

Detection and assay of siderophores in cowpea rhizobia (*Bradyrhizobium*) using radioactive Fe (^{59}Fe)

P. T. C. NAMBIAR & S. SIVARAMAKRISHNAN *International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics, Patancheru, A.P. 502 324, India*

Received 20 November 1986 and accepted 24 November 1986

NAMBIAR, P. T. C. & SIVARAMAKRISHNAN, S. 1987. Detection and assay of siderophores in cowpea rhizobia (*Bradyrhizobium*) using radioactive Fe (^{59}Fe). *Letters in Applied Microbiology* 4, 37-40.

In this paper we describe a method for the detection and assay of siderophore (catechol type) using radioactive ^{59}Fe . Using this method we have found that cowpea rhizobia (*Bradyrhizobium*) differ in their ability to produce this type of siderophore.

Although iron is abundant in soils (1-6%), it is often unavailable to plants because its solubility is dependent on pH, and under natural aerobic soil conditions most of the iron exists in the insoluble ferric form, which is not available to plants. Iron availability to plant roots may be modified by organic chelators (Powell *et al.* 1980; Neilands 1981). When grown under conditions of iron deprivation micro-organisms secrete ferric-specific ligands called siderophores (Neilands 1981). Most of the siderophores can be classified into two types: the catechol-like compounds found only in bacteria, and the hydroxamate-like compounds found in fungi, yeasts and bacteria (Neilands 1981; Miller *et al.* 1985). Powell *et al.* (1980) demonstrated that hydroxamate siderophores are widely distributed in a variety of soils in sufficient concentrations to contribute to the iron nutrition of higher plants. Currently used methods for the detection of siderophores include (1) chemical methods (Neilands 1981) and (2) bioassays (Powell *et al.* 1980). It is impossible to quantify the iron-binding capacity of the ligands using the former. Siderophore-bound iron uptake is strain-specific, and utilization of siderophores from different sources may vary depending on the test strains (Smith & Neilands 1984). Hence bioassays may not be very effective for comparative purposes. In this paper we describe a method for detecting and quantifying the iron-

binding capacity of catechol type siderophores using ^{59}Fe , and demonstrate that cowpea rhizobia (*Bradyrhizobium*, Jordan 1984) differ in their ability to produce these siderophores.

Materials and Methods

CHEMICALS

^{59}Fe as ferric chloride (specific activity, 920 mCi/g) was obtained from the Bhaba Atomic Research Center (Bombay, India). Instagel was purchased from Packard Instrument Co. (USA). Other chemicals used were of analytical grade.

STRAINS AND CULTURE CONDITIONS

The origin and details of the test strains of *Bradyrhizobium* have been described previously (Nambiar *et al.* 1984). The strains were grown in 11 media as described by Modi *et al.* (1985). The cultures were harvested during the late logarithmic phase of growth and centrifuged at 6000 g for 15 min. Cell pellets were dried at 80°C for 48 h and their dry weights recorded.

ASSAY PROCEDURE

The pH of the culture supernatant fluid was adjusted to 3.0 with 0.1 N HCl, and 500 ml

than dormancy which would prevent sprouting in the event of any stress occurring at that time. In this paper, we report a simple laboratory technique to identify sources of seed dormancy in *fastigiata*. We also describe the effect of drying (a simulated drought stress) on expression of dormancy from genotypes typically dormant or non-dormant, and the nature of dormancy in selected *fastigiata* genotypes derived from the crosses between the genotypes belonging to the two subspecies.

METHODS AND MATERIALS

The effect of post-harvest drying on dormancy.

Experiment 1.

Twelve randomly selected *fastigiata* genotypes were grown in the field, and pods were collected at normal maturity. The pods were either immediately shelled or dried in the shade for 7 days before shelling and sound mature kernels (SMK) tested for germination.

Three replicate samples of 10 seeds were placed in petridishes lined with filter paper, and water was added to a depth of 2 mm. In similar petridishes aqueous ethrel solution 0.05 p. 100 (v/v) was added to break the dormancy and allow a check on seed viability. Germination tests were conducted at 27 °C (± 3) and regular counts were made for 18-21 days after hydration, by which time fungal growth usually started and the trial was abandoned. The data on dormancy percentages provided in this paper are based on the final germination/dormancy of material after the full test period.

Experiment 2.

Four lines were selected in preliminary screening of intersubspecific crosses (Experiment 3) and the check cultivars M 13 (dormant ssp. *hypogaea*) and TMV 2 (non-dormant ssp. *fastigiata*) were used to observe the effects of maturity of the crop, and curing after harvest, on the expression of dormancy. Since in the first screening of individual plants most or all of the seed was used; other sequential plants from the same bulk populations were used. These were sown on 19 June 1981 in 4.0 m \times 7.5 m plots at a spacing of 75 \times 10 cm, in the field. The plots were irrigated as necessary to supplement the rains.

Plants were harvested at 97, 104, 115, 120, and 127 days after sowing (DAS). Only mature pods were selected at each harvest and these were divided into two sets, which were tested as in Experiment 1.

Screening of progeny bulks for dormant *fastigiata* lines.

Experiment 3.

During the 1980/1981 postrainy season, plants from 178 breeding populations with sequential branching were identified and screened for dormancy, while from the postrainy crop of 1981/1982, 334 sequentially branched plants from similar breeding populations were screened.

Pods from these sequentially branched plants in bulk populations were dried in the shade for 7-10 days after harvest to a moisture content of about 10 p. 100 and then tested for dormancy using the method described in Experiment 1. After the first screening it was found that not all

the sequentially branched plants from a given bulk population were dormant. This procedure was therefore modified to test the seed from individual plant selections after retaining half the seed from each plant. Seed from those plants (from each population) with dormancy were initially retested for dormancy as a single plant selection grown in pots. Seed from plants which had similar levels of dormancy were later bulked to form a single line.

