

N° d'ordre:

THESE
Présentée
En vue de l'obtention du
Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse
Spécialité: Génétique et Amélioration des Plantes

Ecole doctorale : **S.E.V.A.B**

par

Seifollah POORMOHAMMAD KIANI

Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol
(*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse

Soutenu le 10 Mai 2007 devant le jury composé de:

Prof. Y. Henry	CNRS, Paris	Rapporteur
Prof. G. Charmet	INRA, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Prof. L. Gentsbittel	INP/ENSAT, Toulouse	Examineur
Prof. T. Lamaze	UPS, Toulouse	Examineur
Prof. C. Planchon	INP/ENSAT, Toulouse	Invité
Dr. P. Maury	INP/ENSAT, Toulouse	Invité
Prof. P. Grieu	INP/ENSAT, Toulouse	Directeur de thèse
Prof. A. Sarrafi	INP/ENSAT, Toulouse	Directeur de thèse

Ecole National Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT)

Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse accordée par le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche en Iran. J'exprime ici mes remerciements pour le financement de mes études en France ainsi qu' au service de l'Education de l'Ambassade d' Iran en France.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes responsables de thèse, Monsieur le Professeur Sarrafi et Monsieur le Professeur Grieu, pour la confiance qu'il m'ont témoigné en me proposant ce sujet, pour leur précieux conseils et grande disponibilité. Ces quelques années ont été pour moi très enrichissantes, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance, de ma profonde admiration et de ma respectueuse considération.

Je remercie Monsieur le Professeur Gentzbittel, Directeur du laboratoire BAP, pour ses conseils, principalement pour la partie concernant la réalisation de la carte génétique et de l'étude de l'expression des gènes.

Je tiens également à remercier chaleureusement Monsieur Maury, pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du BAP (les chercheurs et les techniciens) ainsi que tous mes amis doctorants qui ont rendu mon quotidien plus agréable au cours de ces quelques années.

J'exprime mes remerciements aux membres du jury, particulièrement à Mr. Henry (Directeur de Recherche à Université Paris-Sud) et à Mr. Charmet (Directeur de Recherche à l'INRA de Clermont-Ferrand) qui m'ont fait l'honneur de juger ma thèse en qualité de rapporteurs.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mes amis, particulièrement Darvishzadeh, pour ses aides au cours de ma thèse et Davarzani pour ses aides informatiques.

Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol (*Helianthus annuus* L.) soumis à la sécheresse

Résumé:

Afin de progresser dans la compréhension des caractères clés impliqués dans les processus de tolérance à la sécheresse chez le tournesol, nous avons réalisé plusieurs expérimentations, en conditions contrôlées et au champ sur des populations de tournesol exprimant diverses sources de variabilité génétique : des lignées recombinantes (RILs) et des mutants. La variabilité génétique pour la tolérance à la sécheresse, à travers l'étude des relations hydriques et de caractères agronomiques, a été étudiée.

Dans un premier temps, nous avons construit une carte génétique intégrée et à haute densité en utilisant une population de LIRs issue du croisement entre deux génotypes PAC2×RHA266. Les QTLs contrôlant les caractères associés à l'état hydrique des plantes (teneur en eau relative, potentiel hydrique et ses composantes) et à l'ajustement osmotique (AO) dans des conditions 'irriguées' et de 'contraintes hydriques' ont été identifiés. Parmi 24 QTLs détectés dans des conditions 'irriguées', cinq (environ 21%), ont été également détectés dans la condition 'contrainte hydrique'. Ces QTLs sont considérés comme stables comparativement à ceux spécifiques aux différentes conditions hydriques. Un QTL majeur pour l'AO sur le groupe de liaison 5 est co-localisé avec les QTLs contrôlant plusieurs caractères de l'état hydrique des plantes. Ce QTL pourrait être utilisé pour la sélection assistée par marqueurs.

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 (phénologie, surface foliaire à la floraison, hauteur des plantes, sénescence, rendement et...). En utilisant notre carte génétique, les QTLs liés à ces caractères ont été identifiés et leurs co-localisations avec les QTLs contrôlant l'état hydrique des plantes et l'ajustement osmotique ont été analysées. Nous pouvons noter que certains QTLs associés à la tolérance au déficit hydrique sont situés dans les mêmes positions que ceux associés au rendement. Par exemple, le QTL majeur identifié pour l'AO est également détecté pour le rendement par plante, la surface foliaire et le poids du capitule. Ceci indique une base génétique commune pour la tolérance à la sécheresse et les caractères associés au rendement.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes impliqués, d'une part dans la tolérance à la contrainte hydrique, et d'autre part dans les processus limitant les dommages oxydatifs, pour quatre génotypes ayant un comportement contrasté en situation de contrainte hydrique. L'expression des gènes étudiés a été mise en relation avec les caractères physiologiques mesurés concernant l'état hydrique, la photosynthèse et la photochimie étant impliquées dans les processus d'assimilation du carbone pour la croissance. Parmi les principaux résultats, on note une différence notable de l'expression des gènes impliqués dans l'état hydrique des différents génotypes, plus particulièrement de l'aquaporine. L'expression du gène de l'aquaporine est corrélée au caractère hydrique RWC. Pour les processus photochimiques, ce sont principalement les niveaux d'expression des gènes codant pour la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxidase qui différencient les génotypes soumis à la sécheresse.

Les marqueurs moléculaires associés à l'ajustement osmotiques et à différents caractères agronomiques ont été identifiés chez une population de mutants M6.

Mots clés : déficit hydrique, QTL, photosynthèse, état hydrique, ajustement osmotique, expression de gènes, tournesol.

Genetic analysis of physiological responses to drought in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Abstract

Recombinant inbred lines (RILs) coming from the cross 'PAC2×RHA266' were used to develop an integrated and high density genetic-linkage map using SSR and AFLP markers. QTLs involved in the genetic control of water status traits (RWC, Ψ_w , Ψ_s , Ψ_t and Ψ_{sFT}) and osmotic adjustment (OA) under well-watered and water-stressed conditions were identified. Among 24 QTLs detected under well-watered conditions, 5 (about 21%) were also detected in the water-stressed treatment (stable QTLs) and the rests were specific. A major QTL for OA on linkage group 5 is overlapped with the QTLs for several water status traits.

In order to understand the response of yield and related agronomic traits to different water treatments and growth conditions, RILs and their parents were phenotyped at greenhouse and field condition with two water treatments. Using our saturated linkage map, the QTLs controlling agronomical traits were identified and their co-location with QTLs for plant water status and osmotic adjustment were investigated.

Genotypic variation for water status and gas exchange parameters under different water treatments were studied and the differential expression of four water-stress associated genes were investigated. The expression level of aquaporin genes in leaves of four RILs and their parents was down regulated by water stress and was associated with relative water content (RWC). Down-regulation was also associated with genomic regions having alleles with negative effects on plant water status. Net photosynthesis rate (Pn) and the fructose-1,6 bisphosphatase gene expression levels were associated mainly after rehydration.

The genomic regions involved in genetic variability for chlorophyll fluorescence parameters were mapped in RILs and the differential expression of various antioxidant genes were investigated by quantitative real-time RT-PCR in four selected RILs and their parental lines. Significant higher level of POD (66-fold) was observed. The putatively drought-tolerant genotype (C100) showed the highest transcript level for SOD, CAT, PSI P700 and PSII 32 Kda Protein resulting in the maintenance of photosynthesis under water stress. QTL mapping and graphical genotyping showed that the positive or negative alleles of some QTLs such as '*NPQD.11.1*' and '*1-qPD.2.1*' could be associated with the transcript abundance of SOD and CAT in the putatively drought-tolerant genotype (C100).

Molecular markers associated with osmotic adjustment-related traits as well as with different agronomical traits were identified in well-watered and water-stressed plants for a population of M6 mutant lines.

Key words: Water stress, QTL mapping, photosynthesis, plant water status, osmotic adjustment, gene expression, sunflower

Abréviation

1- qP : Proportion of closed PSII traps (proportion de PSII réduits)

1000GW : 1000 grains weight (poids de 1000 graines)

BIO: BIOmass per plant (biomass sèche par plante)

Ci : intercellular CO₂ concentration (concentration intercellulaire en CO₂)

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

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

gs : stomatal conductance (conductance stomatique)

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

GYTI : Grain Yield Tolerance Index (indice de la tolérance)

HW: Head Weight (masse du capitule)

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

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

LN : Leaf Number (le nombre de feuilles par plante)

NPQ : Non-Photochemical Quenching (quenching non-photochimique)

OA : osmotic adjustment (ajustement osmotique 'AO')

PH : Plant Height (hauteur de la plante)

Pn : net photosynthesis (photosynthèse nette)

PSII : photosystem II (photosystème II)

RWC : relative water content (teneur en eau relative)

Tr : transpiration (transpiration)

ΦP : potential photochemical efficiency of PSII (efficacité photochimique potentielle des PSII)

ΦPSII : actual efficiency of PSII electron transport (rendement quantique du transport des électrons)

Ψs : osmotic potential (potentiel osmotique)

Ψ_{sFT} : osmotic potential at full turgor (potentiel osmotique à pleine turgescence)

Ψt : turgor potential (potentiel de turgescence)

Ψw : leaf water potential (potentiel hydrique foliaire)

1.6.2.	Étude du polymorphisme de marqueurs moléculaires et relation avec la tolérance au stress	24
1.6.3.	Étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress.....	24

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 26

2.1. Matériel végétal27

2.1.1.	La population des lignées recombinantes (RILs)	27
2.1.2.	La population des mutants (M6)	27

2.2. Conditions de culture27

2.2.1.	Conditions de culture pour les LIRs	27
2.2.1.1.	Culture en conditions contrôlées (serre).....	27
2.2.1.2.	Culture en conditions naturelles (champ).....	28
2.2.2.	Conditions de culture pour les mutants	28
2.2.2.1.	Culture en conditions contrôlées (serre).....	28
2.2.2.2.	Culture en conditions naturelles (toit roulant).....	28
2.2.3.	Contrainte hydrique en serre pour LIRs	29
2.2.4.	Contrainte hydrique en champ pour LIRs	29
2.2.5.	Contrainte hydrique en serre pour les mutants	29
2.2.6.	Contrainte hydrique sous toit roulant pour les mutants.....	29

2.3. Stade de mesure et paramètres étudiés30

2.3.1.	Les caractères physiologiques	30
2.3.1.1.	Relation hydrique	30
2.3.1.2.	Photosynthèse et paramètres associés	30
2.3.1.3.	Paramètres de la fluorescence des chlorophylles	31
2.3.2.	Les caractères morphologiques et agronomiques.....	31

2.4. Marquage moléculaire31

2.4.1.	Extraction d'ADN	31
2.4.2.	Marquage par la technique AFLP.....	32
2.4.2.1.	Double digestion de l'ADN.....	32
2.4.2.2.	Ligation des adaptateurs	32
2.4.2.3.	Préamplification	32
2.4.2.4.	Amplification sélective.....	33
2.4.2.5.	Séparation sur gel d'acrylamide	33
2.4.3.	Marquage par la méthode SSR.....	33
2.4.4.	Analyse des profils moléculaires.....	34
2.4.5.	Etablissement des cartes génétiques.....	34

2.5. Détection des QTLs35

2.6. Identification de marqueurs individuels35

2.7. Analyse de l'expression de gènes.....35

2.7.1.	prélèvement et broyage des feuilles.....	36
2.7.2.	Extraction d'ARN totaux	36
2.7.3.	Traitement DNase.....	36

2.7.4.	Reverse transcription des ARNs messagers	37
2.7.5.	RT-PCR quantitative Real-Time	37

CHAPITRE III : AMELIORATION DE LA CARTE GENETIQUE ; ANALYSE GENETIQUE DE L'ETAT HYDRIQUE, DE L'AJUSTEMENT OSMOTIQUE ET DES CARACTERES AGRONOMIQUES CHEZ LES LIGNEES RECOMBINANTES SOUMISES A UN DEFICIT HYDRIQUE 38

3.1.	Introduction	39
3.2.	Synthèse des résultats et conclusion	85
3.2.1.	Variation phénotypique des génotypes	85
3.2.2.	Amélioration de la carte génétique.....	86
3.2.3.	QTLs associés aux caractères physiologiques et agronomiques identifiés en différentes conditions	86
3.2.4.	Comparaison des QTLs des caractères adaptatifs avec ceux des caractères agronomiques	89
3.2.5.	QTLs associés à l'indice de la tolérance et leur co-localisation avec ceux associés aux caractères adaptatifs.....	90

CHAPITRE IV : VARIABILITE GENETIQUE DES REPONSES PHYSIOLOGIQUES A LA SECHERESSE PAR ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES CHEZ LE TOURNESOL (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) 92

4.1.	Introduction	93
4.2.	Synthèse des résultats et conclusion	138
4.2.1.	Variation génétique pour des différents caractères physiologiques analysés	138
4.2.2.	Analyses de l'expression des gènes par « quantitative real-time RT-PCR » et des QTLs	139

CHAPITRE V : ANALYSE GENETIQUE DE LA RESISTANCE A LA SECHERESSE CHEZ LES MUTANTS DU TOURNESOL (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) 145

5.1.	Introduction	146
5.2.	Synthèse des résultats et conclusion	181
5.2.1.	Variabilité génétique des caractères physiologiques et agronomiques.....	181
5.2.2.	Identification de marqueurs individuels associés aux caractères étudiés	182

CHPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 184

6.1.	Développement de la carte génétique	185
6.2.	Variabilité génétique des caractères de tolérance à la sécheresse.....	185
6.3.	Analyse des QTLs de tolérance du tournesol à la sécheresse et co-localisation avec les caractères agronomiques.....	187

6.4. Co-localisations des QTL adaptatifs et des QTLs de caractères agronomiques	189
6.5. QTLs associés à l'indice de la tolérance et leur co-localisation avec ceux associés aux caractères adaptatifs	190
6.6. Variabilité génétique des réponses physiologiques à la sécheresse par analyse de l'expression des gènes.....	191
Perspectives.....	192
RÉFÉRENCES	196
ANNEXE	214

Introduction : contexte de l'étude et présentation des objectifs

1. Production et intérêt de la culture du tournesol

Avec une production mondiale oscillant autour de 30 M de tonnes, et un rendement moyen de 12.9 q/ha, le tournesol est l'une des grandes espèces oléagineuses de la planète. Les atouts internationaux de l'espèce sont sa richesse en huile (45% de la graine), sa résistance à la sécheresse et plus généralement son faible besoin en intrants. Ces caractéristiques correspondent parfaitement à la demande sociétale actuelle vis à vis de l'agriculture.

En 2006 les principaux pays producteurs ont été: la Russie/Ukraine (11.650 millions de tonnes), l'Argentine (3.900 millions de tonnes), l'Union Européenne (3.974 millions de tonnes) et l'Europe de l'Est (2.110 millions de tonnes) (<http://www.sunflowernsa.com>). A l'intérieur de l'Union Européenne, la France produit 1.45 millions de tonnes et se place au premier rang des producteurs européens devant la Hongrie qui produit elle environ 1.27 million de tonnes (<http://www.prolea.com>). La production mondiale en 2006 est de 30 millions de tonnes (<http://www.sunflowernsa.com>),

En France comme en Europe, on assiste à un recul du tournesol industriel au profit de l'alimentaire de l'ordre de 20%. Dans l'hexagone, 80% du tournesol se concentre sur 5 régions : Poitou-Charentes et Midi-Pyrénées représentent à elles seules 50% des surfaces cultivées suivies des régions Centre, Pays de Loire et Aquitaine.

En France cependant, la moindre incitation à produire des cultures oléagineuses résultant des réformes successives de la PAC et le caractère même de plante rustique a entraîné la localisation du tournesol sur de petites terres à moindre potentiel. Cette situation a pénalisé le niveau des rendements constatés, et la surface consacrée au tournesol est passée en 10 ans d'1 million à 600000 ha, pour l'essentiel en régions Midi Pyrénées et Poitou Charentes.

2. Nécessité d'augmenter la production : objectif finalisé

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. L'Union Européenne est un acteur important du marché international des oléagineux. Ses besoins en protéines et en huiles végétales sont extrêmement

élevés malgré une stabilisation de la demande en huile et une diminution de celle des tourteaux. Comme elle reste un producteur mondial modeste, elle doit importer de pays tiers (Russie et Ukraine principalement) l'essentiel de ses besoins en graines, tourteaux et huiles. Cependant, on assiste à une réduction des importations de tourteaux et les exportations restent stables.

Plante économe en intrants et adaptée aux situations de fortes chaleurs, aux débouchés nationaux et internationaux garantis, le tournesol doit impérativement améliorer ses performances agronomiques pour rester compétitif sur les exploitations agricoles françaises.

