration du rendement du tournesol. Principaux caractères. Combe L, Picard D. Un point sur l'élaboration du rendement des principales cultures annuelles. Paris, INRA, 87-99.
- Blanchet, R. and Merrien, A. (1982)** : Influence of water supply on assimilation, yield components and oil-protein production of sunflower. *In: Proc. Sunflower workshop, ECC plant protein programme, Athens, Greece, 185-201.*
- Blanchet, R., Merrien, A., Gelfi, N., Cavalie, G., Courtiade, B. and Puech, J. (1982)** : Estimation and comparative changes of net assimilation in canopies of maize (*Zea mays* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.) and soyabean (*Glycine max* L. Merrill) during development. *Agronomie.* **2** : 125-132.
- Blanchet, R., Texier, V., Gelfi, N. and Rollier, M. (1990)** : Articulation des divers processus d'adaptation à la sécheresse et comportements globaux du tournesol. *In: Proc. Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation. Points Science du CETIOM, Paris, p.32-44.*
- Blum, A. (1988)** : Plant Breeding For Stress Environment. *CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.*
- Blum, A. (1989)** : Osmotic adjustment and growth of Barley genotypes under drought stress . *Crop Sci.*, **29** : 230-233.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1996 a)** : Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.* **7** : 1099–1111.
- Bonjean, A. (1994)** : Le tournesol. Paris, les éditions de l'environnement . 242p.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Dvies, R.W. (1980).** Construction of genetic

- linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am.J. Hum.Genet.* **32**, p. 314–331.
- Bover, F. (2009)** : Le marché des oléagineux. *Oil World, France Agri Mer.* USDA. Commission européenne.
- Boyer, J.S. (1967)** : Matric potential of leaves. *Plant Physiology.* **42** : 213–217.
- Boyer, J.S. (1968)** : Relationships of water potential to growth of leaves. *Plant physiology.* **43** : 1056–1062.
- Boyer, J.S. (1969)** : Measurement of the water status of plants. *Annual Review of Plant Physiology.* **20** : 351–364.
- Boyer, J.S. (1971)** : Resistances to water transport in soybean, bean and sunflower. *Crop Science.* **11** : 403–407.
- Boyer, J.S. (1974)** : Water transport in plants: Mechanism of apparent changes in resistance during absorption. *Planta.* **117** : 187–207.
- Boyer, J.S. (1985)** : Water transport. *Annual Review of Plant Physiology.* **36** : 473–516.
- Bradshaw, H.D. and Stettler, R.F. (1995)** : Molecular genetics of growth and development in Populus. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form and phenology traits in a forest tree. *Genetics.* **139** : 963-973.
- Branch, Z.D. (2006)** : Variability among advanced gamma-irradiation induced large-seeded mutant breeding lines in the ‘Georgia Brown’ peanut cultivar. *Plant Breeding.* **121**: 275-277.
- Bureau, C. (2003)** : Des intérêts convergents : selon Xavier Beulin. *Communiqué de presse.*
- Burke, J.M., Knapp, S.J. and Rieseberg, L.H. (2005)** : Genetic consequences of selection during the evolution of cultivated sunflower. *Genetics.* **171**: 1933–1940.
- Castiglioni, P., Ajmone-Marsan, P., Van Wijk, R. and Motto, M. (1999)** : AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 425-431.
- Ceccarelli, S. et Grandi, S. (1996)** : Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant*

- Growth Regulation*. **20** : 149-155.
- Cetiom, (2003)** : Tournesol : les techniques culturales, le contexte économique. *Grignon*.
Edition CETIOM. 37 pp.
- Chadefaud, M. et Emberger, L. (1960)** : Les végétaux vasculaires. Tome II du Traité de
Botanique Systématique, Masson, Paris, p 1540.
- Charcosset, A., Causse, M. et Santoni, S. (1993)** : Influence du fond génétique sur
l'expression de QTLs de précocité chez le maïs. Méribel, Groupe de travail
Marqueurs Moléculaires chez les végétaux. 98-109.
- Chimenti, C. A., Marcantonio, M., Pearson, J. and Hal, A.J. (2006)** : Divergent
selection for osmotic adjustment results in improved drought tolerance in maize
(*Zea mays* L.) in both early growth and flowering phase. *Field Crops Res.* **95**: 305–
315.
- Chimenti, C., Belhassen, E., Cantagallo, J. and Hall, A. (1995)** : Variability for osmotic
adjustment in 4 interspecific genotypes of Genus *Helianthus*. *INRA, Inter drought*,
II-1.
- Chimenti, C., Cantagallo, J. and Guevara, E. (1995)** : Osmotic adjustment in Maize :
Genetic variations in association with water uptake. *INRA, Inter drought*, VIII-30.
- Chimenti, C.A. and Hall, A.J. (1993)** : Genetic variation and changes with ontogeny of
osmotic adjustment in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*. **71**, 201–210.
- Chimenti, C.A. and Hall, A.J. (1994)** : Responses to water stress of apoplastic water
fraction and bulk modulus of elasticity in sunflower (*Helianthus annuus* L.)
genotypes of contrasting capacity for osmotic adjustment. *Plant and Soil*. **166**,
101–107.
- Chimenti, C.A., Giuliano, J. and Hall, A. (2004)** : Osmotic adjustment, its effects on
yield maintenance under drought in sunflower. *In: Proc. XVI International
Sunflower Conference, Fargo, USA*. **1**: 261-266.
- Chimenti, C.A., Pearson, J., Hal, A.J. (2002)** : Osmotic adjustment and yield
maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* **75**: 235–246.
- Connor, D.J. and Hall, A.J. (1997)** : Sunflower physiology. *In: Schneiter AA (ed.)*