Duration of dormancy.

Experiment 4.

In 1983 a sequence of tests were conducted to observe the effect of postharvest on the seed dormancy. Pods from each harvest were stored and germination tests were conducted on these at 17, 24, 30, and 59 days after harvest to examine the duration of stored seed dormancy.

Field sprouting observations.

Due to the very limited availability of seed, these observations were not replicated within a year but have been repeated over years. In 1981, sprouting in the field after maturity was observed in up to 2 m area from the genotypes used in Experiment 2. In 1982 and 1983, as a result of further screening, the number of genotypes observed was increased.

In 1982, drought occurred between 114 DAS and 126 DAS when it was released by irrigation and the numbers of sprouts were observed at 130 DAS.

In 1983, observations on the field sprouting were made at 122 DAS. Due to regular rains, no variations in the water supply occurred in this season.

RESULTS AND DISCUSSION

In all experiments the germination percentage of seeds treated with ethrel exceeded 95 p. 100 within 7 days. This result established that the seed material was viable; hence low germination was due to dormancy.

Experiment 1.

In all genotypes there was appreciable dormancy in the freshly harvested seed (Table I), but after curing for 7 days two to three times as many seeds germinated. This finding clearly demonstrated that fresh seed dormancy exists within the *fastigiata* subspecies, but this dormancy is either of very limited duration or dependent on maintaining a hydrated state. The cultivar TMV 2, which is recognised as being prone to sprouting, also demonstrated this fresh seed dormancy that is of little value to the farmer.

Experiment 2.

The differences in the fresh and cured seed germination of *fastigiata* lines selected in the screening are given in Table II. Cured seeds had higher levels of germination than fresh ones. Most seeds of TMV 2 from 97 DAS germinated after curing, but not all the fresh seeds germinated. The difference between germination of cured and fresh seed harvested 1 week later shows that the differences were not due to the greater age of the cured seed. Neither fresh nor cured seeds of M 13 germinated, indicating that the drying treatment had no influence on the dormancy of this representative of the *hypogaea* types.

TABLE I. — Germination percentage(a) of mature seed (fresh and cured) from 12 genotypes belonging to subspecies *fastigiata*. (Pourcentage de germination — a — de graines mûres — fraîches et séchées — provenant de 12 génotypes appartenant à la sous-espèce *fastigiata*)

Identity (Identité)	Habit (Port)	Fresh (Fraîches)	Cured (Séchées)
ICG 1928	Spanish Bunch	42 (45)	80 (95)
ICG 9192	—	29 (25)	76 (90)
ICG 1993	—	36 (35)	76 (90)
ICG 1994	—	27 (22)	90 (100)
ICG 1998	—	43 (47)	57 (70)
ICG 3088	—	46 (52)	71 (85)
ICG 3093	—	33 (30)	57 (70)
ICG 3119	—	31 (27)	66 (80)
ICG 3126	—	31 (27)	63 (77)
ICG 3127	—	31 (27)	57 (70)
ICG 3214	Valencia	40 (42)	65 (82)
ICG 5994	—	43 (47)	74 (90)

SE for comparing - treatments (ES pour comparaison des traitements) ± 1.51
 - genotypes (des génotypes) ± 3.70

(a) Data presented after angular transformation; original means are given in parentheses (Données présentées après transformation angulaire; les moyennes originales sont entre parenthèses).

TABLE II. — Germination percentages (a) of fresh (Fr) and cured (Cu) seed from selected lines and checks at different stages of crop maturity (Rainy season 1981) (Pourcentage de germination — a — des graines fraîches — Fr — et séchées — Cu — provenant de lignées sélectionnées et des témoins à différents stades de la maturation des cultures. Saison des pluies 1981)

Identity (Identité)	Days after sowing (Jours après semis)									
	97(b)		104		115		120		127	
	Fr	Cu	Fr	Cu	Fr	Cu	Fr	Cu	Fr	Cu
ICGS 172	20 (12)	54 (66)	20 (12)	35 (33)	23 (16)	51 (62)	26 (20)	60 (76)	14 (6)	50 (60)
ICGS 173	28 (23)	55 (68)	50 (60)	76 (93)	40 (42)	68 (86)	26 (20)	39 (40)	40 (42)	64 (82)
ICGS 174	4 (1)	52 (62)	17 (9)	42 (45)	38 (38)	68 (86)	18 (10)	63 (80)	29 (24)	42 (46)
ICGS 175	0 (0)	34 (32)	9 (3)	35 (34)	21 (14)	54 (66)	20 (12)	73 (92)	24 (17)	65 (82)
M 13 (Check) (c)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TMV 2 (Check)	20 (12)	90 (100)	30 (26)	70 (89)	38 (38)	74 (92)	23 (16)	71 (90)	30 (26)	83 (98)

SE mean for comparing - treatments (moyenne ES pour comparaison des traitements) ± 0.59 ± 0.92 ± 0.85 ± 0.69 ± 0.97
 - genotypes (des génotypes) ± 0.94 ± 1.46 ± 1.35 ± 1.09 ± 1.54

(a) Data presented after angular transformation, original means are given in parentheses (Données présentées après transformation angulaire; les moyennes originales sont entre parenthèses).

(b) Normal maturity in TMV 2 (Maturité normale chez TMV2).

(c) Not included for SE computation (Non utilisé pour le calcul de ES).

Except for the ICGS 173 population, the dormancy detected until 115 DAS was between the levels of TMV 2 and M 13, after which proportion of dormant seeds decreased. The dormancy in the test entries existed for a shorter period of time than in M 13, and a variable proportion of the seeds was dormant.