Depuis juin 2004, l'INRA, l'ENSAT, l'ESAP, le CETIOM, les sélectionneurs privés, l'ASEDIS-SO, SOFIPROTEOL et la région Midi-Pyrénées ont décidé d'unir leurs moyens autour d'un projet commun : Tournesol 2010. Il s'agit de renforcer les moyens de la recherche publique agronomique consacrés au tournesol, de façon à améliorer sa compétitivité globale dans les cinq à dix ans à venir. Différentes stratégies agronomiques et génétiques ont été envisagées dans ce projet « Tournesol 2010 » pour améliorer la productivité. Un programme a plus particulièrement été développé afin d'évaluer la productivité du tournesol dans des conditions de contraintes hydriques plus ou moins marquées.

3. Un des principaux facteurs limitant la production: la sécheresse estivale

Le tournesol est une culture dont on attend des performances environnementales au travers d'une valorisation des milieux difficiles, tout en affichant des objectifs de productivité et de qualité de la graine. Tout cela doit se faire dans un contexte de diversification des débouchés et des objectifs assignés à la culture. Toute amélioration de la productivité ne peut s'envisager sans le maintien de ces atouts. Le tournesol est maintenant cultivé le plus souvent dans des milieux où la ressource en eau est très variable et souvent déficitaire dès la floraison. 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.

Il ressort des diverses prospectives sur les changements climatiques une forte probabilité d'une augmentation de la température et une aggravation du déficit pluviométrique en particulier dans le Sud de l'Europe, où est produit actuellement l'essentiel du tournesol. Il pourrait en résulter des modifications de l'aire de production à l'échelle nationale et européenne.

Etant donné la concurrence croissante pour l'utilisation de l'eau, il est peu probable que le tournesol bénéficie massivement de l'irrigation à l'avenir. Ceci restera vrai même dans le cadre d'une révision des soutiens actuels aux cultures irriguées. Par ailleurs, le tournesol doit

conserver son image de culture économe en eau. Il convient donc de réfléchir aux voies d'amélioration de la productivité du tournesol dans le cadre de contraintes hydriques plus ou moins marquées.

4. Définition du sujet de thèse

L'amélioration de la productivité du tournesol repose sur deux approches complémentaires : l'optimisation de la conduite culturale d'une variété d'intérêt et la sélection de géotypes présentant des caractéristiques remarquables.

La mise au point d'un itinéraire technique passe par le choix d'une variété adaptée aux objectifs de la production (productivité, critère de qualité...) et aux contraintes du milieu (tolérance aux stress biotiques et abiotiques) (Meynard et al. 1997). La sélection du tournesol a fourni des variétés résistantes aux principaux pathogènes (mildiou, phomopsis) tout en progressant sur la productivité et de manière moins nette sur la teneur en huile (Vear et al. 2003). Par contre, les variétés n'ont pas été sélectionnées sur leur tolérance aux contraintes abiotiques. Ceci est lié en partie au mode d'évaluation des variétés qui privilégie des conditions peu contraignantes (sols profonds, irrigation d'appoint) mais aussi au fait que les essais où s'exercent de fortes contraintes sont souvent rejetés parce que les résultats obtenus sont trop variables.

Pendant la période estivale, les plantes sont soumises à une forte demande évaporatrice de l'atmosphère et à une faible disponibilité en eau du sol. Dans ces conditions, le bilan hydrique des plantes peut se dégrader, provoquant des situations de déficit. La croissance et la photosynthèse, principales fonctions physiologiques impliquées dans l'élaboration du rendement, sont alors affectées. Les programmes de recherche en matière de sécheresse chez le tournesol ont porté principalement sur l'étude des mécanismes de tolérance. Selon le géotype, les mécanismes adaptatifs impliqués peuvent entraîner une augmentation de la tolérance ou l'apparition d'une sensibilité plus élevée à la sécheresse (Maury et al. 1996). L'amélioration du rendement en conditions sèches implique de mieux cerner ces mécanismes adaptatifs afin de maîtriser davantage les interactions géotype × environnement dans les systèmes de cultures.

Ma thèse a donc porté sur une analyse génétique des réponses physiologiques (croissance, développement et état hydrique) de lignées de tournesol soumises à une contrainte abiotique majeure, la sécheresse.

Le mémoire de thèse sera présenté sous forme de 5 chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique relative au tournesol, aux mécanismes d'adaptations à la sécheresse, à l'expression de gènes, au marquage moléculaire et à la recherche de QTL.
- Le deuxième présente les matériels et les méthodes utilisés.
- Le troisième chapitre concerne (1) l'amélioration de la carte génétique par les marqueurs SSR et l'analyse génétique de l'état hydrique et de l'ajustement osmotique chez les lignées recombinantes soumises à un déficit hydrique en conditions contrôlées (serre) et (2) l'analyse génétique de caractères morphologiques et agronomiques chez les lignées recombinantes soumises à un déficit hydrique dans différents environnements : conditions contrôlées (serre) et naturelle (champ)
- Le quatrième chapitre porte sur l'étude de la variabilité génétique des réponses physiologiques à la sécheresse chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.) par analyse de l'expression différentielle des gènes associés à la sécheresse
- Le cinquième chapitre présente la variabilité génétique des mutants obtenus par l'irradiation de graines avec les rayons gamma pour les caractères physiologique, morphologique et agronomique chez les lignées de mutants de tournesol.
- Enfin le mémoire se conclura en dégageant quelques perspectives de ce travail.

CHAPITRE I : Etude Bibliographique



Figure 1. Tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.)

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

Le tournesol (*Helianthus annuus* L.) est une espèce diploïde ($2n=2x= 34$), originaire d'Amérique du Nord. Il est ramené en Europe au XVI^e siècle par les Espagnols (Soltner 1995). Le tournesol est considéré comme la première plante annuelle cultivée spécifiquement pour son huile (Figure 1).

Si l'on exclut les problèmes parasitaires, et notamment les maladies, la contrainte majeure à la production du tournesol en France est la sécheresse (Merrien & Grandin 1990); bien que, face aux autres cultures d'été (maïs, sorgho, soja...), le tournesol reste certainement la culture la moins pénalisée en conditions sèches.

1.2. Croissance du tournesol et cycle de développement

Le cycle de développement du tournesol est défini par des stades repères (Figure 2) qui correspondent généralement à l'apparition successive de caractères morphologiques déterminés (Merrien 1992). En plus de ces stades repères de développement, on distingue plusieurs phases important dans le cycle de développement du tournesol (Rollier 1972).

Période 'semis – début floraison'

Durant cette période, la plante se développe et la surface foliaire va progressivement déterminer à la fois les quantités d'eau utilisées par la plante sous forme de transpiration et à la fois les quantités de carbone fixées par voie photosynthétique. Cette surface foliaire et plus principalement l'indice foliaire (LAI, surface foliaire/surface sol) atteinte à la floraison, conditionnera la résistance à la sécheresse durant les phases floraison et post-floraison : Une forte surface foliaire consommera plus d'eau en provenance du sol qu'un faible surface foliaire.

Période 'floraison–maturité'

La floraison est une période clé pour la productivité. Le rendement peut être décomposé en deux termes: nombre d'akènes/m² et poids moyen d'un akène. 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. Dans le cas d'un déficit

STADES REPÈRES DU TOURNESOL

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

Germination-levée Phase végétative Phase bouton floral



Stade A1 (1.0)
Apparition des hypocotyles en crosse.



Stade A2 (1.1)
Emergence des cotylédons et premières feuilles visibles.



Stade B3-B4 (2.3-2.4)
La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long; les pétioles sont visibles du dessus.



Stade E1 (3.1)
Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles: STADE BOUTON ETOILE.

Phase bouton floral Floraison



Stade E2 (3.2)
Le bouton se détache de la couronne foliaire, les bractées sont nettement distinguables des feuilles. Son diamètre varie de 0,5 à 2 cm.



Stade E4 (3.4)
Le bouton est nettement dégagé des feuilles, son diamètre varie de 5 à 8 cm, il demeure horizontal. Une partie des bractées se déploie.



Stade F1 (4.1)
Le bouton floral s'incline; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.



Stade F3.2 (4.3)
Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.

Maturation



Stade M0 (5.0)
Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.



Stade M2 (5.2)
Le dos du capitule est jaune. Les bractées sont aux 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20-25%.



Stade M3 (5.3)
Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15%.



Stade M4 (5.4)
Tous les organes de la plante sont bruns foncés. L'humidité de la graine avoisine 10%.

Figure 2. Cycle végétatif du tournesol

hydrique tardif, la lipidogénèse est inhibée et les remobilisations, notamment azotées, sont favorisées.

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 (sous forme d'acides aminés: glutamine, asparagine) 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 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. La graine est un akène assez gros avec un poids de mille graines de 30 à 100 g.

1.3. Sélection variétale chez le tournesol

La sélection chez le tournesol s'est orientée dans un premier temps vers l'amélioration du rendement par la recherche de variétés à forts potentiels de production. Les méthodes classiques de sélection du tournesol utilisées par les sélectionneurs étaient la sélection massale, la sélection généalogique et la sélection récurrente. Le tournesol étant allogame, la sélection nécessite l'utilisation d'hybrides F1 afin de faire évoluer les performances des variétés nouvelles. Depuis 1960, avec l'obtention de la stérilité mâle cytoplasmique (Leclercq 1969), 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 & Tourveille de Labrouhe 1988) Amélioration des hybrides a notamment conduit à réduire la sensibilité à la verse, les attaques de sclérotinia sur capitule et les dommages causés par le phomopsis sur tige (Vear et al. 2003). L'homogénéité du remplissage des graines dans le capitule a été également recherchée par l'amélioration du remplissage à travers le choix de génotypes (hybrides à grosses graines) présentant le moins de fluctuation dans la distribution de matière sèche dans le capitule (Merrien 1992). Dans la même optique, d'autres auteurs se sont intéressés à la synchronisation de la floraison entre génotypes de façon à optimiser la pollinisation pour l'obtention des

hybrides F1 (Somasekahara et al. 2000). Des programmes de sélection ont été développés pour créer des pools génétiques tolérants à la sécheresse par un fort ajustement osmotique des feuilles (Chimenti et Hall 1994 ; Chimenti et al. 2002).

1.4. Marquage moléculaire, carte génétique et identification des QTLs

Les techniques de marquage moléculaire permettent de rendre plus précises et plus rapides les opérations classiques de sélection. Elles interviennent à chaque étape du cycle de sélection. Les outils mis en place sont les marqueurs moléculaires qui permettent l'analyse des individus, la construction de cartes génétiques pour localiser les gènes sur les chromosomes, et la sélection assistée par marqueurs (SAM) pour suivre les gènes au cours des générations. La recherche des gènes dans le contrôle des caractères d'intérêt peut ainsi être facilitée et leur isolement est réalisé grâce aux outils de la génomique. La connaissance du génome, grâce à la réalisation de cartes génétiques par l'utilisation de marqueurs moléculaires permet donc de cibler un gène d'intérêt.

Un certain nombre de techniques de marquage moléculaire ont été utilisées dans le domaine de la sélection végétale. Il s'agit principalement des techniques suivantes:

I) Les marqueurs RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

II) Les marqueurs dérivés de la PCR :

1- RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

2- AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

3- SSR (*Simple sequence repeat*)

4- SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

5- INDEL (*insertion/deletion*)

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*. Metries et al. (1998), en utilisant cette même carte, avaient étudié la résistance à *Sclerotinia sclerotiorum* chez le tournesol et identifié des QTLs contrôlant le poids de 1000 grains, la teneur en huile et la date de floraison. Deux autres cartes de RFLP ont aussi été publiées chez le tournesol (Berry et al. 1995; Jan et al. 1998). Les marqueurs RFLP nécessitent une certaine technicité (non adaptable à des

méthodologies à hauts débits), et le coût élevé limite aussi le nombre d'individus pouvant être analysés.

La méthode RAPD a été simultanément mise au point par deux équipes (Welch & McClelland 1990 ; Williams et al. 1990). Elle est basée sur l'utilisation d'une seule amorce d'une dizaine de bases environ dont la présence est déterminée arbitrairement. Cette amorce va servir de point de départ pour l'amplification impossible lorsque la taille du fragment à amplifier est trop grande, celle-ci n'aura lieu que lorsque l'amorce aura trouvé deux sites d'hybridation suffisamment proches (moins de 2 à 3 kb). Il s'agit d'une technique moins lourde que la RFLP, mais les allèles sont moins informatifs car ils sont généralement dominants et souvent peu répétables. D'autre part, l'utilisation des marqueurs RAPD est limitée au fond génétique dans lequel ils ont été mis en évidence.

La méthode AFLP est une technique de marquage moléculaire permettant de révéler par PCR des polymorphismes de restriction. Cette technique est très fiable et fournit beaucoup plus d'informations que la technique RAPD, puisqu'elle amplifie 10 fois plus de fragments par couple d'amorce.

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), 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. 2000a; Rachid Al-Chaarani et al. 2002) ainsi que dans des études de résistance aux maladies virales, comme la mosaïque du concombre (Ben-Chaim et al. 2001). Des caractères plus complexes comme le rendement ont été étudiés chez le maïs et plusieurs QTLs ont été identifiés (Marsan et al. 2001). Chez le tournesol, la carte génétique basée sur les marqueurs AFLP, en utilisant des lignées recombinantes, a permis d'identifier des QTLs liés à l'organogénèse (Flores Berrios et al. 2000a). Cette même carte de tournesol a permis l'étude de caractères physiologiques pour lesquels plusieurs QTLs ont été mis en évidence (Hervé et al. 2001), ainsi que dans l'identification de QTLs contrôlant la résistance au mildiou et au phoma (Rachid Al-Chaarani et al. 2002). Une autre carte génétique a été également établie en utilisant des marqueurs SSRs et AFLPs (Mokrani et al. 2002). Cette carte a permis d'identifier des QTLs liés aux quelques caractères d'intérêt agronomique chez 118 familles F3 du tournesol (Mokrani et al. 2002).

Les SSRs sont des motifs simples, constitués de quelques paires de bases répétées en tandem et qui montrent une variation de longueur. Ces marqueurs sont co-dominants et dispersés de façon assez dense sur l'ensemble du génome des Eucaryotes. La technique de marquage est

basée sur l'amplification par PCR en utilisant une paire d'amorces flanquant les microsatellites. Le développement de tels types de marqueurs et leur utilisation chez des espèces végétales comme le maïs (Taramino & Tingey 1996) et tournesol (Tang et al. 2002 ; Yu et al. 2003 ; Micic et al. 2005) a ouvert de nouvelles portes pour la cartographie des génomes, tout particulièrement le développement de nouvelles stratégies de sélection par PCR, basées sur les marqueurs moléculaires. Récemment, une carte génétique référence a été construite à l'aide de 459 SSRs publiques pour le tournesol (Tang et al. 2002). Cette carte est utilisée pour des études comparatives chez le tournesol à partir des SSRs communes entre les différentes cartes génétiques de tournesol et la carte référence.

Les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) sont basés sur le polymorphisme d'un seul nucléotide (polymorphisme nucléotidique). Beaucoup de SNP n'ont pas d'implications fonctionnelles mais ils définissent un locus unique et polymorphe dans le génome. Les récents progrès en matière de séquences d'ADN et la mise au point de méthodologies à haut débit ont rendu possible l'identification et l'analyse de la variation nucléotidique à grande échelle. Récemment, 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 qui a été déjà utilisée par Tang et al. (2002) pour la construction d'une carte SSR.

Les marqueurs INsertions/DELétions (INDELs) ont été également employés pour la construction d'une carte génétique chez le tournesol (Yu et al. 2003). Le polymorphisme des 'INDELs' est basé sur une insertion ou la suppression de paires de bases qui conduit à modifier la longueur de la séquence analysée. Les marqueurs 'insertion/délétion' (INDELs) sont nombreux et peuvent être détectés en utilisant des méthodologies à haut débit. Pour cartographier l'INDELs, des couples d'amorces à partir de séquence génique sont employés pour examiner le polymorphisme entre les parents d'une population ; et les marqueurs qui présentent un polymorphisme de taille ou de présence/absence peuvent être cartographiés. Le polymorphisme l'INDELs peut être détecté par l'intermédiaire d'électrophorèse de gel de l'agarose (Choi et al. 2004). Par conséquent, l'INDEL est approprié pour l'usage de routine et de haut-débit en recherche fondamentale aussi bien qu'en amélioration appliquée.