Sunflower technology and production, Acamemic press Inc. ed, vol. 35. American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc. *Soil Science Society of America Inc.*, Madison, Wisconsin, USA, pp.113-182.

Conroy, J.P., Virgona, J.M., Smillie, R.M. and Barlow, E.W. (1988) : Influence of drought acclimation and CO₂ enrichment on osmotic adjustment and chlorophyll a fluorescence of sunflower during drought. *Plant Physiology* . **86**, 1108–1115.

Cornaire, B., Phamthi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Daniel, C. and Vieira Da Silva, J.B. (1995) : Contribution to study on oil palm drought tolerance: Protoplasmic resistance. *INRA, Inter drought*, VI-7.

Cosgrove, D.J. (1993) : Water uptake by growing cells: An assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *International Journal of Plant Sciences* **154**, 10–20.

Cresti, M., Blackmore, S. and Went, J.L. (1992) : Atlas of sexual reproduction in flowering plants. Berlin, Springer-Verlag.

Darvishzadeh, R. and Sarrafi, A. (2007 b) : Genetic analysis of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower measured by a seedling test. *Plant Breeding*. **126** : 334-336.

Darvishzadeh, R., Poormohammad Kiani, S., De Champ-Guillaume, G., Gentzbittel, L. and Sarrafi, A. (2007 a) : Quantitative trait loci associated with isolate – specific and isolate – non specific partial to *Phoma macdonalii* isolates in sunflower. *Plant Pathology* . **56** : 855-861.

Darvishzadeh, R., Poormohammad Kiani, S., Huguet, T. and Sarrafi, A. (2008) : Genetic variation and identification of molecular markers with partial resistance to black stem in gamma-irradiation induced mutants in sunflower. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **30** : 106-114.

De Vienne, D. et Causse, M. (1998) : La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In: Proc. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Edit INRA, p. 200.

Difonzo, N., Flagella, Z. and Campanile, R.G. (2000) : Resistance to abiotic stresses in

durum wheat : witch ideotype ?. *Option méditerranéenne*, N°40, 215-225.

Djebrani, M. (2000) : Adaptation au déficit hydrique de quatre variétés de blé dur. *Symposium Blé 2000*. 161-169.

Djekoune, A. (1995) : Stratégie d'amélioration pour la tolérance au déficit hydrique : Le blé dur et l'orge : Ecophysiologie, phytotechnie, qualité des produits de base et transformés. *Med céréales*.

Dudley, J.W. (1993). Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci.* **33** : 660-668

Ebrahimi, A. (2008) : Contrôle génétique de la qualité des graines chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. 168 pp.

Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Poormohammad Kiani, S., Nabipour, A., Shariati, F., Grieu, P. and Sarrafi, A. (2008) : QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome.* **51**: 599–615.

Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Calmon, P., Grieu, P. and Sarrafi, A. (2009) : QTL mapping of protein content and seed characteristics under water-stress conditions in sunflower. *Genome.* **52** : 419-430.

Ebrahimi, A., Maury, P., Berger, M., Shariati, F., Grieu, P. and Sarrafi, A. (2008) : Genetic improvement of oil quality in sunflower mutants under water stressed conditions. *In Proceedings of the 17th International Sunflower Conference*. Cordoba, Spain. June 8 –12, 2008. Edited by Velasco, L. p. 509-512.

El Jaafari, S. (1993) : Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de la résistance à la sécheresse chez le blé (*Triticum aestivum* L.). Thèse de doctorat d'état, 3-34.

El Jaafari, S. (2000) : Durum wheat breeding for abiotic stresses resistance : Defining physiological traits and criteria. *Option méditerranéenne*, N°40 ; 251-256.