The importance of the drying treatment, as a component of the method to select agronomically useful dormancy rather than fresh seed dormancy, was confirmed by the different dormancy percentages achieved in both the selected lines and in TMV 2.

Experiment 3.

During the 1980/1981 postrainy season, four populations (ICGS 83 to ICGS 86) with dormancy were identified, while 10 lines (ICGS 87 to ICGS 185) with appreciable dormancy levels were selected from the 1981/1982 postrainy crop. Parentage of the 14 selections made in both the seasons is provided in Table III.

TABLE III. — Parentage of the selections (Ascendance des sélections)

Identity (Identité)	Pedigree
ICGS 172	Dh 3-20(a) × Robut 33-1
ICGS 173	Kadiri 71-1 × Gangapuri(a)
ICGS 174	Shulamith × Chico(a)
ICGS 175	TMV 10 × Chico(a)
ICGS 176	TMV 10 × Chico(a)
ICGS 177	TMV 10 × Chico(a)
ICGS 178	SM 5(a) × NC Ac 17500
ICGS 179	Makulu Red × Robut 33-1(b)
ICGS 180	MH-2(a) × 28-206
ICGS 181	Robut 33-1(b) × NC Ac 2821
ICGS 182	Ah-2105 × Chico(a)
ICGS 183	Ah-2105 × Chico(a)
ICGS 184	2-5(a) × Robut 33-1
ICGS 185	NC Ac 1107 × X 14-4-B-19-B(a)

(a) = Non-dormant early parent (Parent hâtif non dormant).
 (b) = Weakly-dormant early parent (Parent hâtif à dormance faible).

The number of plants tested from each population and the percentage of plants with more than 90 p. 100 of dormancy in their seeds is shown in Table IV. The dormancy percentage of the seed from their progenies is shown in Table V. By single plant selection it was possible to obtain constant levels of dormancy within *fastigiata* lines derived from crosses involving dormant and non-dormant parents within a single cycle of selection. After germination test the remaining seed from those plants that had more than 90 p. 100 dormancy was bulked for each genotype. Subsequent generations after this screening maintained the high level of dormancy in laboratory tests.

Experiment 4.

The results from this experiment showed that most of the lines identified by the dormancy screening process had a level of dormancy effective for 4 weeks after maturity of the crop except for ICGS 84 (Table VI). However, if the dehydrated period was longer the dormancy started to break down. It is also clear from Table VI that in some lines the dormancy broke down rapidly when the storage/dehydration period exceeded 30 days after harvest.

TABLE IV. — Percentage of plants with more than 90 p. 100 seed dormancy 30 days after harvest
(Pourcentage de plantes présentant une dormance des graines supérieure à 90 p. 100, 30 jours après la récolte)

Identity (Identité)	No. of single plants tested (Nbre de plantes individuelles testées)	Percent plants with > 90 p. 100 dormancy of seeds (P. 100 des plantes présentant une dormance des graines > 90 p. 100)
ICGS 173	40	13
ICGS 174	30	14
ICGS 175	30	57
ICGS 176	26	12
ICGS 177	15	100
ICGS 178	25	88
ICGS 179	40	60
ICGS 180	25	52
ICGS 181	40	72
ICGS 182	30	97
ICGS 183	35	94
ICGS 184	40	77
ICGS 185	20	50
TMV 2 (check-témoin)	30	0

TABLE V. — Changes in dormancy percentage (a) of selected lines from sequential harvests
(Evolution du pourcentage de dormance — a — des lignées sélectionnées selon les récoltes successives)

Identity (Identité)	Days after sowing (Jours après semis)				
	94	101	108	115	122
ICGS 172	90(100)	79(95)	90(100)	63(80)	53(65)
ICGS 173	42(45)	29(25)	45(50)	29(25)	26(20)
ICGS 174	90(100)	90(100)	75(90)	68(80)	90(100)
ICGS 175	79(95)	71(90)	63(80)	82(95)	75(90)
ICGS 176	79(95)	90(100)	82(95)	56(70)	60(75)
ICGS 177	82(95)	90(100)	90(100)	36(35)	56(70)
ICGS 178	90(100)	63(80)	77(95)	42(45)	42(45)
ICGS 179	77(95)	90(100)	75(90)	75(90)	67(85)
ICGS 180	90(100)	77(95)	75(90)	22(15)	22(15)
ICGS 181	90(100)	90(100)	90(100)	77(95)	63(80)
ICGS 182	90(100)	78(90)	75(90)	56(70)	68(85)
ICGS 183	79(95)	90(100)	77(95)	75(90)	72(90)
ICGS 184	90(100)	90(100)	90(100)	67(85)	79(95)
ICGS 185	79(95)	67(85)	60(75)	45(50)	53(65)
TMV 2 (Check)	35(35)	36(35)	26(20)	12(5)	21(15)

SE mean for comparing genotypes $\pm 3.71 \pm 3.50 \pm 4.51 \pm 4.39 \pm 3.97$
(Moyenne ES pour comparaison des génotypes)

(a) Data presented after angular transformation ; original means are given in parentheses (Données présentées après transformation angulaire ; les moyennes originales sont entre parenthèses).

Germination of most lines was high after 2 months of storage but seed dormancy was still considerable in ICGS 175 and ICGS 95. This variable duration of dormancy is consistent with that of the dormancy expressed in the *hypogaea* group [Gibbons, personal communication], and it seems that dormancy levels appropriate for the requirements of different farming conditions can be identified.