1.5. Effets de la sécheresse et stratégies d'adaptation

1.5.1. Effets de la sécheresse

1.5.1.1. Effets de la sécheresse sur la production

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 à ce moment là. 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 hydrique¹ de 50% réduit de plus de 30% le nombre de graines et de 20% leur poids moyen (Merrien & 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, voire d'augmenter, l'indice de récolte² 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 (LAI, 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).

¹ Déficit hydrique apprécié par le taux de satisfaction en eau, égal au rapport entre l'évapotranspiration réelle et maximale.

² Indice de récolte: Rendement en graines exprimé par rapport à la masse totale des parties aériennes de la plante.

1.5.1.2. 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 al. 1984; Cosgrove 1993).

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

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. Cette réduction de la surface foliaire en conditions sèches réduit la surface évaporatrice de la plante et limite considérablement la production primaire. 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. 1981).

1.5.1.3. Effets de la sécheresse sur l'activité photosynthétique

Lors d'un déficit hydrique, l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse, est affectée. La réduction de la photosynthèse, liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, est supposée dépendre à la fois i) de la fermeture des stomates, avec pour conséquence une diminution de la conductance à la diffusion du CO₂, ii) d'une limitation biochimique du chloroplaste pour fixer le CO₂ (Graam & Boyer 1990), probablement associée à la régénération limitant du RuBP 'Ribulose Biphosphate, substrat du cycle de Calvin' (Gimenez et al. 1992).

La conductance stomatique diminue lors de l'abaissement du potentiel hydrique foliaire et, chez le tournesol, devient négligeable à des potentiels proches de -2 MPa (Mojayad 1993). Le contrôle de la régulation stomatique fait intervenir la turgescence cellulaire mais également des messagers racinaires, comme l'acide Abscissique 'ABA' (Zhang & Davies 1989; Davis et al. 1994). Généralement, au champ, une période sèche a des effets en premier lieu sur l'état hydrique de la plante, avant même celui du sol (Kramer 1988). Même pour des plantes bien alimentées en eau, une diminution du potentiel hydrique foliaire à la mi-journée est souvent observée au champ, lorsque la journée est chaude et ensoleillée. Dans une telle situation, l'altération de l'état hydrique de la feuille peut conduire à augmenter la sensibilité des stomates à l'ABA (Tardieu et al. 1993); les mécanismes impliqués dans cette relation sont d'ailleurs loin d'être clairement élucidés (Munns & Sharp 1993).

La turgescence cellulaire intervient de manière plus ou moins directe au niveau du chloroplaste : directement par le maintien du volume du chloroplaste (Gupta & Berkowitz 1987), et indirectement, par son effet sur l'ouverture stomatique, qui en contrôlant la conductance au CO₂, conditionne l'utilisation de l'énergie photochimique (ATP, NADPH) dans le chloroplaste. La non-utilisation de cette énergie peut induire ou exacerber des phénomènes de photoinhibition. Ceux-ci se traduisent par la diminution, plus ou moins rapidement réversible, du potentiel photochimique, liée à l'activation des mécanismes de dissipation de l'énergie, et/ou à la destruction proprement dite des photosystèmes II (PSIIs).

1.5.2. Mécanismes d'adaptation à la sécheresse

L'installation d'une sécheresse se manifeste par la combinaison d'une part, de la restriction de la disponibilité en eau du sol et, d'autre part, de l'augmentation de la demande évaporatrice. Dans les zones arides, les plantes ont développé des régulations assurant leur survie, en général aux dépens de la productivité. Ces régulations sont de nature différente chez les plantes cultivées des régions tempérées qui ont été sélectionnées pour leur productivité. D'un point de vue agronomique, la tolérance à la sécheresse est la capacité de la plante à croître et donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des déficits hydriques épisodiques (Turner 1997). Jones (1992) a défini et établi une classification des 'stratégies' d'adaptation des plantes à la sécheresse : (1) la première consiste à 'éviter' le stress hydrique et (2) l'autre à le 'tolérer'.

1.5.2.1. Éviter la sécheresse

La première façon d'éviter la sécheresse est l'esquive. L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adaptation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies. Le développement phénologique rapide avec une floraison précoce, permet à la plante d'éviter les périodes sèches. 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.

La deuxième façon d'éviter la sécheresse est la capacité de la plante à maintenir un état hydrique satisfaisant. La stratégie de l'évitement est principalement liée, d'une part, à la réduction de la transpiration et d'autre part, à une optimisation de l'absorption d'eau par les racines. La diminution de la transpiration est principalement liée à la fermeture des stomates. Il s'ensuit une chute de l'assimilation de CO₂ donc une baisse de production de biomasse. Elle peut être due également à une diminution des surfaces évaporantes.

Parmi les mécanismes permettant de réduire la transpiration, la réduction de la surface foliaire et la diminution de la conductance stomatique (gs) 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 (LAI) chute en-dessous de 2.5 à la floraison (Merrien & 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 & Merrien 1990). La régulation de la conductance stomatiques dépend du potentiel hydrique foliaire et de l'humidité de l'air au champ (Turner 1997). Les génotypes à faible conductance sont plus sensibles au déficit de vapeur et à la baisse du potentiel hydrique foliaire que les génotypes à forte conductance. Une faible conductance est généralement proposée comme un trait favorable à l'adaptation à la sécheresse (Jones 1979, 1980, 1987 ; Turner 1979, 1982, 1986, cité par Ludlow & Muchow 1990). Si la fermeture des stomates n'est pas totale, en raison de la différence entre les coefficients de diffusion de l'eau

et du CO₂ dans la feuille, la transpiration est plus réduite que l'assimilation nette: l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est alors augmentée.

En revanche, une telle sensibilité des stomates à la diminution de potentiel hydrique peut augmenter la fréquence des épisodes de photoinhibition. La chaîne de transport des électrons est alors rétro-réglée afin de dissiper l'énergie lumineuse en excès. Il est admis que le photosystème II (PSII) joue un rôle central dans les processus d'utilisation et de régulation de l'énergie lumineuse (Baker 1991). Lorsque la fixation du CO₂ ne consomme plus assez d'énergie, d'autres voies métaboliques, telles que la photorespiration, peuvent contribuer au maintien du transfert non cyclique des électrons. Lorsque cette 'voie photochimique' est saturée, la dissipation thermique, par l'intermédiaire du cycle des xanthophylles, joue un rôle important au sein des mécanismes photoprotecteurs en limitant la destruction des PSII (Demmig-Adams & Adams 1992). Cependant, une augmentation supplémentaire de l'énergie lumineuse absorbée, conduit à une inactivation des PSII plus ou moins réversible, liée à des modifications structurales de la protéine D1 (Critchley & Russel 1994). Ces modifications du fonctionnement photochimique peuvent être associées à une altération de la biochimie du chloroplaste. En effet, chez le tournesol, la réduction de la concentration intercellulaire en CO₂ peut s'accompagner d'une diminution durable de l'efficacité du chloroplaste à utiliser le CO₂, même si par la suite, la disponibilité de celui-ci n'est plus limitante (Wise et al. 1991). Cette altération du fonctionnement chloroplastique, plus ou moins rapidement réversible, 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.

L'optimisation de l'absorption d'eau est liée à un ensemble complexe de caractères morphologiques des racines : masse et volume, ramification, profondeur (Ramanjulu & Bartels 2002). De nombreuses plantes adaptées aux zones arides ne contrôlent que très peu leurs pertes en eau par transpiration, mais possèdent un enracinement très profond capable d'extraire l'eau du sol. La croissance racinaire en conditions sèches peut être maintenue par l'ajustement osmotique qui limite la baisse du potentiel de turgescence (Turner 1986). Cependant deux types de raisons limitent beaucoup l'utilisation des critères racinaires par les sélectionneurs (Turner et al. 2001) : L'impraticabilité du criblage au champ pour cette caractéristique sur une grande échelle et la difficulté de corrélérer des observations au champ à celles qui sont faites en pots. L'absence d'une compréhension précise du rôle exact des racines en conditions de ressources hydrique limitées est un autre facteur limitant à la mise en place d'un système de criblage économe et efficace (Passioura 1994).

1.5.2.2. Tolérer la sécheresse

La tolérance est la stratégie qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique. Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates (Mojayad & Planchon 1994), de maintenir le volume chloroplastique (Gupta & Berkowitz 1987) et de réduire le flétrissement foliaire (Jones & Turner 1980). Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique interne (Ludlow et al. 1983).

Cette tolérance au déficit hydrique interne permet un fonctionnement prolongé de la photosynthèse. Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que la croissance racinaire. Une autre conséquence du maintien du métabolisme carboné sera une diminution de la fréquence des épisodes de photoinhibition. Au niveau cellulaire, l'ajustement osmotique joue un rôle déterminant dans le maintien de la turgescence aux faibles potentiels hydriques foliaires.

Les capacités d'ajustement osmotique sont variables chez le tournesol et dépendent du génotype (Chimenti et al. 2002), des modalités d'installation du déficit hydrique (Jones & Rawson 1979), et de l'âge de la feuille (Jones & Turner 1980; Sadras et al. 1993; Chimenti et al. 2002). 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 & Weir 1981), étant donné que la contribution des ions inorganiques est plus importante (Jones et al. 1980).

La tolérance à la sécheresse est le résultat de mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires complexe. L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes (l'ajustement osmotique) couplés à un système antioxydant efficace sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique. Plusieurs de ces mécanismes ont été caractérisés chez différents plantes (Ramanjulu & Bartels 2002).

1.5.3. Les mécanismes moléculaires de la tolérance à la sécheresse

1.5.3.1. Des gènes et leurs produits induits par le stress hydrique

Qu'est ce qui distingue les plantes tolérantes au stress hydrique des plantes non-tolérantes au niveau moléculaire? L'analyse d'expression de gènes de plantes soumises à la déshydratation souligne que la réponse n'est pas liée au seul gène. L'analyse 'microarray' sur des plantes

d'*Arabidopsis* employant 1300 ADNc a indiqué qu'approximativement 44 gènes sont induits en réponse à la déshydratation (Seki et al. 2001). Cependant, chaque gène induit n'a pas nécessairement un rôle dans l'adaptation; certains pourraient être induits en raison des dommages provoqués par le stress (Zhu 2000). Les gènes répondant à la déshydratation peuvent être classés par catégorie dans deux classes, basées sur leurs réponses en terme d'échelle de temps. Certains répondent immédiatement - de quelques secondes à plusieurs minutes - tandis que d'autres répondent plus tard, en heures, en jours ou même en semaines. Ceci nous permet de penser que les gènes qui répondent tôt peuvent fournir une protection vis à vis du stress et une amplification initiale des signaux de transduction tandis que les gènes qui répondent plus tard peuvent être impliqués dans l'adaptation. Dans la section suivante, nous récapitulons les caractéristiques des groupes répandus de gènes qui s'accumulent dans beaucoup d'espèces de plantes soumises à une contrainte hydrique.

1.5.3.1.1. Protéines du groupe des 'LEA' (*Late-Embryogenesis-Abundant* protéines)

Les Late-Embryogenesis-Abundant protéines (LEA) sont un groupe important de protéines qui s'accumulent typiquement pendant les dernières étapes de l'embryogenèse ou en réponse à la déshydratation, aux basses températures, à la salinité ou au traitement exogène d'ABA - témoignant de leur réponse à la déshydratation cellulaire (Ramanjulu & Bartels 2002). Il a été proposé que ces protéines peuvent jouer un rôle en protégeant les structures cytoplasmiques pendant la déshydratation (Ramanjulu & Bartels 2002).

Les déhydrine s sont une famille immunologiquement distincte de protéines, également connue sous le nom de LEA D11, sous-groupe des 'Late-Embryogenesis-abundant' (LEA) protéines (Dure et al. 1989), et ont été décrites dans de nombreuses espèces d'angiospermes et de gymnospermes (Bray 1997). Un ADNc de déhydrine, *HaDhn1*, induit par le stress hydrique, a été isolé et séquencé chez le tournesol (Ouvrard et al. 1996), et l'accumulation de ces transcripts a été corrélée avec la tolérance à la sécheresse (Cellier et al. 1998). Une séquence allélique de ce gène, *HaDhn1a*, nécessite l'accumulation d'acide abscissique (ABA) pour être exprimé aux dernières étapes de l'embryogenèse chez *Helianthus annuus*. Cependant, les transcripts de *HaDhn1a* se sont également accumulés en réponse au stress hydrique dans des mutants ABA-déficients de tournesol (Giordani et al. 1999).

1.5.3.1.2. Les Aquaporines

Les plantes équilibrent leur état hydrique en ajustant la conductibilité de l'eau de leurs tissus. Les tissus vasculaires et les cellules de garde jouent un rôle important dans ce processus. Les aquaporines sont un composant significatif dans le transport cellulaire de l'eau (Maurel & Chrispeels 2001; Tyerman et al. 2002). Les aquaporines peuvent réguler la conductivité hydraulique et augmenter de 10 à 20 fois la perméabilité à l'eau des membranes (Maurel & Chrispeels 2001). L'expression et l'activité des aquaporines sont modulées par la déshydratation. Smart et al. (2001) ont montré que la répression de gènes d'aquaporines diminue la perméabilité à l'eau des membranes et peut conduire à la conservation cellulaire de l'eau pendant des périodes de contrainte hydrique. En revanche, il y a des exemples de gènes d'aquaporines, qui sont exprimés pendant le stress hydrique ayant pour résultat une plus grande perméabilité et une augmentation du flux de l'eau (Yamaguchi-Shinozaki et al. 1992; Yamada et al. 1997).

1.5.3.1.3. *Les protéines de transfert de lipides*

Trevino & O'Connell (1998) ont rapporté l'induction de trois nsLTPs (protéines non spécifiques de transfert de lipide) dans *Lycopersicon pennellii* par la sécheresse. Les produits de ces gènes sont impliqués dans la biosynthèse de la cuticule. Vraisemblablement, l'induction du nsLTP dans l'expression épidermique-cellule-spécifique représente une réponse adaptative au stress hydrique, par lequel la plante peut réduire la perte d'eau en augmentant l'épaisseur de la cuticule.

1.5.3.1.4. *Protection des structures photosynthétiques*

Les propriétés physiques de l'appareil photosynthétique sont cruciales pour la tolérance des plantes au stress hydrique. L'appareil photosynthétique, très sensible et exposé à des dommages, doit être maintenu ou rapidement réparé lors de la déshydratation (Godde 1999). Les protéines chloroplastiques sont particulièrement déterminantes pour maintenir la fonctionnalité de l'appareil photosynthétique. Schneider et al. (1993) ont montré que trois gènes chez le *C. plantagineum*, exprimés préférentiellement sous contrainte hydrique, codent pour des protéines chloroplastiques ('chloroplaste-localized stress proteins' - DSP). Les études immunologiques ont indiqué que les deux protéines, DSP22 et DSP34, sont situées dans les thylakoïdes, et que la protéine DSP21 était localisée dans le stroma. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'entretien des structures du chloroplaste en réponse à une contrainte

hydrique. En outre, il a été démontré que la synthèse de DSP22 dépend de l'ampleur des dommages causés par photoinhibition (Alamillo & Bartels 2001). Pruvot et al. (1996) ont également rapporté l'accumulation d'une protéine chloroplastique (CDSP34), induit par la sécheresse, dans les thylakoides de *Solanum tuberosum*. Ces auteurs ont suggéré que cette protéine stabilise les membranes des thylakoides. Rey et al (1998) ont caractérisé un « stromal thioredoxin-like protéine (CDSP32)» induit par déshydratation, chez la pomme de terre, dont l'expression est indépendante de l'ABA.

1.5.3.1.5. Le stress oxydatif

Une conséquence des stress environnementaux - comprenant le stress hydrique - est l'apparition d'un stress oxydatif, c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui endommagent les structures cellulaires (Smirnoff 1993). Dans des conditions optimales, les feuilles sont dotées d'enzymes et de métabolites antioxydants suffisants pour faire face aux ROS. De nombreux travaux montrent que des enzymes telles que des superoxide dismutases (SOD), des ascorbate peroxydases (APX), des catalases (CAT), des glutathion-S-transférases (GST) et des glutathion peroxydases (GPX) s'accumulent pendant le stress hydrique. La capacité du système antioxydant est déterminante pour maintenir l'intégrité du système photosynthétique lors d'une contrainte hydrique (Reddy et al. 2004).