El-Hity, M.A. (1992) : Genetical analysis of some agronomic characters in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: Proc 13th Sunflower Int Conf, Pisa, Italy, pp1118-1128.

Encheva, J., Christov, M., Nenov, N., Tsvetkova, F., Ivanov, P., Shindrova, P. and

- Encheva, V. (2003)** : Developing genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by combined use of hybridization with gamma radiation or ultrasound. *Helia*. **26** : 99-108.
- Evans, J.R., Jakobsen, I. and Ogren, E. (1993)** : Photosynthetic light-response curves. 2. Gradients of light absorption and photosynthetic capacity. *Planta*. **189**, 191–200.
- Falconer D.S. et Mackay T.F.C. (1996)**. Introduction to Quantitative Genetics. 4rd edn. Longman, Harlow.
- Fick, G.N. (1978)** : Sunflower breeding and genetics. In: Carter JF (ed) Sunflower science and technology. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 279-327.
- Fick, G.N. and Miller, J.F. (1997)** : The genetics of sunflower. In: Shneither AA (ed) Sunflower technology and production. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 441-495.
- Flénet, F. (1994)** : Adaptation du tournesol à la sécheresse: Influence de l'intensité et du stade d'application de la contrainte hydrique. PhD Thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 109p.
- Flénet, F., Bouniols, A., Sarkkinen, E.S. and Saraiva, C. (1996)** : Sunflower response to a range of soil water contents. *European Journal of Agronomy*. 1-7.
- Flores Berrios, E., Gentzbittel, L., Kayyal, H., Alibert, G. and Sarrafi, A. (2000a)** : AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **101**: 1299-1306.
- Flores Berrios, E., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Alibert, G., and Sarrafi, A. (2000b)**. Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 606–612.
- Flores Berrios, E., Sarrafi, A., Fabre, F., Alibert, G., and Gentzbittel, L. (2000c)** : Genotypic variation and chromosomal location of QTLs for somatic embryogenesis revealed by epidermal layers culture of recombinant inbred lines in the sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **101**:1307-1312.
- Frova, C., Krajewski, P., Di Fronzo, N., Villa, M. and Sari-Gorla, M. (1999)** : Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components.

Theor. Appl. Genet. **99** : 280–288.

Gachon, L. (1972) : Les besoins en éléments nutritifs du tournesol. *Proceeding of the 5th International Sunflower Conference*. Clermont Ferrand, France, p 63-72.

Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang, Y-X, Bervillé, A. and Nicolas, P. (1995) : Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **90** : 1079–1086.

Grieu, P., Maury, P., Debaeke, M. et Sarrafī A. (2008) : Améliorer la tolérance à la sécheresse du tournesol : apport de l'écophysiologie et de la génétique. *Innovation Agronomique.* **2** : 37-51.

Gupta, K.K. and Khanna, K.R. (1982) : Gene action and heterosis for oil yield and component characters in sunflower. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding.* **42**: 265-271.

Gupta, P.K., Roy, J.K. and Prasad, M. (2001) : Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants [Review]. *Curr. Sci.* **80** : 524–535.

Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C. and Ramesh, B. (1999) : Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding.* **118**: 369–390.

Haanstra, J.P.W., Wye, C., Verbakel, H., Meijer-Dekens, F., Van den Berg, P., Odinet, P., Van Heusden, A.W., Tanksley, S., Lindhout, P. and Peleman, J. (1999) : An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii* F2 populations. *Theor. Appl. Genet.* **99** : 254-271.

Hachemi, N. (2006) : Impact prévisible de l'intégration de l'Algérie à la zone de libre échange Union Européenne et Organisation Mondiale du Commerce sur la filière huile alimentaire. Magister en Science Agronomiques. Institut National Agronomique - El Harrach – Alger.

Hales, N. (2002) : Algeria oilseed and products annual 2001. *Foreign Agricultural Service. Gain Report. Global Agriculture Information Network (USDA).*

Haley, C.S. and Knott, S.A. (1992) : A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity.* **69**: 315–324.