TABLE VI. — Final germination percentage(a) of selected lines at different times during post harvest storage
(Pourcentage de germination final — a — des lignées sélectionnées après différentes durées de stockage post-récolte)

Identity (Identité)	Days of storage (Jours de stockage)			
	17	24	30	59
ICGS 172	0(0)	39(40)	47(55)	77(95)
ICGS 173	47(55)	90(100)	79(95)	90(100)
ICGS 174	0(0)	26(20)	45(50)	67(85)
ICGS 175	12(5)	36(35)	50(60)	60(75)
ICGS 176	10(5)	42(45)	50(60)	67(85)
ICGS 177	12(5)	36(35)	67(80)	90(100)
ICGS 178	0(0)	39(40)	64(80)	68(85)
ICGS 179	7(5)	26(20)	29(25)	71(85)
ICGS 180	0(0)	22(15)	22(15)	64(80)
ICGS 181	0(0)	39(40)	47(55)	64(80)
ICGS 182	0(0)	50(60)	68(85)	90(100)
ICGS 183	12(5)	26(20)	48(55)	90(100)
ICGS 184	0(0)	18(10)	36(35)	47(55)
ICGS 185	12(5)	38(40)	67(85)	77(95)
TMV 2 (Check)	54(65)	68(85)	90(100)	90(100)

SE mean for comparing genotypes $\pm 4.21(b) \pm 2.93 \pm 3.90 \pm 4.04$
(moyenne ES pour comparaison des génotypes)

(a) Data presented after angular transformation, original means are given in parentheses (Données présentées après transformation angulaire ; moyennes originales entre parenthèses).

(b) SE based on only non-zero values (ES basé sur valeurs non nulles seulement).

TABLE VII. — Field sprouts/m² of selected populations during the rainy seasons of 1981, 1982 and 1983
(Data from single observation)

(Pousses/m² au champ des populations sélectionnées pendant la saison des pluies en 1981, 82 et 83 — données provenant d'une seule observation)

Identity (Identité)	Days after sowing (Jours après semis)		
	127(a)	130	122
ICGS 172	4	2	0
ICGS 173	3	10	23
ICGS 174	6	2	11
ICGS 175	4	0	3
ICGS 176	—	5	0
ICGS 177	—	0	10
ICGS 178	—	0	5
ICGS 179	—	0	1
ICGS 180	—	1	8
ICGS 181	—	1	0
ICGS 182	—	0	0
ICGS 183	—	1	0
ICGS 184	—	2	0
ICGS 185	—	1	0
TMV 2 (check)	8	15	16

(a) Before single plant selection (Avant sélection de plantes individuelles).

Field sprouting observations.

The numbers of sprouts in the field trial varied with genotype (Table VII). In 1981 rainy season, sprouting in

three of the lines previously identified for dormancy by the laboratory test was less than that of TMV 2.

In 1982 rainy season, at 130 DAS sprouting was considerable in TMV 2 and smaller amounts of sprouting had occurred in many populations, most having occurred in ICGS 173.

Observations of field sprouting in 1983 were in agreement with the germination percentage of cured seed obtained in laboratory tests. However, some crosses involving the non-dormant parents Gangapuri (ICGS 173), Chico (ICGS 174 and ICGS 177), and MH-2 (ICGS 180) exhibited a considerable number of field sprouts. Except for ICGS 173 (selected in preliminary studies, but found to be always only partially dormant in our subsequent trials), all other selections had less and later field sprouting than the check (TMV 2).

CONCLUSIONS

From these experiments it is apparent that the sequential branching habit of subspecies *fastigiata* and the dormancy of subspecies *hypogaea* can be selected for, using simple laboratory techniques. In crosses from the two sources the frequency with which these characters were identified together was very low (2 p. 100 of sequentially branched segregants). However, the seed dormancy character may be easier to select for, now that sequentially branched dormant types have been identified and the confusing factor of fresh seed dormancy can be eliminated. Genetic studies of the inheritance of this dormancy within the *fastigiata* background and of duration of dormancy within the selected types are necessary.

RÉFÉRENCES

- [1] BAILEY W. K. and BEAR J. E. (1973a). — Seed dormancy of different botanical types of peanuts. *Arachis hypogaea* L. *J. Am. Peanut Res. Educ. Assoc.*, 5, p. 40-47.
- [2] BAILEY W. K. and BEAR J. E. (1973b). — Search for a practical procedure for breaking dormancy of peanut seeds. *Arachis hypogaea* L. *J. Am. Peanut Res. Educ. Assoc.*, 5, p. 20-26.
- [3] BOCKELÉE-MORVAN A. (1983). — Les différentes variétés d'arachide. Répartition géographique et climatique, disponibilité. Fiches techniques des variétés vulgarisées (trilingue fr., angl., esp.). *Oléagineux*, 38, N° 2 (N° special « Les semences d'arachide »), p. 73-116.
- [4] GAUTREAU J. (1984). — Evaluation des taux effectifs de non-dormance au champ d'arachides sénégalaises. *Oléagineux*, 39, N° 2, p. 83-88.
- [5] JOHN C. M., SESHADRI C. R. and RAO M. B. S. (1948). — Dormancy of the seed in the groundnut. *Madras Agric. J.*, 35, p. 159-167.
- [6] KRAPOVICKAS A. (1969). — The origin, variability and spread of the groundnut (*Arachis hypogaea* L.) (Eng. Trans.). In: *The domestication and exploitation of plants and animals*. Gerald Duchworth Co., Ltd., London.
- [7] KETRING D. L. (1977a). — Effect of plant growth regulators on production of 'Starr' Spanish type peanuts. *Agron. J.*, 69, p. 110-114.
- [8] KETRING D. L. (1977b). — Physiology of oil seeds. VI — A means to break dormancy of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Sci.*, 4, p. 42-45.
- [9] KETRING D. L. and MORGAN P. W. (1971). — Physiology of oil