1.5.3.1.6. Accumulation d'osmolytes et de sucres solubles

L'accumulation de solutés ou d'osmolytes aide à maintenir un équilibre osmotique au niveau cellulaire dans des conditions de déshydratation (Bray et al. 2000). Les osmolytes incluent des sucres, les polyols, la proline, les composés à ammonium quaternaire et les composés tertiaires de sulfonium. Plusieurs exemples montrent une modification d'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse d'osmolytes en réponse au déficit hydrique. Par exemple, l'expression simultanée du gène de la P-5-C synthase (P-5-CS) et la répression du gène de la proline déshydrogénase (ProDH) conduit à une accumulation de proline pendant le déficit hydrique (Yoshiba et al. 1997). Un transporteur (LeProT1) de la proline a été également induit par le stress hydrique (Schwacke et al. 1999). Ceci illustre la complexité du métabolisme permettant l'ajustement du niveau de proline.

Le mécanisme de la protection fourni par ces osmolytes n'est pas compris (Ramanjulu &

Bartels 2002). Ils peuvent contribuer à l'ajustement osmotique, mais également être impliqués dans d'autres mécanismes vis à vis du déficit hydrique, comme la détoxification des ROS (Hong et al. 2000). La capacité des osmolytes à augmenter la tolérance au stress hydrique a été montrée par une sur-expression de certains gènes dans des plantes transgéniques (voir 2.3.3).

Une observation commune dans le processus de déshydratation est l'accumulation de sucres solubles. Ces derniers jouent un rôle déterminant dans l'ajustement osmotique, et aussi au niveau de la stabilisation de certaines protéines (Carpenter et al. 1990). L'accumulation de saccharose pendant le stress hydrique est observée chez *C. plantagineum*: la déshydratation induit la conversion du 2-octulose, un sucre à huit-carbone, en saccharose (Bianchi et al. 1991). Cette conversion est corrélée à l'augmentation de l'expression des gènes de la saccharose synthase (SUS) et de la saccharose phosphate synthase (SPS) (Ingram et al. 1997 ; Kleines et al. 1999). Ces deux enzymes (SUS et SPS) sont considérées comme principalement impliquées dans la régulation de la synthèse du saccharose. (Pelah et al. 1997 ; Dejardin et al. 1999). L'évidence d'un rôle de la SPS dans l'accumulation de saccharose pendant le déficit hydrique a été fournie par une stratégie antisens chez la pomme de terre: l'augmentation de saccharose induite par le stress hydrique a été complètement supprimée chez les plantes antisens et par conséquent, les capacités d'alimentation en eau et de croissance a été largement diminués (Geigenberger et al. 1999).

1.5.3.2. Activation transcriptionnelle des gènes

De la même manière que les fonctions des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique sont très variées, l'activation de ces gènes est sous le contrôle de nombreux facteurs. L'acide abscissique (ABA) intervient dans la régulation de l'expression de nombreux gènes lors d'un déficit hydrique (Bray 1993; Yamaguchi-Shinozaki et al. 2002). Les gènes induits par l'ABA sont souvent des gènes codants pour des protéines de type LEA ou déhydrines mais également des gènes impliqués dans la synthèse d'osmolytes (ajustement osmotique), dans la perméabilité membranaire (par exemple: aquaporines), dans le catabolisme ou la réparation cellulaire. L'expression de tous les gènes de type LEA est régulée sous le contrôle de l'ABA (Wang et al. 2003). L'induction des gènes non gouvernés par l'ABA est modulée par des facteurs de transcription dont les séquences les plus connues sont de type DRE (Dehydration Responsive Element). Ces séquences ont été caractérisées et sont également activées par le

stress osmotique (Liu et al. 1998).

1.5.3.3. Amélioration de la tolérance à la déshydratation par la transformation génétique

La transformation génétique offre une nouvelle manière d'évaluer la contribution de différents gènes à la tolérance à la déshydratation. Lors de la dernière décennie, de nombreux travaux ont consisté à évaluer le potentiel de tolérance à la sécheresse de plantes génétiquement modifiées au niveau de la production d'osmolytes, d'enzymes de détoxification d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des facteurs de transcription, et de composants impliqués dans la transduction de signal...

Quand le gène P-5-CS impliqué dans la synthèse de la proline a été introduit chez le riz, les plantes transgéniques ont montré une augmentation de biomasse dans des conditions de stress hydrique (Zhu et al. 1998). Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'accumulation de proline est susceptible d'augmenter la performance en réponse au stress hydrique.

Des fructanes sont des molécules de polyfructose qui sont produites par beaucoup de plantes et bactéries. Ils peuvent jouer un rôle dans l'adaptation au stress osmotique en raison de leur haute solubilité. Le gène du 'Sac B' de *Bacillus subtilis* a été introduit dans le tabac sous le contrôle transcriptionnel du promoteur 35S. Les plantes transformées ont accumulé des fructanes et celles-ci ont présenté une augmentation de poids frais de 33% en situation de contrainte hydrique par rapport aux plantes non-transformées (Pilon-Smits et al. 1995). Un résultat comparable a été obtenu avec ce même gène par Pilon-Smits et al. (1999) chez la betterave à sucre.

Le tréhalose, un disaccharide de glucose, est connu comme métabolite de réserve chez la levure. Les études biochimiques ont également prouvé que le tréhalose stabilise des protéines et des lipides membranaires. Des plantes de tabac transformées avec le gène codant pour la sous-unité de la tréhalose synthase (TPS1) de la levure ont accumulé du tréhalose et présenté un phénotype tolérant à la sécheresse (Holmstrom et al. 1996). Chez les plantes de tabac transformées avec les gènes codant pour la tréhalose-6-phosphate synthase et la tréhalose-6-phosphate phosphatase d'origine bactérienne, les feuilles ont présenté une meilleure efficacité photosynthétique et une accumulation plus élevée de masse sèche en condition sèche

comparativement aux plantes non-transformées (Pilon-Smits et al. 1998). Par conséquent, le transfert de gènes synthétisant des osmolytes dans la plante a confirmé le rôle de ces derniers dans l'adaptation à la sécheresse. Xu et al. (1996) et Sivamani et al. (2000) ont produit du riz et du blé transgénique par le gène LEA isolé de l'orge (HVA1). L'accumulation de la protéine HVA1 dans les feuilles et les racines des plantes transgéniques a conduit à améliorer la tolérance à la sécheresse et à la salinité comparativement aux plantes non transformées. Il est important de noter que l'effet individuel de ces gènes sur la tolérance à la déshydratation est souvent faible.

Récemment, notre compréhension du rôle des systèmes de détoxification vis à vis de ROS dans la tolérance au stress chez les plantes a été améliorée par l'utilisation des plantes transgéniques pour des enzymes antioxydantes. Un certain nombre d'expériences ont démontré que les systèmes de détoxification des ROS pourraient assurer une protection plus ou moins efficace contre des dommages oxydatifs, indiquant que cette stratégie (plante transgénique) pourrait être employée pour améliorer la tolérance à la différents stress. Des plantes transgéniques de *Medicago* qui ont reçu le gène codant pour MnSOD de *Nicotiana glauca* présentent une amélioration de la tolérance à la sécheresse au champ comparativement aux plantes non transgéniques (McKersie et al. 1996).

L'amélioration de la tolérance au stress en manipulant les gènes régulateurs s'est avérée être aussi un outil prometteur, comme démontré par Jaglo-Ottosen et al. (1998) et Kasuga et al. (1999). Par exemple, l'expression forte de deux facteurs de transcription appartenant à la même famille de gène (DREB1 et DREB2) a amélioré la tolérance à la déshydratation chez *Arabidopsis* (Liu et al. 1998).

La manipulation des composants impliqués dans la cascade des signaux semble être une autre stratégie possible pour améliorer la tolérance aux stress multiples (Saijo et al. 2000). Un gène induit par le stress chez le riz, codant pour une protéine kinase calcium-dépendante (OsCDPK7), augmente les niveaux des gènes tels que rab16A (protéine du groupe 2 des LEA), salT (protéine riche en glycine) et wsi18 (protéine du groupe 3 des LEA) en réponse au sel et à la sécheresse (Saijo et al. 2000).

En conclusion, les plantes utilisent des mécanismes multiples pour assurer la tolérance au stress hydrique. Actuellement, notre connaissance des mécanismes qui contribuent à la

tolérance à la déshydratation est incomplète, et le développement de travaux sur les processus contribuant à la tolérance est essentiel pour développer des technologies d'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez les plantes cultivées. Bien que certains résultats publiés sont encourageants, ils restent à valider dans des conditions de sécheresses compatibles avec les situations agricoles (Tardieu & Zivy 2007 ESCo '*sécheresse et agriculture*').

1.6. Étude génétique des caractères physiologiques de tolérance au déficit hydrique et recherche de marqueurs moléculaires

L'étude génétique des caractères de tolérance au déficit hydrique implique d'étudier ces caractères sur des populations en ségrégations, lignées recombinantes (RILs) et éventuellement back cross (BC). La principale difficulté, sur le plan expérimental, réside alors dans le fait que les mesures physiologiques souvent lourdes et parfois longues doivent être conduites sur un grand nombre d'individus différents. Il n'est dès lors pas étonnant que les études de transmission ou d'héritabilité des caractères physiologiques soient peu nombreuses. Le développement des techniques de biologie moléculaire nous fournit en revanche de nouveaux outils pour l'analyse génétique de la tolérance.

Face aux difficultés d'utilisation de « critères physiologiques de prédiction » en sélection, le développement des outils de marquage moléculaire est susceptible d'apporter d'importants éléments de réponse, l'idée de base étant de rechercher des relations entre la présence de certains marqueurs et certains mécanismes physiologiques liés à la tolérance. La mise en oeuvre de cette démarche passe donc par une analyse du polymorphisme, soit au niveau des protéines, soit au niveau de l'ADN. Les stratégies d'utilisation de marqueurs en vue de l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse peuvent quant à elles être regroupées autour de trois axes : la localisation de marqueurs de tolérance inductibles par le stress hydrique, la recherche de QTL (Quantitative Trait Loci), contrôlant des caractères quantitatifs et l'étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress hydrique.

1.6.1. Recherche de marqueurs par l'approche QTL et gènes candidats

Le sens de la démarche est ici de localiser des zones du génome impliquées dans les variations de caractères quantitatifs, donc de type multigénique. Pour ce faire, on mesure les valeurs du

caractère sur la descendance d'un croisement en ségrégation (RILs, BC) sur laquelle a été préalablement établie une carte génétique; on suit alors la coségrégation de marqueurs et de caractères physiologiques ou agronomiques intéressants. S'il existe des QTLs intervenant dans la tolérance à la sécheresse, chacun d'eux sera entouré de marqueurs qui n'en sont pas trop distants; on pourra donc exploiter les fréquences de recombinaison entre les QTL et les marqueurs situés dans l'intervalle de confiance des QTLs. Parallèlement, le positionnement des gènes candidats sur cette même cartographie à proximité des QTL permettrait une validation concomitante de ces deux types de marqueurs. A terme, et ayant défini des marqueurs moléculaires liés aux caractères de tolérance, il devrait être possible de suivre plus facilement leur évolution dans un programme de sélection assistée par marqueurs.

1.6.2. Étude du polymorphisme de marqueurs moléculaires et relation avec la tolérance au stress

Un polymorphisme d'un marqueur peut être recherché sur un grand nombre de génotypes (mutants ou d'autres génotypes homozygotes ou hétérozygotes) à comportement contrasté, en vue de repérer des corrélations entre le polymorphisme observé et les différences de comportement vis-à-vis du stress; si des corrélations statistiques fortes peuvent être notées entre la présence d'allèles donnés au locus de certains marqueurs et un caractère donné de tolérance, ces relations marqueurs/caractères doivent être alors validées par l'étude de populations en ségrégation. On utilisera de préférence comme sondes, des séquences ADNc ou génomiques correspondant à des gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique; un tel travail peut être engagé. Les allèles statistiquement corrélés à un caractère de tolérance pourraient correspondre à une séquence codant pour un gène plus «efficace » ou une séquence impliquée dans la régulation du niveau d'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress. En utilisant des marqueurs anonymes de type AFLP, il pourrait être possible d'associer un fragment donné à une tolérance et de définir ainsi de nouveaux marqueurs « candidats » pour la tolérance au stress hydrique.

1.6.3. Étude des mécanismes moléculaires de réponse au stress

Celle-ci consiste à induire un stress sur une plante entière, puis à suivre les modifications induites par ce stress au niveau des protéines ou des ARN messagers. Il est possible d'utiliser

les gènes identifiés pour transformer des plantes et étudier ainsi le rôle du gène dans la plante transgénique obtenue. Cette axe de travail amène toutefois à se poser une série de questions :

- Les gènes induits par le stress ont-ils un rôle effectif dans l'acquisition de la tolérance, ou bien ne font-ils que marquer un état de stress ?
- Comment relier ces gènes aux mécanismes et critères physiologiques préalablement définis, et comment les utiliser dans un schéma de sélection ?

CHAPITRE II : Materiels et Methodes

2.1. Matériel végétal

2.1.1. La population des lignées recombinantes (RILs)

Des 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'. Notre laboratoire dispose d'un ensemble de 150 lignées recombinantes dont une partie a été utilisée pour la réalisation de nos expérimentations.

2.1.2. La population des mutants (M6)

Le laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes (BAP) a généré une lignée de tournesol appelée 'AS613' issue d'un croisement entre ENSAT-125 et ENSAT-704. 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 à l'Energie Atomique de Cadarache, en France. Le laboratoire possède ainsi actuellement une collection de plus de 2000 mutants (M6) produite par autofécondation. Mon travail concerne l'étude de 40 mutants qui ont été choisis au vu de leurs différences phénotypiques avec la lignée d'origine AS613.

2.2. Conditions de culture

2.2.1. Conditions de culture pour les LIRs

2.2.1.1. Culture en conditions contrôlées (serre)

78 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC2' et 'RHA266' ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions contrôlées. Les deux parents ainsi que les 78 lignées recombinantes ont été mises en culture en serre, dans un dispositif 'split-plot' en blocs randomisés avec deux traitements hydriques (bien-irriguée et stressé) et trois répétitions pour chaque traitement. Cette expérimentation a été conduite en conditions contrôlées. La culture était menée en serre. La croissance des plantes s'effectuait sous

éclairage naturel à une intensité lumineuse moyenne estimée à $500 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ (l'intensité maximale de l'éclairage enregistrée à 14 heures était de $1600 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) 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 $65 \pm 5\%$ et $85 \pm 5\%$.

2.2.1.2. Culture en conditions naturelles (champ)

100 lignées recombinantes et leurs deux parents 'PAC2' et 'RHA266' ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions naturelles. Les deux parents ainsi que les 100 lignées recombinantes ont été mises en culture au champ, 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).

2.2.2. Conditions de culture pour les mutants

2.2.2.1. Culture en conditions contrôlées (serre)

39 mutants M6 et leur lignée originelle (AS613) ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions contrôlées. La lignée originelle ainsi que les 39 mutants ont été mis en culture en serre, dans un dispositif 'split-plot' en blocs randomisés avec deux traitements hydriques (bien-irrigué et stressé) et trois répétitions pour chaque traitement. Cette expérimentation a été conduite en conditions contrôlées. La culture était menée en serre. Les conditions sont celles présentées pour les RILs (2.2.1.1).

2.2.2.2. Culture en conditions naturelles (toit roulant)

31 mutants M6 et leur lignée originelle ont été utilisés afin d'étudier la résistance au stress hydrique en conditions naturelles. La lignée originelle ainsi que les 31 mutants 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.

2.2.3. Contrainte hydrique en serre pour LIRs

Les plantes sont arrosées normalement jusqu'au stade bouton floral (R1, Schneiter & Miller 1981). A ce stade le déficit hydrique est provoqué. La moitié des plantes (dite stressées) avait subi une contrainte hydrique progressive, réalisée à ce stade. Cette contrainte hydrique consistait à diminuer progressivement, l'arrosage du 100% au 30% pendant 15 jours (soit une diminution d'approximativement 10% par trois jour). 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 l'état des feuilles jeunes en flétrissement jusqu'à la récolte.

2.2.4. Contrainte hydrique en champ pour LIRs

Deux expérimentations (irrigué et non-irrigué) sont mises en culture au champ à l'INRA Auzeville. Les plantes dans les conditions irriguées, 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 l'expérimentation non-irriguée n'a pas été arrosée.

2.2.5. Contrainte hydrique en serre pour les mutants

Les plantes sont arrosées normalement jusqu'au stade de floraison (stade R5, Schneiter & Miller 1981). La moitié des plantes (dite les plantes stressées) avait subi une contrainte hydrique modérée, réalisée au stade de floraison. A ce stade le déficit hydrique est provoqué par diminution de l'arrosage de 50%. Cette irrigation était poursuivie jusqu'à la récolte.