- Hall, A.J., Whitfield, D.H. and Connor, D.J. (1990)** : Contribution of pre-anthesis assimilates to grain filling in irrigated and water-stressed sunflower crops. II . Estimates from a carbon budget. *Field Crops Research* **24**: 273–294.
- Hammer, G., Chapman, S., Van Oosterom, E. and Podlich, D. (2005)** : Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems. *A.J.A.R.* **56** : 947-960.
- Hamon, S. (2007)** : L'amélioration de la résistance à la sécheresse peut-elle être basée sur les methods de selection traditionnelles et/ou sur les methods biotechnologiques modernes ? possibilités et limites respéctives. Actes des JISRAUF. Hanoi. 6 pp.
- Hare, P.D., Cress, W.A. and Van, Staden J. (1998)** : Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment.* 21: 535-553.
- Hayek, T., Bensalem, M. et Zid E. (2000)** : Mécanisme ou stratégie de résistance à la sécheresse : cas du blé, de l'orge et du triticale. *Option méditerranéenne, N° 40.* 287-290.
- Heiser, C. B (1985)** : Jr. Taxonomy of Helianthus and Origin of Domesticated Sunflower. *In: Proc. Sunflower Science and Technology. Agron.* **19**. Ed. Carter, J. F. Pp. 31-53.
- Hervé, D., Fabre, F., Flores Berrios, E., Leroux, N., Al-Chaarani, Gh., Planchon, C., Sarrafi, A. and Gentsbittel, L. (2001)** : QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L) under green house condition. *J. Exp. Bot.* **52**: 1857-1864.
- Hopkins, W.G. (1999)** : Introduction to plant physiology. Second edition. The university of Western Ontario. Edit. John Wilay and Sons., Inc. 512p.
- Jamaux, I., Steinmetz, A. and Belhassen, E. (1997)** : Looking for molecular and physiological markers for osmotic adjustment in sunflower. *New Phytol.* **137**: 117-127.
- Jan, C.C. (1992)** : Inheritance and allelism of mitomycin C- and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci.* **32**. 317–319.
- Jan, C.C. and Rutger, J.N. (1988)** : Mitomycin C- and streptomycin-induced male

- sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci.* **28**: 792–795.
- Jan, C.C., Vick, B.A., Miller, J.F., Kahler, A.L. and Butler, E.T. (1998)** : Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor.Appl. Genet.* **96**: 15-22.
- Jeuken, M., Van Wijk, R., Peleman, J. and Lindhout, P. (2001)** : An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* x *L. saligna* F₂ populations. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 638-647.
- Jones, M.M. and Rawson, H.M. (1979)** : Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. *Physiologia Plantarum.* **45**, 103–111.
- Jones, M.M. and Turner, N.C. (1980)** : Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. *Australian Journal of Plant Physiology.* **7**, 181–192.
- Jongdee, B., Fukai, S. and Cooper, M. (2002)** : Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crop Res.* **76**: 153-163.
- Kameli, A. and Lösel, D.M. (1995)** : Carbohydrates and water status in wheat plants under water stress. *New Phytol.* **125** : 609-614.
- Kameli, A. and Lösel, D.M. (1995)** : Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water stress. *J.Plant Physiol.* **Vol .147**. Pp. 363-366.
- Kearsey, M.J. (1998)**. The principals of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany*, **49** : 1619-1623.
- Kearsey, M.J. and Hyne, V. (1994)** : QTL analysis: a simple “marker-regression” approach. *Theor.Appl.Genet.* **89**: 698-702.
- Knapp, S.J., Bridges, W.C. and Birkes, D. (1990)** : Mapping QTL using molecular marker linkage maps. *Theor. Appl. Genet.* **79** : 583-592.
- Lai, Z., Livingstone, K., Zou, Y., Church, S.A., Knapp, S.J., Andrews, J. and Rieseberg, L.H. (2005)** : Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theor.Appl.Genet.* **1118** : 1532–1544.

- Lanceras, J.C., Pantuwan, G., Boonrat, J. and Toojinda, T. (2004)** : Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiol.* **135** : 384-399.
- Lander, E.S. and Botstein, D. (1989)** : Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics.* **121** : 185-199.
- Langar, K., Lorieux, M., Desmarais, E., Griveau, Y., Gentzbittel, L. and Bervillé, A. (2003)** : Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred line. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1068–1074.
- Langridge, P., Lagudah, E.S., Holton, T.A., Appels, R., Sharp, P.J. and Chalmers, K.J. (2001)** : Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* **52** : 1043–1077.
- Lawlor, D.W. (1993)** : Photosynthesis: Molecular, physiological and environmental processes. *Second Edition, Longman Scientific and Technical.* 238-249.
- Lawlor, D.W. (1995)** : Photosynthesis, productivity and environment. *J. of Exp. Bot., Vol. 46*: 1499-1461.
- Le Port, L. and Turner, N.C. (1995)** : Influence of water deficits on the rate of net photosynthesis of six species of grain legumes. *INRA, Inter drought.* II-8.
- Leclercq, P. (1969)** : Une stérilité male cytoplasmic chez le tournesol. *Annales de l'amélioration des plantes.* **19** : 99-106.
- Leclercq, P. (1970)** : Sunflower hybrids using male sterility. *In: Proc. IV International Sunflower.*
- Lefebvre, V., Poormohammad Kiani, S. and Durant-Tardif, M. (2009)** : A focus on natural variation for abiotic constraints response in a model species *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of molecular sciences.* **10** : 3547-3582.
- Leon, A.J., Andrade, F.H., Lee, M. (2000)** : Genetic mapping of factors affecting quantitative variation for flowering in sunflower. *Crop Science .* **40**: 404-407.
- Leon, A.J., Lee, M., Andrade, F.H. (2001)** : Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor.Appl.Genet.* **102** : 497-503.