- seeds. II. — Dormancy release in Virginia type peanut seeds by plant growth regulators. *Plant Physiol.*, 47, p. 488-492.
- [10] NAGARJUN P. and RADDER G. D. (1983). — Studies on induction of seed dormancy in bunch type groundnut. *Seed Res.*, 11, p. 24-31.
- [11] RAMACHANDRAN M., LOGANATHAN N. S., SRIDHARAN G. S., CHANDRASEKHARAN N. R. and KRISHNASWAMY P. (1967). — Evolution of dormant bunch groundnut strains by hybridisation. *Indian J. Agric. Sci.*, 37, p. 429-436.
- [12] REDDY P. S., ZAIDE V. R. and DESHMUKH S. N. (1985). — CGS 1-19: A new Spanish bunch groundnut cultivar with fresh seed dormancy. *J. Oilseeds Res.*, 2, p. 103-106.
- [13] SANDERS T. H., SCHUBERT A. M. and PATTEE H. E. (1982). — Maturity methodology and post harvest physiology. In: *Peanut Science and Technology*. American Peanut Research and Education Society, Inc., p. 624-654.
- [14] TOOLE V. K., BAILEY W. K. and TOOLE E. H. (1964). — Factors influencing dormancy of peanut seeds. *Plant Physiol.*, 39, p. 822-832.
- [15] VAITHIALINGAM R. and SAKHARAM RAO J. (1973). — Physiological comparison of dormant and non-dormant varieties of groundnut. *Madras Agric. J.*, 60, p. 1859-1861.
- [16] VARISAI MUHAMMAD S. and STEPHEN DORAIRAJ M. (1968). — Screening the genetic stock of *Arachis hypogaea* L. for seed dormancy in Madras state. *Indian J. Agric. Sci.*, 38, p. 73-75.
- [17] VARISAI MUHAMMAD S., RAMACHANDRAN N. and RAMACHANDRAN T. (1969). — High yielding groundnut bunch cultures with seed dormancy. *Madras Agric. J.*, 56, p. 234-238.

RÉSUMÉ

Une méthode améliorée d'identification des descendance des dormantes à ramifications séquentielles provenant de populations dérivées de croisements entre des espèces d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) non dormantes (sous-espèce *fastigiata*) et dormantes (sous-espèce *hypogaea*).

K. D. R. WADIA, R. C. NAGESWARA RAO et J. H. WILLIAMS, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 2, p. 75-82.

L'identification des descendance dormantes provenant de populations dérivées de croisements entre des espèces d'arachide non dormantes *fastigiata* et dormantes *hypogaea* est importante dans tout développement de génotypes à maturation précoce destinés à être adoptés par les planteurs des régions où la pluviométrie en fin de saison est variable. On peut distinguer deux types de dormance : 1) dans le cas des *fastigiata*, la dormance de la graine fraîche dépend des conditions existantes après maturation de la graine, et 2) la dormance de graines représentatives de la sous-espèce *hypogaea* n'est pas affectée par les conditions existantes après maturation. Ces deux types de dormance peuvent être séparés en séchant les graines pendant 7-10 jours, effectuant ensuite une comparaison de leur germination dans l'eau et dans une solution d'éthrel. L'application de cette méthode a permis d'isoler des génotypes dormants à partir de 500 populations en sélection. Leur dormance au champ aussi bien qu'en stockage post-récolte était de 3 à 4 semaines selon le génotype.

RESUMEN

Un método mejorado para identificar las descenderencias con vida latente de ramificaciones secuenciales procedentes de poblaciones derivadas de cruzamientos entre especies de maní (*Arachis hypogaea* L.) sin vida latente (subespecie *fastigiata*) y con vida latente (subespecie *hypogaea*).

K. D. R. WADIA, R. C. NAGESWARA RAO y J. H. WILLIAMS, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 2, p. 75-82.

En cualquier desarrollo de genotipos de maduración precoz que se destina a los cultivadores de las regiones con pluviometría variable al terminarse la estación de lluvias, es importante identificar las descenderencias con vida latente procedente de poblaciones derivadas de cruzamientos entre especies de maní sin vida latente *fastigiata* y con vida latente *hypogaea*. Se puede diferenciar dos tipos de vida latente, o sea : 1) en el caso de los *fastigiata*, la vida latente de la semilla fresca depende de condiciones existentes después de la maduración de la semilla, y 2) la vida latente de semillas representativas de la subespecie *hypogaea* no sufre las consecuencias de las condiciones que se dan después de la maduración. Estos dos tipos de vida latente pueden separarse secándose las semillas durante 7 a 10 días, y comparando luego su germinación en agua y en una solución de éthrel. La aplicación de este método permitió aislar genotipos con vida latente a partir de 500 poblaciones que están siendo seleccionadas ; la vida latente de éstos en el campo o en el almacenamiento después de la cosecha era de 3 a 4 semanas según el genotipo.

Une méthode améliorée d'identification des descendances dormantes à ramifications séquentielles provenant de populations dérivées de croisements entre des espèces d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) non dormantes (sous-espèce *fastigiata*) et dormantes (sous-espèce *hypogaea*) (1)

K. D. R. WADIA, R. C. NAGESWARA RAO et J. H. WILLIAMS (2)

INTRODUCTION

Les deux sous-espèces de l'arachide cultivée (*Arachis hypogaea* L.) sont différentes de par la longueur de leur cycle et la dormance de leurs graines après maturation. Les variétés de la sous-espèce *fastigiata* sont généralement caractérisées par un cycle de vie court et des graines « non dormantes », tandis que celles de la sous-espèce *hypogaea* atteignent la maturité normalement plus tard et donnent des graines qui restent dormantes pendant une période importante après maturation [Krapovickas, 1968].