2.2.6. Contrainte hydrique sous toit roulant pour les mutants

La moitié des plantes avait subi une contrainte hydrique modérée, réalisée au stade bouton floral (stade R1, Schneiter & Miller 1981). A ce stade le déficit hydrique est provoqué par arrêt de l'arrosage jusqu'à la récolte. Une irrigation normale a été réalisée pour les plantes bien-irriguées tout au long d'expérimentation.

2.3. Stade de mesure et paramètres étudiés

Dans tous les cas, les mesures d'architectures, de fluorescence, des échanges gazeux (photosynthèse), et des relations hydriques ont été réalisées sur la feuille la plus jeune et complètement développée, au stade de floraison (stade R5, Schneiter & Miller 1981). Les mesures de sénescence des feuilles ont été suivies à partir de la floraison jusqu'à la récolte. Ensuite, la productivité des plantes a été mesurée à la récolte. Ces mesures ont été effectuées sur des plantes bien alimentées en eau, ainsi que celles soumises au déficit hydrique.

2.3.1. Les caractères physiologiques

La tolérance au déficit hydrique interne des plantes a été étudiée dans les expérimentations effectuées en serre et champ chez les LIRs et les mutants ayant subi une période de déficit hydrique et chez les plantes témoins. Les mesures des paramètres hydriques sont déterminées sur les feuilles après les mesures des paramètres associés à la photosynthèse ou des paramètres de fluorescence.

2.3.1.1. Relation hydrique

Nous avons déterminé les caractères suivants :

- la teneur en eau relative (RWC), le potentiel hydrique foliaire mi-journée (Ψ_w) le potentiel osmotique (Ψ_s), le potentiel de turgescence ($\Psi_t = \Psi_w - \Psi_s$), le potentiel osmotique à la pleine turgescence (Ψ_{sFT}) et l'ajustement osmotique [$L'AO = \Psi_{sFT}$ (bien-irriguées) - Ψ_{sFT} (stressées)]

2.3.1.2. Photosynthèse et paramètres associés

Les mesures ont été faites sur la feuille la plus jeune et complètement développées de chaque plante, entre 10h et 14h et sous un éclairage naturel. Les paramètres retenus sont les suivants : Photosynthèse nette ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), conductance stomatique ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et concentration interne en CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)

2.3.1.3. Paramètres de la fluorescence des chlorophylles

Les paramètres de la fluorescence des chlorophylles sont mesurés sur des feuilles adaptées 30 minute à l'obscurité avec la fluoromètre PAM 2000. Les mesures ont été faites sur les même feuille qui ont été utilisées pour les mesures de photosynthèse. Les paramètres retenus sont les suivants :

- L'efficacité photochimique potentielle des PSII pour le transfert des électrons ($\Phi_P = F_v/F_m$) : Ceci est estimée par le rapport F_v/F_m mesuré après adaptation des plantes à l'obscurité (Krause 1988).
- Capacités d'utilisation de l'énergie lumineuse pour le transport non cyclique des électrons (Φ_{PSII}) (Genty et al. 1989)
- La part d'énergie lumineuse dissipée de façon thermique au niveau des PSII (NPQ)
- Le paramètre $(1 - qP)$, caractérisant le taux de réduction de QA, est une estimation de l'inactivation des PSII (Osmond et al. 1993).

2.3.2. Les caractères morphologiques et agronomiques

Les caractères suivants ont été déterminés dans l'étude de génétique quantitative pour les caractères agronomiques, et la détection des QTLs :

- La précocité de floraison (nombre de jours entre le semis et la floraison de 50 pour cent des plantes d'une parcelle), La longueur et le diamètre de la tige (cm), Le diamètre du capitule (cm), La biomasse totale par plante (g), Le poids du capitule (g), Le nombre de graines par capitule (g), Le rendement en poids de graines par plante (g), La surface foliaire à la floraison par plante (cm^2) : la somme de surface des feuilles (surface foliaire maximale de chaque feuille à la floraison = $0.7 \times \text{Longueur} \times \text{Largeur}$) et la durée de surface foliaire post floraison ($\text{cm}^2 \times \text{jours}$).

2.4. Marquage moléculaire

2.4.1. Extraction d'ADN

Les graines des lignées recombinantes et celles de leurs deux parents ainsi que les mutants ont été semées en serre contrôlée. 10 jours après le semis et au stade quatre feuilles, les prélèvements foliaires ont été effectués à partir de plantules constituant une lignée

recombinante ou un parent ainsi qu'un mutant et la lignée originelle. Les échantillons d'environ 70-80mg de feuilles contenus dans des tubes Eppendorfs ont été conservés dans le congélateur à -20°C . Le protocole de l'extraction et de la purification d'ADN a été réalisé par la méthode de Fulton et al. (1995).

Deux techniques de marquage ont été employées pour le génotypage, AFLP et SSRs.

2.4.2. Marquage par la technique AFLP

Les étapes du marquage par AFLP sont les suivantes (suivant le protocole présenté par Rachid Al-Chaarani et al. (2004):

2.4.2.1. Double digestion de l'ADN

L'ADN a été d'abord dilué à une concentration de $14\text{ng}/\mu\text{l}$. $18\mu\text{l}$ de chaque échantillon ont été prélevés afin d'être digérés par deux enzymes de restriction. Ces enzymes sont *EcoR1* qui a la propriété de couper au niveau d'un site de restriction à 6 bases (G/AATTC), donc avec une fréquence faible et *Mse1* qui coupe au niveau d'un site de restriction à 4 bases (T/TAA), donc beaucoup plus fréquemment que *EcoR1*. La majorité des fragments d'ADN doit être inférieure à 500 paires de base pour une bonne séparation sur gel d'acrylamide.

2.4.2.2. Ligation des adaptateurs

Il s'agit de lier des adaptateurs spécifiques aux sites de restriction des différents fragments obtenus après la digestion. Une solution contenant des adaptateurs est ajoutée à chaque échantillon de la réaction précédente. Ces adaptateurs sont des séquences d'ADN connues, capables de se ligaturer au niveau des extrémités cohésives de chaque fragment grâce à l'action de la ligase.

2.4.2.3. Préamplification

L'étape de préamplification est une première amplification des trois catégories de fragments d'ADN digérés et ligaturés (*EcoR1-EcoR1*, *EcoR1-Mse1*, *Mse1-Mse1*). Cette amplification est obtenue par PCR en utilisant des amorces ayant des séquences complémentaires à celles des adaptateurs, avec un nucléotide en plus dans le but de préamplifier les fragments d'ADN qui ont la complémentarité avec le nucléotide supplémentaire. $5\mu\text{l}$ de chaque échantillon dilué 10 fois sont employés, auquel on ajoute le mix de préamplification contenant les amorces.

Pour l'amorce complémentaire d'*EcoR1* on ajoute l'adénine et pour l'amorce complémentaire de *Mse1* la cytosine.

2.4.2.4. Amplification sélective

Cette étape est précédée par le marquage de l'amorce *EcoR1* radioactivement par la $\gamma^{33}\text{P}$ d-[ATP] (Amersham Pharmacia Biotech) grâce à l'action de la T4 Kinase. Il s'agit d'amplifier une seconde fois 5 μl de d'ADN digérés, ligaturés et préamplifiés qu'on a dilué 50 fois en utilisant des amorces auxquels les trois nucléotides sont ajoutés.

Les réactions de préamplification et d'amplification sélective s'effectuent grâce à l'action de la Taq DNA polymerase (Life Technologies) dans le thermocycleur Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystem).

2.4.2.5. Séparation sur gel d'acrylamide

Le système permettant de faire migrer les fragments d'ADN amplifiés est constitué principalement de deux plaques, l'une en verre et l'autre en plastique, entre lesquelles sera coulé le gel d'acrylamide à 6% (38 x 50 cm Sequi-Gen® GT Nucleotide Acide Electrophoresis Cell, Bio-RAD). La plaque en plastique qui est en même temps une cuve dans laquelle sera versée le tampon TBE, est traitée à l'huile de silicone pour empêcher le gel de coller sur celle-ci. L'ADN préamplifié est dilué 50 fois, ensuite mélangé à volume égal avec le tampon de charge (98% formamide, 10mM EDTA, bleu de Bromophénol et xylène Cyanole), puis dénaturé pendant 3mn à 90°C. 5 μl de chaque échantillon (représentant une lignée recombinante ou un parent) sont déposés dans chaque puits du gel. La migration de l'ADN dure environ deux heures, puis le gel est récupéré sur du papier Wattman. Ensuite il est couvert d'un film en plastique pour être séché et placé dans une cassette avec un film autoradioactif au-dessus (MP Hyperfilm-Amersham Pharmacia Biotech). Trois jours après, le film est révélé sous la lumière rouge en le plongeant successivement dans une solution de révélateur et de fixateur.

2.4.3. Marquage par la méthode SSR

Les microsatellites sont amplifiés par PCR. L'ADN et les amorces sont dilués dans de l'eau ultra-pure respectivement à 5 ng/ μl et 2.5 μM . Le mélange de PCR est préparé dans un volume réactionnel de 10 μl suivant le protocole présenté par Tang et al. (2002). Si les

fragments d'ADN sont révélés par autoradiographie, ceux-ci sont marqués par incorporation d'ATP₃- α P³³ radioactif qui est ajouté au mélange réactionnel de PCR.

Le BLOTTO ('bovine lacto transfer technique optimizer') est utilisé pour prévenir les liaisons non spécifiques entre protéines et acides nucléiques (De Boer et al. 1995). L'amplification est réalisée dans un thermocycler GeneAmp® 9700 (Perkin-Elmer) comme suit : 1 cycle de 3 min. à 95°C, 30 cycles de 1 min. à 94°C, 2 min. à 55°C et 1.5 min. à 72°C, et enfin 1 cycle de 10 min. à 72°C. Les produits de PCR sont conservés à -20°C.

Les marqueurs présentant du polymorphisme entre les deux parents sont sélectionnés pour l'analyse moléculaire. Comme pour les marqueurs AFLP, les marqueurs microsatellites sont tout d'abord codés en chiffres (1, 0) et ensuite codés en lettres (A, B).

2.4.4. Analyse des profils moléculaires

Le choix des marqueurs destinés à la construction de la carte repose sur les points suivants :

- Un marqueur, par définition, doit être présent chez un seul des deux parents.
- Le marqueur doit être bien visible (présence ou absence) chez le parent et dans une partie des descendants du croisement. L'ambiguïté demeurée dans certaines lignées recombinantes se traduit par une donnée manquante.
- La ségrégation d'un marqueur doit être voisine des proportions mendéliennes dans une génération avancée et homozygote (1:1). Les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation ne sont pas immédiatement exclus. Ils ne sont cependant conservés que jusqu'au moment où l'on observe une hétérogénéité persistante dans la répartition des marqueurs au niveau des groupes de liaison. Dans ce cas de figure, les marqueurs présentant une ségrégation anormale doivent être éliminés, en fonction de leur degré de distorsion calculé, à l'aide d'un test χ^2 .
- L'étape suivante consiste à coder la présence des bandes par « 1 » et l'absence par « 0 ». En second lieu, ce codage (1, 0) est transformé en codage (A, B).

2.4.5. Etablissement des cartes génétiques

Le fichier des résultats codés A, B pour les marqueurs AFLP et SSR est successivement transformé de la forme Excel en forme texte puis en forme *.raw. Après avoir précisé le nombre de lignées recombinantes et le nombre de marqueurs en haut du fichier, le logiciel CARTHAGENE devient ainsi capable de lire les données et de les analyser. Ce logiciel est un

ensemble constitué d'un programme de cartographie. Le logiciel utilise la méthode du maximum de vraisemblance (Lander et al. 1987; Lincoln et al. 1993). Il permet l'analyse des populations en ségrégation des lignées haploïdes doublées (HD), des populations de backcross (BC) ainsi que les lignées recombinantes (RILs). Ce logiciel est développé par l'INRA-Toulouse d'accès gratuit via internet (www.inra.fr/mia/T/CarthaGene)

2.5. Détection des QTLs

La recherche de QTLs a été effectuée grâce au logiciel QTL-Cartographer version 1.16 en utilisant le modèle 6 (CIM : Composit Interval Mapping) (Basten et al. 1999). 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 les 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 & Knott 1992). Ce rapport correspond statistiquement au test χ^2 (Manly & Olson 1999). Dans cette étude, le nombre de marqueurs pour contrôler le fond génétique était fixé à 15 ($n_m = 15$) et la taille de la fenêtre à 15 cM ($w = 15$) pour la recherche de QTLs liés aux caractères physiologique, morphologique et agronomiques des plantules.

2.6. Identification de marqueurs individuels

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

2.7. Analyse de l'expression de gènes

Le profil de 16 gènes potentiellement associés à la tolérance du tournesol au stress hydrique a été examiné sur les quatre lignées recombinantes (C100, C133, C147 et LR54) et leur parents (PAC2 et RHA266) avant et après déshydratation en utilisant RT-PCR quantitatif. Ces quatre lignées ont été choisies en fonction de leurs réponses contrastées au stress hydrique.

2.7.1. prélèvement et broyage des feuilles

Les feuilles sont prélevées au moment de la réalisation des mesures, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C. Elles sont réduites en poudre par microbroyage avant l'extraction. Leur congélation doit impérativement être maintenue durant cette étape.

2.7.2. Extraction d'ARN totaux

Le protocole d'extraction mis au point par Verwoerd et al (1989) a été utilisé. Après le broyage, 3 ml de tampon d'extraction chaud (65°C) [LiCl 0,1 M, Tris 100 mM pH8, EDTA 10 mM, SDS 1%] et 3 ml phénol sont ajoutés pour 1 g de poudre. Après homogénéisation au vortex, le broyat est traité par 1,5 ml de chloroform-isoamylalcool (24:1). Une centrifugation de 5 minutes à 10000 g permet de séparer une phase aqueuse d'acides nucléiques. Les surnageants obtenus sont traités par un volume égal de LiCl 4M durant une nuit entière, en chambre froide. Après une centrifugation d'une demi-heure à 15000 g, les culots obtenus d'ARN totaux sont resuspendus dans 250 µl d'eau DEPC, en présence de 25 µl de NaOAc 3 M pH 5,2 et de 500 µl d'éthanol absolu. Après une nuit à -80 °C et une centrifugation de 30 minutes à 15000 g, les culots sont lavés à l'éthanol 70° puis resuspendus dans 50 µl d'eau DEPC. La pureté et la qualité d'ARN dans les extraits ainsi obtenus sont estimées par mesure de l'absorbance à 260 nm et par électrophorèse sur d'agarose 1,2 %. Il sont conservés à -80°C.

2.7.3. Traitement DNase

Afin d'éliminer toute trace d'ADN dans les préparations d'ARNs, ces dernières sont traitées avec une unité de DNase (référence Promega M610A) pour 10 µg d'acides nucléiques, à 37 °C pendant une demie heure. La DNase est directement dénaturée par un passage de 10 minutes à 65°C, puis éliminée. Les volumes sont ajoutés à 250 µl avec de l'eau DEPC, et traités par 250 µl de phénol–chloroform–isoamylalcool (25:24:1). Après 10 minutes de centrifugation à 10000 g, la phase aqueuse d'ARN est ajoutée à 300 µl, les tubes sont traités par un volume égal de chloroform et centrifugés 10 minutes à 10000 g. Les surnageants récupérés sont additionnés d' 1/10^{ème} de volume de NaOAc 3M pH 5,2 et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à -80°C, les tubes sont centrifugés à 12000 g pendant 30 minutes. Les culots d'ARN sont lavés à l'éthanol 70°, séchés, repris dans 30 µl d'eau DEPC et conservés à -80°C.

Les échantillons sont analysés par spectrophotométrie et migration sur gel d'agrose 1,2 %.

2.7.4. Reverse transcription des ARNs messagers

Les échantillons sont aliquotés à la même concentration (1 à 3 µg d'ARN dans un volume de 12,5 µl), en suivant les mesures spectrophotométriques. La reverse transcription consiste à la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire pour chaque molécule d'ARN messager, réalisée ici avec le kit BD Biosciences K1402. Un µl d'oligo-dT (=0,5 µg) est ajouté à chaque échantillon d'ARN, et l'hybridation se fait à 72°C pendant 2 minutes. Ensuite 6,5 µl de mix RT [tampon 5X – dNTPs 25 mM – recombinant RNase inhibitor (40 unités/µl) – MMLV reverse transcriptase (200 unités/µl) (40:1:0,5:1)] est ajoutés. La 'reverse transcription' se fait à 42°C pendant 1 heure puis les brins sont dénaturés 5 minute à 94°C. La solution d'ADN obtenue est ajustée à 100 µl. Pour chaque échantillon, la proportion d'un messenger va correspondre à son AND complémentaire synthétisé.