- Lewicki, S.D. (1993)** : Evaluation des 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 (France). 87pp.
- Liu, J. and Zhu, J.K. (1998)** : A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*. **280** : 1943–1945.
- Ludlow, M.M. and Muchow, R.C. (1990)** : A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Adv. Agron.* **43** : 107-153.
- Machacek, C. (1979)** : Study of the inheritance of earliness in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genet and Sel*, **15** : 225-232
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D. and Colowit, P.M. (1996)** : Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*. **39** : 969-977.
- Mahjoub-Boujnah, D. et Lemeur, R. (1995)** : Variations ultra structurales des chloroplastes en relation avec l'activité photosynthétique et l'efficacité quantique chez l'olivier (*Oléa europaea* L.) soumis à différents modes de stress hydrique. **35**. *The Science Week, Basic sciences, Book (2)*, 41-52.
- Manly, K.F. and Olson, J.M. (1999)** : Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mam. Genome*. **10** : 327-334.
- Markel, P.D., Fulker, D.W., Benett, B., Corley, R.P. and De Fries, J.C. (1996)** : Quantitative trait loci for ethanol sensitivity in the LS×SS recombinant inbred strain: interval mapping. *Behav. Genet.* **26**: 447-458.
- Marsan, P.A., Gorni, C., Chiotto, A., Redaelli, R., Van, Vijk R., Stam, P. and Motto, M. (2001)** : Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map different testers and cofactor analysis. *Theor. Appl. Genet.* **102** (2-3): 230-243.
- Matthews, M.A. and Boyer, J.S. (1984)** : Acclimation of photosynthesis to low leaf water potentials. *Plant Physiol.* **74** : 161–166.

- Maury, P. (1997)** : Adaptation à la sécheresse et photosynthèse chez le tournesol. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, pp.137.
- Maury, P., Berger, M., Mojayad, F. and Planchon, C. (1995)** : Contrasting processes to induce osmotic adjustment in response to drought acclimation in sunflower genotypes. In Proceedings of the First International Congress on Integrated Studies on Drought Tolerance of Higher Plants, Montpellier, France, August 31 September 2, 1995. ENSAM/INRA, N° VII 14.
- Maury, P., Berger, M., Mojayad, F. and Planchon, C. (1996)** : Photochemical response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiologia Plantarum*. **98**, 57–66.
- Maury, P., Berger, M., Mojayad, F. and Planchon, C. (2000)** : Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant Soil*. **223**: 153-160.
- Mc Daniel, C.N., Singer, S.R. and Smith, S.M.E. (1992)** : Developmental states associated with the floral transition. *Developmental*.
- Merah, O., Arraus, J.L., Nachit, M.M. and Monneveux, P. (1995)** : Leaf osmotic potential, relative water content and leaf excised water loss as screening criteria for drought tolerance in Durum wheat. *INRA, Inter drought*, X-17.
- Merrien, A. (1992)** : Les points techniques du CETIOM: physiologie du tournesol. Ed. CETIOM, 66p.
- Merrien, A. and Grandin, L. (1990)** : Comportement hydrique du tournesol: Synthèse des essais 'irrigation' 1983-88. In *Le tournesol et l'eau* (eds. R. Blanchet & A. Merrien), pp. 75–90. Cetiom Pub., Paris.
- Merrien, A., Blanchet, R. and Gelfi, N. (1981 a)** : Relationships between water supply, leaf area development and survival, and production in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie*. **1**: 917–922.
- Merrien, A., Blanchet, R. and Gelfi, N. (1981 b)** : Importance de la résistance à la sénescence et de la survie du feuillage dans l'élaboration du rendement chez le tournesol en eau limitante. *Informations techniques Cetiom*, n°77, **4**, p 35–43.