L'explication physiologique de la dormance chez l'arachide a été étudiée par de nombreux auteurs [Toole *et al.*, 1964 ; Vaithalingam et Sakharan Rao, 1973] et révisée par Sanders *et al.* [1982]. Il est possible de rompre la dormance par un traitement chimique à l'éthrel ou à l'éthaphon [Ketring et Morgan, 1971 ; Bailey et Bear, 1973b ; Ketring 1977b].

L'existence, ou non, de la dormance chez la sous-espèce *fastigiata* semble provoquer une certaine polémique. Bailey et Bear [1973a] ont signalé la dormance chez les génotypes de *fastigiata* jusqu'à 30 jours après la récolte, tandis que Maeda [1978-1979, données non publiées] a testé 220 lignées à l'ICRISAT sans trouver aucune dormance appréciable.

Par contre, dans le cas de lignées *fastigiata*, il a été observé que les graines à l'intérieur de gousses attachées à la plante ne germent que progressivement si la plante-mère reste saine et si elle est bien alimentée en eau, tandis que les contraintes, telles que les maladies, les ravageurs, ou la sécheresse suivie de la pluie, peuvent augmenter le taux de germination de graines mûres de façon considérable. On ne sait comment agissent ces facteurs contraignants mais il est possible qu'ils jouent un rôle dans l'expression variable de la dormance au sein du groupe *fastigiata*.

La base physiologique des différences entre les types *fastigiata* et *hypogaea*, en ce qui concerne la dormance, a été établie et on a essayé d'induire la dormance des graines chez les arachides de type Spanish en effectuant des pulvérisations foliaires à l'hydrizide malique [Ketring, 1977a ; Nagarjun et Radder, 1983]. Par contre, très peu de recherches ont été faites pour introduire la dormance contrôlée génétiquement chez la sous-espèce hâtive *fastigiata*, à part le travail effectué par l'IRHO au Sénégal [Gautreau, 1984]. Des tentatives d'hybridation entre sous-espèces ont été entreprises par Ramachandran *et al.* [1967], afin d'obtenir des *fastigiata* de type dormant et quelques génotypes présentant des caractéristiques de la sous-espèce *fastigiata* ainsi qu'une dormance

des graines fraîches ont été identifiées [Varisai Mohammad *et al.*, 1969 ; Bockelée-Morvan, 1983 ; Reddy *et al.*, 1985], principalement à partir d'observations de la levée de gousses mûres au champ.

Il est reconnu que la dormance chez les variétés d'arachide hâtives est un caractère souhaitable [John *et al.*, 1948 ; Ramachandran *et al.*, 1967 ; Varisai Mohammad et Dorairaj, 1968 ; Gautreau, 1984]. Cette combinaison de caractères protégerait les variétés hâtives contre les dégâts susceptibles de se produire entre le moment de maturation et la récolte. De plus, elle inciterait les planteurs à adopter les variétés hâtives qui échapperaient aux sécheresses de fin de cycle, sans risque de germer si les pluies continuent après la maturation de la culture. En pratique, de telles tentatives ont été effectuées de façon systématique au Sénégal [Gautreau, 1984] en caractérisant des variétés d'arachide selon leur niveau de dormance et d'autres caractères.

Cependant, une dormance qui dépend de conditions sans contraintes serait moins intéressante pour l'amélioration des cultures qu'une dormance qui empêcherait la germination en présence de contraintes. Nous faisons état ici d'une technique de laboratoire simple pour identifier les sources de la dormance des graines chez la sous-espèce *fastigiata*. Nous décrivons aussi l'effet du séchage (stress hydrique simulé) sur l'expression de la dormance chez des génotypes normalement dormants ou non dormants, ainsi que la nature de cette dormance dans le cas de génotypes *fastigiata* sélectionnés, dérivés de croisements entre les génotypes appartenant aux deux sous-espèces.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Effet du séchage après la récolte sur la dormance.

Essai 1.

Douze génotypes de la sous-espèce *fastigiata*, pris au hasard, ont été cultivés au champ et leurs gousses récoltées à maturité normale. Les gousses ont été décortiquées, soit immédiatement, soit après séchage à l'ombre pendant 7 jours ; les graines mûres et saines ont subi des essais de germination.

Trois échantillons de 10 graines chacun ont été mis dans des boîtes de Pétri sur du papier filtre ; on a ajouté de l'eau jusqu'à un niveau de 2 mm. Dans des boîtes de Pétri identiques, on a ajouté une solution aqueuse d'éthrel à 0,05 p. 100 (v/v) pour rompre la dormance et permettre un contrôle de la viabilité des graines. Les essais de germination ont été réalisés à 27 °C (± 3), des comptages étant effectués régulièrement jusqu'à 18-21 jours après hydratation, moment où l'on observait normalement le début d'une contamination fongique menant à l'abandon de l'essai. Les données concernant la dormance, exprimées ici en forme de pourcentage, sont basées sur la germination/dormance finale du matériel au bout de la période d'essai complète.

(1) Soumis, comme article de Journal N° 616, ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) (*).

(2) Associé de Recherches, Physiologiste des plantes et Physiologiste des Plantes Principal auprès du Programme Légumineuses, ICRISAT (*).

(* ICRISAT, Patancheru P.O., Andhra Pradesh, 502324 (Inde).

Essai 2.

Quatre lignées ont été sélectionnées au cours d'un premier criblage de croisements entre sous-espèces (Essai 3) et les variétés témoins M 13 (sous-espèce dormante *hypogaea*) et TMV 2 (sous-espèce non dormante *fastigiata*) ont été utilisées pour observer les effets de la maturité de la culture et du séchage après la récolte sur l'expression de la dormance. Etant donné que toutes les graines ont été utilisées au cours du premier criblage de plantes individuelles, d'autres plantes à ramifications séquentielles, obtenues à partir des mêmes populations en vrac, ont été utilisées. Ces graines ont été semées au champ le 19 juin 1981, dans des parcelles de 4,0 m x 7,5 m à un écartement de 75 x 10 cm. Les parcelles ont reçu l'irrigation nécessaire pour compléter les pluies.