2.7.5. RT-PCR quantitative Real-Time

Les amorces spécifiques de gènes ont été fabriquées en utilisant le logiciel 'Primer Express', la version 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Pour les amplifications, 1µl d'ADNc, 10 µl 'SYBER Green Mastermix' (Applied Biosystems), 300 nM de chacune des 2 amorces sont utilisés dans un volume réactionnel final de 20 µl. Le programme PCR consiste en 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C, 40 cycles de [15 seconde à 94°C et 1 minute à 60°C]. Le programme de dissociation était 15 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C suivi par 20 minutes de rampe lente de la température de 60°C à 95°C. Pour analyser les résultats de la PCR quantitative, nous avons opté pour une méthode qui consiste à quantifier le changement du niveau du gène d'intérêt par rapport à une référence. Cette quantification du changement relatif de l'expression des gènes est basée sur la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ décrite par Livak & Schmittgen (2001). Il s'agit de fixer un seuil Ct (threshold Cycle) correspondant au nombre de cycles pour lequel le signal d'amplification est au dessus du bruit de fond, mais la courbe d'amplification restant en phase exponentielle. La comparaison du Ct du gène par rapport au Ct d'un gène témoin (nous avons utilisé *Actin*) permet de connaître le niveau d'expression du gène dans les différentes conditions testées.

CHAPITRE III : Amélioration de la carte génétique ; analyse génétique de l'état hydrique, de l'ajustement osmotique et des caractères agronomiques chez les lignées recombinantes soumises à un déficit hydrique

3.1. Introduction

La sécheresse est considérée comme le facteur le plus limitant de la croissance et de la productivité des plantes cultivées. Le stress hydrique diminue la croissance et la productivité des plantes, en ralentissant le taux de division et d'expansions de cellules principalement en raison d'une perte de turgescence liée à l'altération de l'état hydrique cellulaire. La teneur en eau relative (RWC) aussi bien que le potentiel hydrique (Ψ_w) et ses composantes, potentiel de turgescence (Ψ_t) et potentiel osmotique (Ψ_s), sont les paramètres le plus généralement étudiés pour évaluer l'état hydrique des plantes (Tezara et al. 2002). La diminution du potentiel hydrique foliaire (Ψ_w) et RWC observé en réponse à la contrainte hydrique conduit à une diminution de la capacité photosynthétique chez le tournesol (Tezara et al. 2002). Plusieurs investigations ont montré que l'ajustement osmotique (AO) est souvent associé à la tolérance à la sécheresse (Morgan 1984 ; Ober et al. 2005 ; Clark et al. 1982 ; Morgan 1983 ; Schonfeld et al. 1988, 1989 ; Chimenti et al. 2002, 2005 ; Robin et al. 2003 ; Jongdee et al. 2002). L'ajustement osmotique (AO), c'est à dire l'accumulation 'active' de solutés au niveau cellulaire, est probablement le mécanisme le plus important pour maintenir la turgescence ainsi que l'activité physiologique foliaire (assimilation de carbone...) lorsque le potentiel hydrique (Ψ_w) diminue (Morgan 1984 ; Ober et al. 2005). Chimenti et al. (2002) ont démontré que l'AO contribue à maintenir le rendement du tournesol dans des conditions de sécheresse. 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 à été appliquée dès le stade bouton floral (R1) afin d'évaluer l'effet de la sécheresse sur différents caractères physiologiques tels que l'état hydrique et la photosynthèse chez le tournesol (Flagella et al. 2002 ; Morgan 1984 ; Maury et al. 2000 ; Pankovic et al. 1999). Ces travaux nous ont conduit à appliquer la contrainte hydrique en période pré-anthèse (au stade R1) dans nos expérimentations en conditions contrôlées.

Les travaux de recherches effectués afin de déterminer le contrôle génétique des caractères agronomiques et physiologiques chez le tournesol sont nombreux. Nous pouvons citer par exemple les études réalisées par Pereira et al. (2002) et Hérivé et al. (2001) ou encore le rendement par plante, le poids de 1000-grains, la teneur des graines en huile et la précocité (Mestries et al. 1998; Mokrani et al. 2002; Leon et al. 2001, 2003; Rachid Al-Chaarani et al. 2004). L'objectif à long terme de toutes ces études est l'augmentation du rendement. Le

rendement en graines chez le tournesol, comme chez la plupart des espèces, peut être décomposé en plusieurs facteurs qui sont souvent modifiés par l'environnement et les conditions de cultures (Fick & Miller 1997; Piva et al. 2000; Tuttobene et al. 2000). La période de remplissage des graines est particulièrement critique pour le rendement obtenu (Lopez Pereira et al. 2000). L'héritabilité du rendement en graines 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) (Fick 1978; Mokrani et al. 2002). Les études génétiques montrent que la teneur des graines en huile, ainsi que les composants du rendement sont contrôlés principalement par des gènes à effets additifs (Gupta & Khanna 1982; Bedov 1985 ; Rachid Al-Chaarani et al. 2004).

La précocité de floraison est également un critère important dans les programmes d'amélioration, du fait de la grande sensibilité du rendement aux conditions environnementales notamment de la floraison à la maturité. Par ailleurs, la période de remplissage des graines est critique pour la détermination de leur teneur en huile dans les graines, ce qui peut être perturbé par la sécheresse (Connor & Hall 1997). Jan (1986) montre que la précocité de floraison est un caractère fortement héritable (0.62 à 0.95). 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).

Puisque la tolérance à la sécheresse et le rendement sont contrôlés par les loci génétiques séparés, l'amélioration de la tolérance à la sécheresse implique l'identification et le transfert des traits physiologiques responsables de la tolérance à la sécheresse aux cultivars productifs et agronomiquement acceptables (Chimenti et al. 2002). Les outils moléculaires et l'analyse QTL facilitent l'identification des zones génomiques contrôlant des caractères liés à la tolérance à la sécheresse et également le transfert de ces QTLs par le processus de sélection assistée par marqueur (SAM).

La technique AFLP a été employée dans l'établissement de plusieurs cartes génétiques chez le tournesol (Flores Berrios et al. 2000 ; Rachid Al-Chaarani et al. 2004). Cependant, les marqueurs 'AFLP' doivent être complétés avec d'autres types de marqueurs permettant d'établir des correspondances entre les différentes cartes génétiques. Par conséquent, le

développement d'une carte moléculaire avec des marqueurs publics et partagés, des marqueurs co-dominants 'SSRs' est nécessaire pour l'établissement de cartes avec une nomenclature universelle. Plusieurs centaines de marqueurs de SSR ont été développés jusqu'ici (Hongtrakul et al. 1998 ; Paniego et al. 2002 ; Yu et al. 2002; Tang et al. 2002); et une première carte génétique pour le tournesol basée sur 459 SSR, a été construite par Tang et al. (2002). Cette carte de référence est actuellement utilisée pour l'analyse comparative de QTLs de différentes populations en utilisant l'information fournie par les marqueurs SSRs communs.

L'amélioration du rendement dans des conditions de contrainte hydrique consiste à combiner des QTLs responsables de la tolérance à la sécheresse avec des QTLs impliqués dans l'élaboration du rendement potentiel. A notre connaissance, des QTLs, contrôlant l'état hydrique et différents caractères impliqués dans l'élaboration du rendement du tournesol en condition de déficit hydrique n'ont pas été étudiés à ce jour chez le tournesol. La mise en évidence de co-localisations de QTLs contrôlant la réponse au stress hydrique avec des QTLs contrôlant les caractères liés à la productivité nous permettra d'évaluer les bases génétiques de la tolérance à la sécheresse et la productivité chez le tournesol.

Dans ce cadre, cette partie de mon travail de recherche a consisté à (1) développer une carte génétique intégrée et à haute densité, en utilisant des marqueurs 'SSR' et 'AFLP' chez une population de 123 LIRs issues du croisement entre 'PAC2' et 'RHA266', (2) identifier des QTLs impliqués dans la variation génétique des caractères physiologiques associés à la tolérance au stress hydrique, (3) identifier des QTLs de caractères agronomiques en situation de contrainte hydrique dans différents environnements : en conditions contrôlées (serre) et naturelles (champ).

L'amélioration de notre carte génétique repose sur l'utilisation des marqueurs SSR et la standardisation des groupes de liaisons par rapport à la carte référence du tournesol (Tang et al. 2002).

Ces résultats ont fait l'objet des deux articles suivants :

1) 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 Science 172: 773-787

2) **Poormohammad Kiani S, Maury P, Nouri L, Sarrafi A, Grieu P (2007)** QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Science (Soumis)*

Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments

S. Poormohammad Kiani ^{a,c}, P. Talia ^b, P. Maury ^c, P. Grieu ^c, R. Heinz ^b,
A. Perrault ^a, V. Nishinakamasu ^b, E. Hopp ^b, L. Gentzbittel ^a,
N. Paniego ^b, A. Sarrafi ^{a,*}

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

^bInstituto de Biotecnología, INTA Castelar, CC 25, (1712) Castelar, Argentina

^cUMR 1248 INRA-INP/ENSAT, Agrosystèmes Cultivés et Herbagers (ARCHE), BP 52627, F-31326 Castanet Tolosan, France

Received 9 August 2006; received in revised form 11 December 2006; accepted 14 December 2006

Available online 20 December 2006

Abstract

The goals of the present research were to develop an integrated and high density genetic-linkage map using simple sequence repeat (SSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers on a population of 123 F9 recombinant inbred lines (RILs) and to identify QTLs involved in the genetic control of water status traits and osmotic adjustment under well-watered and water-stressed conditions. A map with 304 AFLP and 191 SSR markers with a mean density of one marker per 3.7 cM was constructed. Our physiological experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot consisted of water treatments (well-watered and water-stressed) and subplot contained 78 RILs and parental lines. Water deficit was induced in 45-day-old plants at stage near flower bud formation for a period of 12 days. After 12 days of differential watering, water status traits (leaf water potential, relative water content, turgor potential, osmotic potential and osmotic potential at full turgor) as well as osmotic adjustment (OA) were evaluated. The effects of water treatment, RIL and 'RIL × water treatment' were significant. QTL analysis showed that several putative genomic regions are involved in the total variation of water status traits under two water treatments. Among 24 QTLs detected under well-watered conditions, 5 (about 21%) were also detected in the water-stressed treatment. The percentage of phenotypic variance explained by the QTLs ranged from 6% to 29%. Among the eight QTLs detected for OA, four of them (50%) were co-located with the QTLs for turgor potential (Ψ_t) on linkage group 4 (*OA.4.1*), with the QTL for osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in well-watered RILs on linkage group 12 (*OA.12.2*), and with QTLs of several traits on linkage group 5 (*OA.5.1* and *OA.5.2*). The four other QTLs for OA (50%) were very specific. The major QTL for OA on linkage group 5 accounted for 29% of the phenotypic variation, which is overlapped also with the QTLs for several water status traits. However, the QTLs were identified in greenhouse conditions and the usefulness of these QTLs for marker-assisted selection should therefore be evaluated under field conditions, and validated in other genetic backgrounds.

© 2007 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Sunflower (*Helianthus annuus* L.); Water stress; Quantitative trait loci; Osmotic adjustment; Water status

1. Introduction

Drought, salinity and low temperature constitute some of the most serious limitations to crop growth and productivity. Water stress decreases plant growth and productivity, by slowing the 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. Relative water content (RWC) as well as water potential (Ψ_w) and its components, turgor potential (Ψ_t) and osmotic potential (Ψ_s), are the parameters most commonly used to assess plant water status [1]. Decreased RWC and leaf water potential (Ψ_w) inhibits photosynthesis capacity of sunflower [1].

Drought tolerance has been considered as a valid breeding target to partially compensate for the loss in yield. The phenotypic traits associated directly with drought tolerance are not well defined. However, several investigations noted that osmotic adjustment is associated with drought tolerance

* Corresponding author. Tel.: +33 5 62193580; fax: +33 5 62193581.

E-mail address: sarrafi@ensat.fr (A. Sarrafi).

[2–12]. Turgor maintenance by mean of increases in cell solute concentration process, called osmotic adjustment (OA), is probably the most important mechanism for maintaining physiological activity as water potential (Ψ_w) falls [2,3]. OA contributes to drought tolerance in crop plants including sunflower [9]. A large variation for OA, and its contribution to yield maintenance under drought conditions was demonstrated in sunflower genotypes [9].

According to Flagella et al. [13], flower bud formation/appearance (R1) and flowering are critical growth stages for water stress in sunflower. Many researchers have imposed water stress at flower bud formation stage (R1) in order to evaluate the effect of water stress on physiological traits such as plant water status and photosynthesis in sunflower [1,14,15]. Furthermore, using different F3 families, Chimenti et al. [9] demonstrated that OA, a parameter directly related to drought tolerance, contributes to yield maintenance of sunflower under pre-anthesis drought conditions, when leaf expansion and root growth are not yet ceased. Based on these information, water stress was imposed in stage near R1 in the present study.

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 [9]. Drought tolerance is complex, and may be associated with several traits such as rooting depth, antioxidant production and OA [9,16]. Molecular tools facilitate the identification of genomic locations controlling traits related to drought tolerance using quantitative trait loci (QTLs). Identification of QTLs for drought tolerance traits using a molecular marker map, not only allows genetic dissection of drought tolerance, but also expedites transfer of QTLs through a process known as marker-assisted selection [17].

Sunflower is a diploid plant with an estimated haploid genome size of about 3000 Mb and $2n = 2x = 34$ chromosomes [18]. Species with large genomes like sunflower require techniques that provide high numbers of markers [19]. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is considered to be an efficient marker technology due to its high number of polymorphic markers produced per PCR reaction [19]. This technique has been used in the establishment of several genetic maps in sunflower [20,21]. However, AFLP markers need to be complemented with anchor markers to better cross-reference different genetic maps. To this aim the development of a molecular marker linkage map based on openly shared, single- or low-copy co-dominant DNA markers, e.g. simple sequence repeats (SSR), is crucial for cross-referencing maps and establishment of a consensus universal linkage group nomenclature. Several hundreds of SSR markers have been developed so far [22–25]; and a molecular genetic-linkage map for sunflower based on 459 SSR, has been constructed by Tang et al. [25], which is the first reference map of sunflower based on single- or low-copy public SSR markers. This reference map is used for comparative analysis between QTL data of different mapping populations using the information provided by SSRs common to the maps being compared.

QTLs have been reported for agronomical traits [21,26,27], resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plasmopara halstedii*, *Phoma macdonaldii* [21,28,29], germination traits [30] and physiological traits [31] in sunflower. However, the identified QTLs for traits reported in sunflower cannot be widely used due to the lack of SSR markers to cross-reference traits and markers that have been mapped. To our knowledge, QTL mapping of water status traits and osmotic adjustment associated with drought tolerance has not been investigated in sunflower.

The goals of the present research were: (1) to develop an integrated and high density genetic-linkage map from our previously published map [21], using SSR and AFLP markers on a population of 123 F9 recombinant inbred lines (RILs) coming from the cross between ‘PAC2’ and ‘RHA266’, (2) to identify QTLs involved in genetic variation of water status traits and osmotic adjustment under well-watered and water-stressed conditions.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and experimental design

The mapping population (recombinant inbred lines, RILs) used in the present experiment was developed through single seed descent from F2 plants derived from a cross between ‘PAC2’ and ‘RHA266’. Both parental lines (PAC2 and RHA266) are public inbred lines of sunflower [32]. RHA266 was obtained from a cross between wild *H. annuus* and *Peredovik* by USDA and PAC2 is an INRA-France inbred line from a cross between *H. petiolaris* and ‘HA61’ [33]. RHA266 is more resistant to downy mildew with higher values for yield, 1000-grain weight and oil percentage compared with PAC2 [21,33]. PAC2 is highly resistant to *S. sclerotiorum* [34]. In a previous work, the map of ‘PAC2 × RHA266’ RILs was constructed with 333 AFLP and 34 SSRs in our department, and the QTLs for yield-related traits under well-watered conditions were mapped [21]. The present work was undertaken to improve this map and to use it to identify the QTLs for drought-adaptive traits.

The recombinant inbred lines (RILs) and their parents were grown in the greenhouse under controlled conditions. Plants were individually grown in plastic pots (4 l) containing a mixture of 40% soil, 40% compost and 20% sand. Temperature was maintained at $25/18 \pm 2$ °C (day/night) and relative humidity at about $65/85 \pm 5\%$. Supplementary light was provided to obtain 16-h light period. The experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot consisted of water treatments (well-watered and water-stressed) and subplot consisted of genotypes (RILs and parental lines). The 78 RILs and their two parents were randomized within each treatment-block combination.