- Mestries, E., Gentzbittel, L., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P., and Vear, F. (1998)** : Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol. Breed.* **4**: 215–226.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Schon, C.C. and Melchinger, A.E. (2005)** : QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* midstalk-rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel × CM625. *Theor. Appl. Genet.* **110**: 1490–1498.
- Mojayad, F. (1993)** : Adaptation à la sécheresse, photosynthèse et photoinhibition chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.). PhD Thesis. Institut National Polytechnique, Toulouse, France, 97p.
- Mokrani, L., Gentzbittel, L., Azanza, F., Fitamant, L., Al-Chaarani, G., and Sarrafi, A. (2002)** : Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **106**: 149-156.
- Monneveux, P. et This, D. (1997)** : La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse : espoirs et difficultés. *Sécheresse*, **8** : 29-37.
- Morgan, J. M. (1984)** : Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **35** : 299-319.
- Morizet, J. and Merrien, A. (1990)** : Principaux traits du comportement hydrique du tournesol. In *Le tournesol et l'eau* (eds. R. Blanchet & A. Merrien), pp.7–21. Cetiom Pub., Paris.
- Moulet, O., Fossati, D., Masher, F., Schori, A. et Guadagnuolo, R. (2008)** : Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales. *Revue Suisse Agric.* **40 (3)** : 133-138.
- Munns, R. and Weir, R. (1981)** : Contribution of sugars to osmotic adjustment in elongating and expanded zones of wheat leaves during moderate water deficits at two light levels. *Aus. J. Plant. Physiol.* **8** : 93–105.
- Nabipour, A., Yazdi-Samadi, B., Sarrafi, A. (2004)** : Genetic control of some morphological mutants in sunflower. *J. Genet. Breed.* **58** : 157-162.

- Nachit, M.M., Monneveux, P., Arraus, J.L. and Sorrells, M.E. (2000)** : Relationship of dryland productivity and drought tolerance with some molecular markers for possible MAS in Durum (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Option méditerranéenne*, N°40, 203-213.
- Nouri, L. et Ykhlef, N. (2002)** : Ajustement osmotique et maintien de l'activité photosynthétique chez le blé dur (*Triticum durum*, Desf.), en conditions de déficit hydrique. Thèse de Magister (Université Mentouri)-Constantine. 115 Pp.
- Ober, E.S., Le-Bloa, M., Clark, C.J.A., Royal, A., Jaggard, K.W. and Pidgeon, J.D. (2005)** : Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crops Res.* **91**: 231–249.
- Pankovic, D., Sakac, Z., Kevresan, S., Plesnicar, M. (1999)** : Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: Photosynthesis, electron transport and carbon metabolism. *J. Exp. Bot.* **330**: 127–138.
- Pardossi, A., Malorgio, F., Oriolo, D., Gucci, R., Serra, G. and Tognoni, F. (1998)** : Water relations and osmotic adjustment in *Apium graveolens* during long-term NaCl stress and subsequent relief. *Physiologia Plantarum.* **102** : 369-376.
- Paterson, A.H., Damon, S., Hewitt, J.D., Zamir, D., Rabinowitch, H.D., Lincoln, S.E., Lander E.S. and Tanksley S.D. (1991)** : Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations and environments. *Genetics.* **127** : 181-197.
- Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G. and Motto, M. (1998)** : Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* **97** : 1248–1255.
- Piquemal, M., Cavalié, G., Poeydomenge, O. and Botella-Brandibas, A. (1990)** : Activité métabolique et translocation chez le tournesol soumis à un stress hydrique. In *Le tournesol et l'eau* (eds. R. Blanchet & A. Merrien), pp. 32–44. Cetiom Pub., Paris.

- Poormohammad Kiani, S. (2007)** : Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol (*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. 214 pp.
- Poormohammad Kiani, S., Grieu, P., Maury, P., Hewezi, T., Gentzbittel, L. and Sarrafi, A. (2007 a)** : Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **114** : 193-207.
- Poormohammad Kiani, S., Maury, P., Talia, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., Paniago, N. and Sarrafi, A. (2007 b)** : Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sci.* **172** : 773-787.
- Poormohammad Kiani S., Maury P., Nouri L., Ykhlef N., Grieu P. et Sarrafi A. (2009)** : QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding.* **128**, 363-373.
- Price, A. H., Steele, K. A., Moore, B. J., Barraclough, P. B. and Clark, L.J. (2000)** : A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza Sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. *Theor. Appl. Genet.* **100** : 49-56.
- Pustovoit, V.S. (1964)** : Conclusions of working on the selection and seed production of sunflower (in Russian). *Agrobiology.* **5** : 662–697.
- Quartacci M.F., Pinzino C., Sgherri C.L.M. and Navari-Izzo F. (1995)**. Lipid composition and protein dynamics in thylakoïds of two wheat cultivars differently sensitive to drought. *Plant Physiol.* **108** : 191-197.
- Rafalski, J.A. (2002 a)** : Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches [Review]. *Plant Sci.* **162** : 329–333.
- Rafalski, J.A. (2002 b)** : Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [Review]. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5** : 94–100.
- Rekika, D., Monneveux, P. and Havaux, M. (1997)** : The in vivo tolerance of photosynthetic membranes to high and low temperatures in cultivated and wild wheat's of the *Triticum and Aegilops* Genera. *J. Plant Physiol.* pp. 1-5.

- Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A. and Tardieu, F. (2003) :** Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyse the genetic variability of the responses of leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiol.* **131**: 664-675.
- Ribaut, J.M. and Ragot, M. (2007) :** Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *J. Exp. Bot.* **58** : 351-360.
- Richards, R.A. (2000) :** Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* **51**: 447-458.
- Robelin, M. (1967) :** Action et arrière-action de la sécheresse sur la croissance et la production du tournesol. *Annual Agronomy.* **18** : 579–599.
- Robin, S., Pathan, M.S., Courtois, B., Lafitte, R., Carandang, S., Lancerase, S., Amante, M., Nguyen, H.T. and Li, Z. (2003) :** Mapping osmotic adjustment in an advanced back-cross inbred population of rice. *Theor. Appl. Genet.* **107** : 1288–1296.
- Roche, J., Bouniols, A., Mouloungui, Z., Barranco, T., and Cerny, M. (2006).** Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108** : 287–297.
- Rollier, M. (1972) :** Les besoins en éléments nutritifs du tournesol. Proceeding 5th International sunflower conference, Clermont Ferrand, France, p73-76.
- Roustae, A., Costes, D., Dechamp-Guillaume, G. and Barrault, G. (2000 a) :** Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (*Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology.* **49**: 227-234.
- Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S. and Gupta, P.K. (2006) :** Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr. Sci.* **90** : 683-689.
- Sadras, V.O., Villalobos, F.J., Fereres, E. and Wolfe, D.W. (1993) :** Leaf responses to soil water deficits: Comparative sensitivity of leaf expansion rate and leaf

- conductance in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and soil*. **153** : 189–194.
- Santakumari S. and Berkowitz G.A. (1990)**. Correlation between the maintenance of photosynthesis and in situ protoplast volume at low water potentials in droughted wheat. *Plant Physiol*. **92** : 733-739.
- Santoni, S., Faivre-Rampant, P., Prado, E. and Prat, D. (2000)** : Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cah. Agric.* **9** : 3311–3327.
- Sarrafi, A. and Gentzbittel, L. (2004)** : Genomics as efficient tools : example of sunflower breeding. In Lörz H. and Wenzel G. (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. **Vol. 55** : pp 107-116 Springer.
- Sarrafi, A., Kayyal, H., Al-Chaarani, G., Cantin, F., Chaline, A.S. and Durielle, A.S. (2000)** : Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J.Genet. Breed.* **54** : 227-231.
- SAS Institute Inc (2002)** Sas guide for personal computers, 9th edn, 2002, SAS Institute, Cary.
- Schilling, E.E. and Heiser, C.B. (1981)** : Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae) Taxon, **30** : 393-403.
- Schneiter, A.A. and Miller, J.F. (1981)** : Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* **21**: 901-903.
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Bradstreet, E.D. and Hemmingsen, E.A. (1965)** : Sap pressure in vascular plants. *Science*. **148**, 339–346.
- Sherwin, H.W., Berjak, P., Ferrant, J. M. and Pammenter, N.W. (1995)** : The importance of critical cell volume and cell wall elasticity in the ability to withstand desiccation. *INRA, Inter drought*, VI-C.
- Sinha, S.K., Reddy, P.V., Patil, P.C. and Khanna-Chopra, R. (1995)** : Drought induced senescence in cowpea : Effect of pod development. *INRA, Inter drought*, VI-17.
- Skoric D. (1985)** : Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe helianthi/phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. *Helia*. **8** : 21-24.