Les plantes ont été récoltées 97, 104, 115, 120 et 127 jours après le semis (JAS). Seules les gousses mûres ont été sélectionnées au moment de chaque récolte, celles-ci étant réparties en deux groupes qui ont été testés comme pour l'essai 1.

Criblage de descendances en vrac pour obtenir des lignées de *fastigiata* dormantes.

Essai 3.

Au cours de la saison suivant les pluies en 1980/1981, des plantes à ramifications séquentielles obtenues à partir de 178 populations en sélection ont été identifiées et testées pour leur dormance, tandis que dans le cas de la récolte de la saison suivant les pluies en 1981/1982, 334 plantes à ramifications séquentielles, obtenues à partir de populations en sélection similaires, ont été testées.

Des gousses provenant de ces plantes à ramifications séquentielles dans des populations en vrac ont été séchées à l'ombre pendant 7 à 10 jours après la récolte, jusqu'à l'obtention d'une teneur en eau de 10 p. 100, puis testées pour leur dormance suivant la méthode décrite dans l'essai 1. Après le premier criblage, on a constaté que les plantes à ramifications séquentielles obtenues à partir d'une population en vrac donnée n'étaient pas toutes dormantes. Cette méthode a donc été modifiée en vue de tester les graines provenant de sélections de plantes individuelles, utilisant la moitié des graines de chaque plante. Les graines provenant des plantes dormantes (de chaque population) ont été retestées initialement pour la dormance, cultivées en pots comme une sélection de plantes simples. Les graines provenant de plantes présentant un taux de dormance similaire ont été mises en vrac ultérieurement pour donner une seule lignée.

Durée de la dormance.

Essai 4.

En 1983, une série d'essais a été réalisée pour observer l'effet des conditions existant après la récolte sur la dormance des graines. Des gousses provenant de chaque récolte ont été stockées et elles ont subi des essais de germination 17, 24, 30 et 59 jours après la récolte afin de déterminer la durée de la dormance des graines stockées.

Observations de la repousse au champ.

Etant donné la disponibilité réduite en graines, ces observations n'ont pas eu de répétitions dans la même année mais ont été répétées sur plusieurs années. En 1981, la repousse au champ après maturation a été observée jusqu'à une distance de 2 m des géotypes utilisés dans l'essai 2. En 1982 et 1983, suite à un criblage complémentaire, le nombre de géotypes observés a été augmenté.

En 1982, une sécheresse a eu lieu entre 114 et 126 jours après le semis, jours où la sécheresse a cessé par irrigation. Le nombre de repousses a été observé 130 jours après le semis.

En 1983, les observations de la levée au champ ont eu lieu 122 jours après le semis. Grâce à une pluviométrie régulière, aucune irrégularité de l'alimentation en eau n'a été relevée pendant cette saison.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans tous les essais, le taux de germination des graines traitées à l'éthrel a dépassé 95 p. 100 en 7 jours. Ce résultat a confirmé la viabilité des semences ; le faible taux de germination était donc dû à la dormance.

Essai 1.

Pour l'ensemble des géotypes, la dormance des graines fraîchement récoltées (Tabl. I) était considérable, mais après séchage pendant 7 jours, le nombre de graines germées a doublé ou triplé.

Ce résultat a bien montré que la dormance des graines fraîches existe chez la sous-espèce *fastigiata*, mais que cette dormance est soit d'une durée très limitée, soit dépendante du maintien d'un état d'hydratation. La variété TMV 2, dont la tendance à la germination est reconnue, a présenté elle aussi, cette dormance des graines fraîches, qui représente peut d'intérêt pour le cultivateur.

Essai 2.

Les différences entre le taux de germination des graines fraîches et celui des graines séchées, provenant des lignées *fastigiata* sélectionnées à partir du criblage, sont présentées dans le tableau II. Le taux de germination des graines séchées était supérieur à celui des graines fraîches. La plupart des graines de TMV 2 récoltées 97 jours après le semis ont germé après séchage, tandis que les graines fraîches n'ont pas toutes germé. La différence entre le taux de germination des graines séchées et celui des graines fraîches récoltées une semaine plus tard montre que les différences n'étaient pas dues à l'âge plus avancé des graines séchées. Dans le cas de M 13, ni les graines fraîches ni les graines séchées n'ont germé, ce qui indique que le séchage n'a eu aucun effet sur la dormance de ces graines représentatives des arachides de type *hypogaea*.

A l'exception de la population ICGS 173, la dormance détectée jusqu'à 115 jours après le semis se situait entre le taux de TMV 2 et celui de M 13, période après laquelle la proportion de graines dormantes diminuait. La dormance des graines testées durait moins longtemps que celle de M 13 et la proportion de graines dormantes était variable.

L'importance du séchage, en tant que composant de la méthode de sélection d'une dormance d'intérêt agronomique, plutôt que la dormance des graines fraîches, a été confirmée par les pourcentages de dormance différents obtenus, et pour les lignées sélectionnées et pour TMV 2.

Essai 3.

Au cours de la saison suivant les pluies en 1980/1981, quatre populations à dormance (de ICGS 83 à ICGS 86) ont été identifiées, tandis que 10 lignées (de ICGS 87 à ICGS 185) ayant un taux de dormance appréciable ont été sélectionnées à partir des cultures de la saison suivant les pluies en 1981/1982. L'ascendance des 14 sélections provenant de ces deux saisons est donnée dans le tableau III.