2.2. Water deficit treatments

In order to simulate natural water deficit conditions similar to field, a progressive water stress from mild stress to severe stress was imposed on 45-day-old plants at stage near flower

bud formation (R1) [35] for a period of 12 days, so that full expression of solute accumulation potential occurs before plants wilt completely. 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. After 12 days of differential watering, plants were not watered the following day and water status traits measurements were made at midday. According to Tezara et al. [1], 67% of field capacity is considered as mild stress and 33% is considered as severe stress in sunflower.

2.3. Water status traits and osmotic adjustment measurements

The upper most fully expanded leaves were used for all water status measurements, and observations were made between 10:00 h and 14:00 h. Leaf water potential (Ψ_w) was measured with a pressure chamber (Model 3000, Soil Moisture Equipment Crop, Santa Barbara, CA, USA; [36]) on the last fully expanded leaf for each individual plant. After the measurement of Ψ_w , RWC was determined ($RWC = F_w - D_w / T_w - D_w$), where F_w is fresh weight and T_w is turgid weight after 24 h rehydration at 4 °C in a dark room with the petioles placed 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 (lamina with midrib vein) and the remaining half (without the midrib vein) was used for measurement of leaf osmotic potential (Ψ_s). Leaf turgor potential was also determined ($\Psi_t = \Psi_w - \Psi_s$). Both leaf osmotic potential (Ψ_s) and 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 potentials (Ψ_s) were 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 is the temperature in Kelvin, d is the density of water at temperature T and c is the concentration of osmotically-active solutes, given by the osmometer [3]. OA is the accumulation of solutes induced by water stress, which was calculated using the rehydration method [7]. According to this method, when RWC reaches a value, where wilting occurs in the test plants, plants are rehydrated and samples are collected after the plants regain full turgor. Then OA is 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.

2.4. Statistical analysis

Water status traits data were analyzed using the SAS PROC GLM [37]. A mixed model with water treatment as fixed effect,

and genotypes (RILs and parents) as random effect, was used for analysis of the experimental data. Phenotypic and genetic correlations between traits in each of the water conditions and between lines for the same traits across the conditions were determined using SAS PROC CORR [37]. The genetic correlation between different traits was estimated as $r_{g(xy)} = \text{Cov}_{g(x,y)} / (V_{g(x)} \times V_{g(y)})^{0.5}$, where Cov_g is the genetic covariance between traits x and y and V_g is genetic variance.

2.5. SSR marker polymorphism screening and genotyping

We screened the parental lines (PAC2 and RHA266) for polymorphisms with 190 'SSL' and 'SSU' SSR markers (GIE CARTISOL, France), 507 'ORS' SSR markers from the SSR database [25,38] and 463 'HA' SSR markers developed by INTA [23]. All SSR markers are public and can be provided upon request. The genomic DNA of PAC2, RHA266 and RILs was isolated according to the method of extraction and purification presented by Fulton et al. [39]. The electrophoresis was performed using denaturing polyacrylamide gels and silver-staining and/or SYBR gold detection protocols (Molecular Probes, Eugene, Ore.) [23] or by multiplex PCR assays using modified forward primers by adding fluorophores (6FAM, HEX and NED) according to the method described by Tang et al. [38]. PCR fragments were resolved using electrophoresis through an ABI Prism 377 DNA analyzer (Applied Biosystems). Fragment sizing was done using the GeneScan Filter Set D, the ROX 500 internal-lane standard (Applied Biosystems; ROX, 6-carboxy-X-rhodamine) and the GeneScan 3.5 programme (Applied Biosystems). Genotyper 3.6 (Applied Biosystems) was used to score SSR alleles.

2.6. Map construction and QTL analysis

The new genetic map was constructed using 123 F9 recombinant inbred lines (RILs) coming from the cross between 'PAC2' \times 'RHA266'. SSR genotyping assays were performed, as described above, by conventional or multiplexing six to nine SSR markers per lane. Genotyper 3.6 was used for allele scoring and the map was constructed using Mapmaker 3.0 [40] and CarthaGene 0.999 [41]. Chi-square-tests were performed for segregation distortion of each locus. Loci were assembled into groups using likelihood odds (LOD) ratios with a LOD threshold of 4.0 [21,27,28,33] and a maximum recombination frequency threshold of 0.35. Multiple locus order estimates were produced for each linkage group using CarthaGene 0.999. The likelihoods of different locus orders were compared and the locus-order estimate with the highest likelihood was selected for each linkage group. The Kosambi [42] mapping function was used to calculate map distances (cM) from recombination frequencies. Mapchart 2.1 was used for graphical presentation of linkage groups and map position of the SSR and AFLP markers. QTL mapping of the studied traits was performed by composite interval mapping (CIM) conducted with the programme QTL Cartographer, version 1.16 [43] using mean values of three replications for each RIL in each water treatment. 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). A LOD threshold of 3.0 was used for considering a QTL significant [21,27,28]. QTL results of different traits from two water treatment conditions 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 [44]. Additive effects of the detected QTLs were estimated with the Zmapqtl programme [43]. The percentage of phenotypic variance (R^2) explained by the QTLs was estimated at the peak QTL position by QTL Cartographer [43].

3. Results

3.1. Phenotypic variation among genotypes

Analysis of variance of the 78 recombinant inbred lines and their parents ('PAC2' and 'RHA266') showed highly significant genotype (RIL) and water stress effects for all the traits studied (Table 1). 'RIL \times water treatment' was also significant for all the traits except for turgor potential (Ψ_t) indicating a difference among RILs in the responses to drought. There was also significant difference among RILs for OA. Phenotypic performance of RILs and parents for the measured traits under the two water treatment conditions are summarized in Table 2. The differences between parents were not significant for water status traits either in well-watered or in water-stressed plants. Differences between the mean of RILs (\bar{X}_{RIL}) and the mean of their parents (\bar{X}_P) were also not significant. In general, the range of variation was higher for the water-stressed RILs compared to the well-watered one. For example, Ψ_w varied from -0.97 MPa to -0.58 MPa and the RWC from 80.4% to 91.7% in well-watered condition, whereas the same traits varied, respectively, from -2.53 MPa to -1.30 MPa and from 59.5% to 80.7% in water-stressed RILs. The values obtained for all traits are higher for well-watered RILs compared to water-stressed ones. As an example, the mean of RWC was 86.1% in well-watered RILs

and 71.2% in water-stressed one. Genetic gain, presented as the difference between the best parent (BP) and the best RIL (BRIL), was significant for all studied traits except for osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in water-stressed conditions. Significant difference was also observed between the best parent (BP) and the best RIL (BRIL) in well-watered plants for turgor potential (Ψ_t). The difference between the mean of parents (\bar{X}_P) and the mean of 10% selected RILs ($\bar{X}_{10\%SRIL}$) was significant for RWC and turgor potential (Ψ_t) in water-stressed conditions and for turgor potential (Ψ_t) in well-watered conditions (Table 2). A large genetic variation was observed for OA resulting in significant differences between the best RIL and the best parent, as well as between the 10% selected RILs and the mean of the parents (Table 2).

Phenotypic and genetic correlations among different water status traits under the two water treatments and also between OA and water status traits in water-stressed RILs are presented in Table 3. All phenotypic correlations are significant in both water treatments showing the large association between water status traits. Genetic correlations are also significant among different traits except between RWC, turgor potential (Ψ_t) and osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in well-watered conditions (Table 3). This indicates the influence of environment on the relationship between these traits. OA is negatively correlated with all traits except with turgor potential (Ψ_t) under water-stressed conditions, which shows the accumulation of solutes within the plants in response to a lowering RWC and leaf water potential (Ψ_w); resulting a positive effect of OA on turgor maintenance.

3.2. Linkage map

The marker distribution among the linkage groups in our map is presented in Table 4. The map consisted of 495 markers (304 AFLP and 191 SSR) placed in 17 linkage groups. This map incorporates 157 new microsatellite markers compared with our previous published map [21]; most of them are of the dinucleotide type (only 22% of them are

Table 1
Results of analysis of variance (mean squares) for water status traits and osmotic adjustment (OA) in a population of sunflower recombinant inbred lines (RILs) and their two parents grown under two water treatments

Source of variation	d.f.	RWC	Ψ_w	Ψ_s	Ψ_t	Ψ_{sFT}	OA ^a
Block	2	101.022 ^{NS}	0.893*	0.481 ^{NS}	0.093 ^{NS}	0.325 ^{NS}	0.066 ^{NS}
Water treatment	1	26,084.832***	123.426***	49.03***	16.867**	5.163**	–
Block \times water treatment (E1)	2	15.417 ^{NS}	0.039 ^{NS}	0.032 ^{NS}	0.060 ^{NS}	0.033 ^{NS}	–
Genotype (RIL)	77	50.880***	0.093**	0.119***	0.028*	0.032***	0.044***
RIL \times water treatment	77	41.739*	0.079*	0.084**	0.017 ^{NS}	0.022**	–
Error (E2)	308	29.067	0.058	0.056	0.021	0.0139	–
Total	467						

RWC, relative water content (%); Ψ_w , leaf water potential (MPa); Ψ_s , osmotic potential (MPa); Ψ_t , turgor potential (MPa); Ψ_{sFT} , osmotic potential at full turgor (MPa) and OA, osmotic adjustment (MPa); NS: non-significant.

^a 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 RILs in three blocks (error mean square was 0.022).

* Significant at 0.05 probability level.

** Significant at 0.01 probability level.

*** Significant at 0.001 probability level.

Table 2
Genetic gain for relative water content (RWC), leaf water potential (ψ_w), osmotic potential (ψ_s), turgor potential (ψ_t) and osmotic potential at full turgor (ψ_{sFT}) under well-watered (WW) and water-stressed (WS) conditions; and for osmotic adjustment (OA)

Item	RWC		ψ_w		ψ_s		ψ_t		ψ_{sFT}		OA
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	
'PAC2' (P1)	88.2	71.5	-0.79	-1.62	-1.14	-1.61	0.35	-0.01	-0.86	-0.92	0.06
'RHA266' (P2)	86.2	69.4	-0.75	-1.66	-1.14	-1.69	0.39	0.03	-0.86	-0.95	0.09
P1 – P2	2.00 ^{NS}	2.1 ^{NS}	-0.04 ^{NS}	0.04 ^{NS}	0.00 ^{NS}	0.08 ^{NS}	0.04 ^{NS}	0.04 ^{NS}	0.00 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.03 ^{NS}
$\bar{X}_P = (P1 + P2)/2$	87.2	70.4	-0.77	-1.64	-1.14	-1.65	0.37	0.01	-0.86	-0.93	0.07
\bar{X}_{RIL}	86.1	71.2	-0.78	-1.80	-1.20	-1.84	0.42	0.04	-0.89	-1.10	0.21
RIL range	80.4/91.7	59.5/80.7	-0.97/-0.58	-2.53/-1.30	-1.43/-1.05	-2.69/-1.30	0.24/0.75	-0.24/0.39	-1.12/-0.74	-1.49/-0.87	-0.04/0.61
$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	1.10 ^{NS}	0.8 ^{NS}	-0.01 ^{NS}	-0.16 ^{NS}	-0.06 ^{NS}	-0.19 ^{NS}	0.05 ^{NS}	0.03 ^{NS}	-0.03 ^{NS}	-0.16 ^{NS}	0.13 ^{NS}
BRIL	91.7	80.7	-0.58	-1.30	-1.05	-1.30	0.75	0.39	-0.74	-0.87	0.61
GGB = BRIL – BP	3.5 ^{NS}	9.2*	0.17 ^{NS}	0.32*	0.09 ^{NS}	0.31*	0.36*	0.36*	0.12 ^{NS}	0.05 ^{NS}	0.52*
$\bar{X}_{10\%SRIL}$	90.4	78.7	-0.63	-1.49	-1.07	-1.52	0.56	0.25	-0.77	-0.92	0.43
GG10% = $\bar{X}_{10\%SRIL} - \bar{X}_P$	3.2 ^{NS}	8.3*	0.14 ^{NS}	0.15 ^{NS}	0.07 ^{NS}	0.13 ^{NS}	0.19*	0.24*	0.09 ^{NS}	0.01 ^{NS}	0.36*

The significant differences are presented as bold-face. 'PAC2' (P1) and 'RHA266' (P2): parental lines; \bar{X}_P : mean of two parental lines; \bar{X}_{RIL} : mean of recombinant inbred lines (RILs); BRIL: the best RIL; BP: the best parent; $\bar{X}_{10\%SRIL}$: the mean of the top 10% selected RILs; GGB: genetic gain when the best RIL is compared with the best parent; GG10%: genetic gain when the mean of the top 10% selected RILs is compared with the mean of the parents; NS: non-significant.

* Significant at 0.05 probability level.

trinucleotide repeats). Each linkage group was numbered according to the sunflower reference map [25] and presumably corresponds to one of the 17 chromosomes in the haploid sunflower genome ($x = 17$). Eighty one SSR markers out of the 191 were developed and/or genotyped by Instituto de Biotecnología, INTA, Argentina (a database, listing the 51 SSR markers developed by INTA is presented as **Supplemental material data**). Our linkage map is constructed by the use of a minimum LOD score of 4.0 and a maximum recombination value of 0.35. The total map length is 1824.6 cM with mean density of one marker per 3.7 cM (Table 4), which has a density close to sunflower reference map constructed using 459 SSRs with mean density of one marker per 3.1 cM [25]. However, our map is denser than some of the maps constructed for sunflower so far. For example, the DALP/AFLP [45] and RFLP/AFLP [27,28] maps contain 305, 290 and 216 markers, respectively. These maps have 2168.6, 2318.0 and 1937.5 cM length with the mean density of one marker per 6.1, 8 and 9 cM, respectively.

3.3. QTL analysis

The map position and characteristics of QTLs associated with the studied traits under two water treatments are described in Tables 5 and 6. The QTLs were designated as follows: 'LWP' for leaf water potential, 'RWC' for relative water content, 'OP' for osmotic potential, 'TP' for turgor potential, 'OPF' for osmotic potential at full turgor and 'OA' for osmotic adjustment, followed by 'WW' or 'WS' for well-watered or water-stressed conditions, and corresponding linkage group and the number of QTLs in the group. For an easier overview of overlapping QTLs between traits and growth conditions, an image of all QTL regions are presented in Fig. 1.

Three to eight QTLs were found for each trait. Generally the number of QTLs identified under water-stressed conditions is more than under well-watered conditions. QTLs explained from 6% to 29% of the total phenotypic variance of the traits (R^2) but a large phenotypic variation was also explained when considering cofactors 'TR²' (Tables 5 and 6). Both parental lines contributed to the expression of the different target traits. Overlapping QTLs were found for different traits under each water condition (Tables 5 and 6 and Fig. 1). Under well-watered conditions, two overlapping QTLs were found on linkage group 6 and one overlapping QTL was found on each of linkage groups 8 and 9 (Table 5). Under water-stressed conditions, overlapping QTLs were found on linkage groups 1, 4, 5, 7 and 16 for different traits indicating clusters of QTL (Table 6). Eight QTL were found for OA on linkage groups 2, 4, 5, 12 and 13. Four of them were also detected for related water status traits on linkage groups 4, 5 and 12 (Table 6). In the present study, among the 24 QTLs detected under well-watered conditions, 5 (about 21%) were also detected under water-stressed conditions (Table 7). The number of common QTLs under two water regims was zero for ψ_w and ψ_s , one for ψ_t (linkage group 4), two for ψ_{sFT} (linkage groups 1 and 16) and also two for RWC (linkage groups 5 and 17).

Table 3
Phenotypic (P) and genetic (G) correlation coefficients between relative water content (RWC), leaf water potential (Ψ_w), osmotic potential (Ψ_s), turgor potential (Ψ_t) and osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) in two water treatments and also between osmotic adjustment (OA) and water status traits in water-stressed recombinant inbred lines (RILs) and their two parents (PAC2 and RHA266)

	RWC		Ψ_w		Ψ_s		Ψ_t		Ψ_{sFT}	
	P	G	P	G	P	G	P	G	P	G
Well-watered										
Ψ_w	0.31***	0.53***								
Ψ_s	0.35***	0.18**	0.58***	0.97***						
Ψ_t	0.14*	0.13 ^{NS}	0.54***	0.43***	-0.37***	-0.19**				
Ψ_{sFT}	0.19**	0.04 ^{NS}	0.42***	0.98***	0.67***	0.88***	-0.21***	-0.06 ^{NS}		
Water-stressed										
Ψ_w	0.72***	0.72***								
Ψ_s	0.75***	0.86***	0.89***	0.99***						
Ψ_t	0.46***	0.98***	0.75***	0.84***	-0.29***	-0.90***				
Ψ_{sFT}	0.46***	0.49***	0.65***	0.84***	0.71***	0.80***	-0.18**	-0.54***		
Water-stressed vs. well-watered										
OA ^a	-0.48***	-0.59***	-0.57***	-0.74***	-0.62***	-0.72***	0.15*	0.58***	-0.80***	-0.91***

^a The correlation between OA and water status traits was estimated in water-stressed conditions.