- Soldatov, K.I. (1976)** : Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In: Proceeding of the 7th International Sunflower Conference. **Vol. 1**. Krasnodar, pp. 352-357.
- Soltner, D. (1995)** : Les grandes productions végétales. Collection Sciences et Techniques Agricoles.
- Sorrells, M.E., Diab, A. and Nachit, M. (2000)** : Comparative genetics of drought tolerance. *Option méditerranéenne*, N°40, 191-201.
- Specht, J.E., Chase, K., Macrander, M., Graef, G.L., Chung, J., Markwell, J.P., Germann, M., Orf, J.H. and Lark, K.G. (2001)** : Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Sci.* **41**: 493-509.
- Stoenescu, F. (1974)** : Genetics. In. Vranceanu, A.V. (ed) Floarea-soarelui. Editura Academiei Republicii Socialiste, Romania, Bucuresti. Pp.92-125.
- Strauss, S.H., Lande, R. and Namkoong, G. (1992)** : Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Can.J.For.Res.* **22**: 1050-1061.
- Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K. and Knapp, S.J. (2002)** : Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor.Appl.Genet.* **105** : 1124–1136.
- Tardieu and Zivy 2006**, ESCo ‘sécheresse et agriculture’ .
- Terbea, C.O., Cosmin, O., Micut, G.H. and Pectu, E. (1995)** : Cell membrane stability, excised leaf water loss and free proline content as physiological traits for screening for drought resistance in Maize . *INRA, Inter drought*, VI-18.
- Teulat, B., Borries, C. and This, D. (2001)** : New QTLs identified for plant water status, water soluble carbohydrates and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth- chamber under two water regimes. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 161-170.
- Tuberosa, R., Salvi, S., Sanguineti, M.C., Landi, P., Maccaferri, M. and Conti, S. (2002)** : Mapping morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann.Bot.* **89** : 941–963.
- Turner, N.C. (1981)** : Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil.* **58** : 339–366.
- Turner, N.C. and Jones, M.M. (1980)** : Turgor maintenance by osmotic adjustment; a review and evaluation In: Turner N and Kramer PJ (ed) Adaptation of Plants to

Water and High Temperature Stress. Wiley, New-York, USA, pp 87-107.

Turner, N.C., Walter R.S. and Evans P. (1987) : Water relations and osmotic adjustment of leaves and roots of Lupins in response to water deficits. *Published in Crop Sci.*, **27** : 977-983.

Tuttobene, R., Anastaki, U., Sortino, O. and Cammarata, M. (2000) : Influence de la température et de la photopériode sur la phénologie et les caractéristiques du rendement du tournesol. 15th International Sunflower Conference, 12-15 June 2000.

Upadyayula, N., Da Silva, H.S., Bohn, M.O. and Rocheford, T.R. (2006) : Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence and architecture. *Theor. Appl. Genet.* **112**: 592-606.

Vear, F. (1992) : Le tournesol. In : Gallais A, Bannerot H (eds.) Amélioration des espèces végétales cultivées. INRA, Paris, pp.146-160.

Vear, F. and Tourveille de Labrouhe, D. (1988). Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections. *Agronomie*, **8** : 503-508.

Vear, F., Bony, H., Joubert, G., Tourveille de Labrouhe, D., Pauchet, I., and Pinochet X. (2003). 30 years of sunflower breeding in France. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **10** : 66-73.

Vijayan, K., Srivatsava, P.P., Nair, C.V., Awasthi, A.K., Tikader, A., Sreenivasa, B. and Urs, S.R. (2006) : Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breeding.* **125** : 298-301.

Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P. and Newbury, H.J. (1996) : Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* . **76** : 296-304.

Wang, S., Basten, C.J., and Zeng, Z.B. (2005) : Windows QTL Cartographer V2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, N.C.. Available from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>..

Wang, Y.H., Thomas, C.E. and Dean, R.A. (1997) : A genetic map of melon (*Cucumis*

melo L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor.Appl.Genet.* **95** : 791-798.

Wise, R.R., Ortiz-Lopez, A. and Ort, D.R. (1992) : Spatial distribution of photosynthesis during drought in field-grown and acclimated and nonacclimated growth chamber-grown cotton. *Plant Physiology.* **100** : 26–32.

Yu, J.K., Tang, S., Slabaugh, M.B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W.C., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K.J., Berry, S., Leon, A., Olungu, C., Maes, N. and Knapp, S.J. (2003) : Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop. Sci.* **43** : 367–387.

Zeng, Z.B. (1993): Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** : 10972–10976.

Zeng, Z.B. (1994) : Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics.* **136**: 1457–1468.

Zhang, J., Babu, R.C., Pantuwan, G., Kamoshita, A., Blum, A., Wade, L.J., Sarkarung, S., O'Toole, J.C. and Nguyen, H.T. (1999) : Molecular dissection of drought tolerance in rice: from physio-morphological traits to field performance In: Proceeding of the Paper Presented at an International Workshop in Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-Limited Environment, CIMMYT, EI Batan, Mexico, pp 21–25.

Zhang, L.S., Le Clerc, V., Li S., Zhang, D. (2005) : Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. *Can. J. Bot.* **83** : 66–72.

Zou, G.H., Mei, H.W., Liu, G.L., Liu, S.P., Hu, X.Q., Yu, M.S., Li, J.H., Wu, L.J. and Luo, H.L. (2005) : Grain yield responses to moisture regimes in a rice population: association among traits and genetic markers. *Theor.Appl.Genet.* **112** : 106-113.