Le nombre de plantes de chaque population qui ont été testées et le pourcentage des plantes présentant un taux de dormance des graines supérieur à 90 p. 100 sont reportés au tableau IV. Le taux de dormance des graines obtenues à partir de leurs descendances est donné dans le tableau V. La sélection de plantes individuelles a permis d'obtenir des niveaux de dormance constants au sein des lignées *fastigiata* dérivées de croisements comprenant des parents dormants et non dormants à l'intérieur d'un même cycle de sélection. Après le test de germination, le restant des graines des plantes présentant un taux de dormance supérieur à 90 p. 100 ont été mises en vrac pour chaque géotype. Suite à ce criblage, les générations ultérieures ont gardé ce niveau de dormance élevé dans les tests en laboratoire.

Essai 4.

Les résultats de cet essai ont montré que la plupart des lignées identifiées par le criblage pour la dormance présentaient un taux de dormance effectif pendant 4 semaines après la maturation de la culture, à l'exception d'ICGS 84 (Tabl. VI). Par contre, si la période de déshydratation durait plus longtemps, la dormance commençait à être rompue. Le tableau VI montre clairement aussi que la dormance de certaines lignées était rompue assez rapidement si la période de stockage/déshydratation dépassait 30 jours après la récolte. Le taux de germination de la plupart des lignées était plus élevé après 2 mois de stockage, mais la dormance des graines est restée considérable chez ICGS 175 et ICGS 95. Cette durée variable de la dormance correspond à celle de la dormance exprimée chez le groupe *hypogaea* [Gibbons, *communication personnelle*], et il semble que l'identification de taux de dormance répondant aux exigences de certaines conditions de culture soit possible.

Observations de la repousse au champ.

Le nombre des repousses observé dans l'essai au champ variait selon le géotype (Tabl. VII). Pendant la saison des pluies en 1981, le taux de repousses observé pour trois des lignées, dont la dormance a été identifiée au cours du test en laboratoire, était inférieur à celui de TMV 2.

Pendant la saison des pluies en 1982, la repousse 130 jours après le semis était considérable chez TMV 2 et une repousse moins importante a été observée dans beaucoup de populations, la plus élevée étant celle de d'ICGS 173.

En 1983, les observations de la repousse au champ étaient en accord avec les pourcentages de germination relevés au cours des tests en laboratoire pour les graines séchées. Par contre, certains croisements comprenant les parents non dormants Gangapuri (ICGS 173), Chico (ICGS 174 et ICGS 177) et MH-2 (ICGS 180) ont donné un nombre de repousses considérable au champ. A l'exception d'ICGS 173 (sélectionnée au cours des premières études mais ne s'avérant que partiellement dormante dans des essais ultérieurs), toutes les sélections présentaient une repousse au champ moins importante et plus tardive que celle du témoin (TMV 2).

CONCLUSION

A partir de ces essais, il est évident que la ramification séquentielle de la sous-espèce *fastigiata* et la dormance de la sous-espèce *hypogaea* peuvent être obtenues par la sélection en mettant en œuvre des techniques de laboratoire simples. Dans les croisements provenant de ces deux sources, la fréquence de l'identification de ces deux caractères ensemble était très limitée (2 p. 100 des descendance à ramification séquentielle). Cependant, la sélection pour la dormance des graines peut être plus facile, grâce à l'identification de types d'arachides à ramification séquentielle dormants et à la possibilité d'éliminer le facteur de confusion constitué par la dormance des graines fraîches. Des études génétiques de l'hérédité de cette dormance dans le type *fastigiata* et de la durée de la dormance au sein du matériel sélectionné sont nécessaires.

Bibliographie

L'HUILERIE MODERNE

« Art et techniques »

par Jean LAISNEY

Editeur : Compagnie Française pour le développement des Fibres Textiles (CFDT)

1985, 320 p., Prix : 300 F (+ frais de port)

« Les ouvrages techniques sur les industries des corps gras, et en particulier sur l'huilerie et la trituration, accessibles au lecteur français ou francophone, sont rares et anciens », écrit dans son introduction M. Aldo Uzzan, rédacteur en chef de la Revue française des corps gras. Aussi convient-il de saluer comme il se doit l'initiative de M. Jean Laisney, un spécialiste de l'huilerie, métier auquel il a consacré toute sa vie professionnelle.

Son ouvrage est consacré à la technique de l'huilerie en commençant à la réception des graines et en allant jusqu'à la finition de l'huile et des tourteaux, le raffinage étant exclu ; il faut souligner que cet ouvrage, en français, comporte de nombreux détails techniques ainsi que des figures, des schémas qui illustrent bien les différents chapitres. Ce livre est divisé en trois grandes parties : la réception et le stockage des graines, le traitement des graines, et le contrôle de l'huilerie.

Le travail de l'huilerie commence à la réception des produits à traiter avec une saisie rigoureuse des stocks de

graines. Des problèmes peuvent se poser au niveau du contrôle des poids à la réception, de l'échantillonnage de ces graines, de l'analyse de ces échantillons. La seconde partie est consacrée au traitement des graines oléagineuses consistant, d'une part, à extraire l'huile qu'elles contiennent et, d'autre part, à produire un tourteau destiné à l'alimentation animale. Le dernier chapitre s'intéresse au contrôle de l'huilerie qui va s'exercer à divers niveaux : au niveau des dépenses pour produire l'huile et le tourteau, au niveau des quantités mises en œuvre, en stock ou produites, au niveau des qualités de la production.

Cet ouvrage complète le livre de J. Denise sur le raffinage paru fin 1983 ; traitant de la partie production de l'huile brute et du tourteau, il devrait rendre de très nombreux services.

Pour toute commande, s'adresser à : CFDT, Service de Documentation, 13, rue de Monceau, 75008 Paris (France) (Tél. : 43.59.53.95).