* Significant at 0.05 probability level.

** Significant at 0.01 probability level.

*** Significant at 0.001 probability level.

4. Discussion

4.1. Phenotypic variation among genotypes

Water stress affected plant water status and caused the accumulation of solutes (osmotic adjustment) in our study. In addition, the water treatment responses were affected by significant ‘genotype \times treatment’ interaction, suggesting that response to water status by a given genotype in relation to other genotypes varies between water treatments (Table 1). Non-significant differences between the means of the RILs and the mean of the parents showed that the RILs used in this study are

Table 4
Marker distribution among the linkage groups

Linkage groups	AFLP marker	SSR marker	Total marker number	Length (cM)	Average distance (cM)
LG1	13	6	19	74.5	3.9
LG2	14	12	26	101.2	3.9
LG3	16	8	24	75.7	3.2
LG4	20	7	27	94.9	3.5
LG5	16	10	26	102.6	3.9
LG6	13	5	18	81.3	4.5
LG7	15	5	20	63.8	3.2
LG8	16	14	30	114.9	3.8
LG9	26	14	40	134.8	3.4
LG10	44	20	64	174.7	2.7
LG11	14	6	20	78.0	3.9
LG12	16	13	29	98.2	3.4
LG13	10	7	17	92.2	5.4
LG14	18	16	34	138.3	4.1
LG15	11	12	23	88.8	3.9
LG16	20	26	46	170.3	3.7
LG17	22	10	32	139.8	4.4
Total	304	191	495	1824.6	3.7

representative of possible genotypic combinations of the cross ‘PAC2’ \times ‘RHA266’ (Table 2). A wide range in variation was observed for all traits in the two water treatments. Genetic gain (positive transgressive segregation) presented as the differences between the best parent (BP) and the best RIL (BRIL) or between the mean of the top 10% selected RILs ($\bar{X}_{10\%SRILs}$) and the mean of the parents (\bar{X}_P), was significant for some of the traits (Table 2). Transgressive segregation would be the result of the accumulation of positive alleles coming from different parental lines. The positive and negative signs of additive effect at the different loci (Tables 5 and 6) indicate the contribution of both parental lines and confirm the transgressive segregation observed at the phenotypic level. Transgressive segregation for morphological and agronomical traits [21] and also for RWC and predawn leaf water potential under well-watered conditions [31] has been reported in the RILs of the same cross.

4.2. Linkage map and QTL analysis

In our improved map the markers were distributed throughout linkage groups, allowing a complete cross-reference to the public SSR/INDELs and SSR/SNP maps [46,47]. In addition, the incorporation of 157 new SSR into our ‘PAC2’ \times ‘RHA266’ map allowed some gaps to be filled relative to our previous published map, which increase the power of QTL detection for water status traits and OA in this study. Furthermore, our map complements the public SSR/INDELs and SSR/SNP map [46,47] as a genetic framework for quantitative and qualitative trait analysis for *Helianthus annuus*.

The QTLs identified in the present study underlined that several putative genomic regions are involved in the response of water status traits under two water treatments (Tables 5 and 6). The sign of additive effects shows that alleles having positive

Table 5

Map position and effect of QTLs detected in RILs for leaf water potential (Ψ_w), relative water content (RWC), osmotic potential (Ψ_s), turgor potential (Ψ_t) and osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) under well-watered conditions

Trait	QTL	Linkage group	Marker to the left of LOD peak	Position (cM) ^a	LOD	Additive effect	R^{2b}	TR^{2c}
Ψ_w (MPa)	<i>LWP.WW.6.1</i>	6	E35M49_5	23.3	4.61	0.036	0.16	0.59
	<i>LWP.WW.8.1</i>	8	HA3513	0.0	5.32	-0.038	0.18	0.59
	<i>LWP.WW.12.1</i>	12	SSU100	90.0	3.05	-0.027	0.09	0.57
RWC (%)	<i>RWC.WW.5.1</i>	5	ORS523_1	89.3	7.51	-1.441	0.25	0.85
	<i>RWC.WW.6.1</i>	6	E32M47_14	0.0	3.27	1.193	0.19	0.84
	<i>RWC.WW.6.2</i>	6	E35M49_5	21.3	5.75	0.950	0.10	0.76
	<i>RWC.WW.10.1</i>	10	E37M49_5	67.6	4.95	-1.080	0.08	0.75
	<i>RWC.WW.17.1</i>	17	E41M59_8	8.5	7.58	-1.075	0.15	0.76
	<i>RWC.WW.17.2</i>	17	E35M62_5	42.6	3.39	-0.738	0.07	0.76
Ψ_s (MPa)	<i>OP.WW.4.1</i>	4	E32M49_28	72.3	5.19	0.032	0.09	0.77
	<i>OP.WW.9.1</i>	9	ORS1009	9.6	3.19	-0.024	0.06	0.78
	<i>OP.WW.14.1</i>	14	HA293	29.9	4.52	-0.028	0.09	0.79
	<i>OP.WW.16.1</i>	16	E38M48_7	163.5	5.45	-0.031	0.11	0.79
	<i>OP.WW.17.1</i>	17	E41M62_19	86.7	3.52	0.031	0.08	0.80
Ψ_t (MPa)	<i>TP.WW.2.1</i>	2	E38M60_10	7.4	5.77	-0.034	0.13	0.69
	<i>TP.WW.4.1</i>	4	E41M62_6	0.0	3.29	0.018	0.06	0.79
	<i>TP.WW.6.1</i>	6	E32M47_14	2.0	9.86	0.042	0.24	0.89
	<i>TP.WW.6.2</i>	6	E41M48_2	18.5	3.61	0.023	0.08	0.72
	<i>TP.WW.8.1</i>	8	HA3513	0.0	5.12	-0.025	0.09	0.77
	<i>TP.WW.12.1</i>	12	HA3073	23.9	5.72	-0.026	0.10	0.77
Ψ_{sFT} (MPa)	<i>OPF.WW.1.1</i>	1	E33M48_16	32.6	4.36	-0.029	0.15	0.63
	<i>OPF.WW.9.1</i>	9	ORS1009	10.0	4.11	-0.028	0.14	0.68
	<i>OPF.WW.12.1</i>	12	E38M48_6	14.4	3.16	-0.021	0.08	0.62
	<i>OPF.WW.16.1</i>	16	ORS899	18.7	4.82	0.028	0.14	0.64

^a From the north of linkage group.

^b Percentage of individual phenotypic variance explained. Value determined by QTL Cartographer, version 1.16 [43].

^c Percentage of phenotypic variance explained by the QTLs given all the covariants. Value determined by QTL cartographer, version 1.16 [43].

effects for QTLs come from both ‘PAC2’ and ‘RHA266’ parents (Tables 5 and 6). Their recombination resulted in RILs with higher values than those of their parents, which is explained by various positive gene effects having been accumulated (Table 2). The percentage of phenotypic variance explained by the QTLs (R^2) ranged from 6% to 29%. The relatively low number of RILs used in our study, may negatively influence the accuracy of the calculated QTL effects and the power to detect QTL with small effect [48]. This was, to some degree, compensated by the higher precision of the phenotyping and the use of our new improved saturated map with 495 markers. Moreover, in our controlled greenhouse conditions it was very labor intensive to monitor plant water status on all 468 pots during the stress period and to measure the various traits on the 78 RILs under two water conditions in all three blocks (468 plants).

In several cases, one QTL was found to be associated with more than one trait. Under well-watered conditions, the overlapping QTLs were located on: linkage groups 6 (two regions) for RWC and Ψ_t (*RWC.WW.6.1* and *TP.WW.6.1*) and for Ψ_w , RWC and Ψ_t (*LWP.WW.6.1*, *RWC.WW.6.2* and *TP.WW.6.2*); linkage group 8 for Ψ_w and Ψ_t (*LWP.WW.8.1* and *TP.WW.8.1*); and linkage group 9 for Ψ_s and Ψ_{sFT} (*OP.WW.9.1* and *OPF.WW.9.1*) (Fig. 1). Under water-stressed condition overlapping QTLs controlling Ψ_w , Ψ_s and Ψ_{sFT} (*LWP.WS.1.1*, *OP.WS.1.1* and *OPF.WS.1.1*) were found on

linkage group 1. This region was also detected for Ψ_{sFT} under well-watered conditions (*OPF.WW.1.1*). Beside these QTLs, additional QTLs controlling several traits under water-stressed conditions were located on: linkage groups 5 at two regions for Ψ_w , RWC, Ψ_{sFT} and OA; linkage group 7 for Ψ_w and RWC; and linkage group 16 at two regions identified for Ψ_w , RWC, Ψ_s and Ψ_{sFT} (Table 6 and Fig. 1). These overlapping QTLs indicate the existence of a common genetic base for water status traits, which may be due to pleiotropic effects or tightly linked loci controlling these traits. Plant water status traits are physiologically related and co-location of QTLs in our study showed the genetic basis of trait association. The only other effort in mapping QTLs of RWC and predawn leaf water potential in well-watered condition using a AFLP map of the same cross [31], showed only one QTL for RWC on linkage group 5 (interval 15–25 cM, ‘ $R^2 = 9.8\%$ ’). In our study, we confirmed this QTL on the corresponding linkage group (linkage group 6) at the same position (‘*RWC.WW.6.2*’; position 21.3 cM, ‘ $R^2 = 10\%$ ’). It is also co-located with a QTL for leaf water potential in our study. Furthermore, we detected five additional QTLs for RWC, due to the improved power of QTL detection using our new expanded linkage map.

The most important chromosomal region for OA is located on linkage group 5 where the QTL for OA (*OA.5.2*) is co-located with QTLs for RWC in both water treatments as well as with the QTLs for Ψ_{sFT} and Ψ_w under water-stressed conditions

Table 6

Map position and effect of QTLs detected in RILs for leaf water potential (Ψ_w), relative water content (RWC), osmotic potential (Ψ_s), turgor potential (Ψ_t), osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) and osmotic adjustment (OA) under water-stressed conditions

Trait	QTL	Linkage group	Marker to the left of LOD peak	Position (cM) ^a	LOD	Additive effect	R^2 ^b	TR ^{2c}
Ψ_w (MPa)	<i>LWP.WS.1.1</i>	1	E33M48_16	30.6	12.49	0.135	0.22	0.80
	<i>LWP.WS.5.1</i>	5	ORS523_1	89.3	3.79	-0.081	0.10	0.92
	<i>LWP.WS.7.1</i>	7	E35M60_22	60.8	4.02	0.100	0.13	0.93
	<i>LWP.WS.9.1</i>	9	E41M59_5	79.8	7.27	0.096	0.13	0.75
	<i>LWP.WS.16.1</i>	16	E41M48_6	28.4	5.10	-0.089	0.09	0.82
	<i>LWP.WS.16.2</i>	16	E37M61_8	80.8	7.76	0.099	0.12	0.81
RWC (%)	<i>RWC.WS.4.1</i>	4	E35M49_4	18.1	3.88	2.550	0.08	0.69
	<i>RWC.WS.5.1</i>	5	ORS523_1	85.3	3.94	-1.539	0.08	0.78
	<i>RWC.WS.7.1</i>	7	E35M60_22	60.8	3.72	-1.841	0.12	0.83
	<i>RWC.WS.16.1</i>	16	E41M48_6	28.4	5.19	-3.141	0.21	0.71
	<i>RWC.WS.16.2</i>	16	E37M61_8	80.8	9.54	3.590	0.19	0.76
	<i>RWC.WS.17.1</i>	17	E35M62_5	40.6	3.94	1.420	0.06	0.71
Ψ_s (MPa)	<i>OP.WS.1.1</i>	1	E33M48_16	32.6	7.60	0.130	0.18	0.90
	<i>OP.WS.5.1</i>	5	E41M62_7	2.0	4.56	0.093	0.11	0.76
	<i>OP.WS.5.2</i>	5	ORS31_2	35.6	6.77	0.107	0.10	0.82
	<i>OP.WS.5.3</i>	5	E32M49_23	96.2	5.10	0.142	0.19	0.91
	<i>OP.WS.11.1</i>	11	E38M50_24	76.5	3.39	0.085	0.10	0.77
	<i>OP.WS.12.1</i>	12	ORS1085_1	79.2	3.88	-0.086	0.09	0.74
	<i>OP.WS.16.1</i>	16	E37M61_8	80.8	3.80	0.084	0.08	0.73
Ψ_t (MPa)	<i>TP.WS.1.1</i>	1	E37M47_15	26.6	4.35	0.041	0.07	0.76
	<i>TP.WS.4.1</i>	4	E41M62_6	2.0	3.91	0.034	0.08	0.80
	<i>TP.WS.7.1</i>	7	ORS331_1	14.5	6.61	-0.043	0.13	0.79
	<i>TP.WS.10.1</i>	10	E35M62_7	144.4	6.47	-0.072	0.19	0.66
	<i>TP.WS.16.1</i>	16	E37M47_26	24.2	9.63	0.067	0.25	0.83
	<i>TP.WS.16.2</i>	16	SSL22_1	98.6	3.96	-0.037	0.06	0.77
Ψ_{sFT} (MPa)	<i>OPF.WS.1.1</i>	1	E33M48_16	32.6	6.18	-0.038	0.07	0.84
	<i>OPF.WS.5.1</i>	5	E40M62_8	5.6	7.58	0.040	0.09	0.85
	<i>OPF.WS.5.2</i>	5	ORS523_1	87.3	10.98	-0.052	0.18	0.86
	<i>OPF.WS.16.1</i>	16	ORS899	18.9	4.96	-0.041	0.11	0.81
	<i>OPF.WS.16.2</i>	16	E41M48_6	28.4	10.03	-0.058	0.15	0.86
	<i>OPF.WS.16.2</i>	16	E37M61_8	80.8	5.09	0.049	0.10	0.83
	<i>OPF.WS.17.1</i>	17	ORS297	31.2	3.57	0.025	0.06	0.84
Water-stressed vs well-watered OA (MPa)	<i>OA.2.1</i>	2	E38M50_26	57.3	5.44	-0.035	0.07	0.83
	<i>OA.4.1</i>	4	E41M62_6	2.0	3.22	0.030	0.07	0.83
	<i>OA.5.1</i>	5	E40M62_8	5.6	5.92	-0.039	0.08	0.83
	<i>OA.5.2</i>	5	ORS523_1	85.3	12.04	0.076	0.29	0.94
	<i>OA.12.1</i>	12	E40M50_9	0.0	3.31	-0.033	0.06	0.76
	<i>OA.12.2</i>	12	E38M48_6	18.4	8.81	-0.048	0.14	0.84
	<i>OA.12.3</i>	12	E38M50_6	30.9	5.10	-0.039	0.08	0.74
	<i>OA.13.1</i>	13	E40M62_25	16.5	12.63	0.052	0.15	0.97

^a From the north of linkage group.

^b Percentage of individual phenotypic variance explained. Value determined by QTL Cartographer, version 1.16 [43].

^c Percentage of phenotypic variance explained by the QTLs given all the covariants. Value determined by QTL cartographer, version 1.16 [43].

(Fig. 1). This region, which is linked to a SSR marker (ORS523-1), appears very important in water stress tolerance, as it is involved in the expression of OA as well as in the expression of Ψ_{sFT} , Ψ_w and RWC under water-stressed condition. This QTL explains 29% of the phenotypic variance in OA and also 10%, 8% and 18% of phenotypic variance in Ψ_w , RWC and Ψ_{sFT} under water-stress, respectively. It explains also 25% of RWC phenotypic variance under well-watered conditions. Favorable alleles for QTLs of Ψ_w , RWC and Ψ_{sFT} come from 'RHA266', whereas for QTL of OA, the favorable alleles come from 'PAC2'. This may explain the negative

correlation between OA and RWC and Ψ_w , as OA occurs when water potential (Ψ_w) and RWC are decreased [2,3,9]. This result implies that the molecular mechanism of drought tolerance to overcome reduction in RWC and Ψ_w under drought stress involved osmotic OA. However, on the same linkage group (linkage group 5), another QTL for OA (*OA.5.1*) is co-located with QTLs for Ψ_s and Ψ_{sFT} (Fig. 1). OA refers to the lowering of the osmotic potential (Ψ_s), due to the net accumulation of solutes in response to water deficit (decreasing RWC and Ψ_w), and results in the maintenance of a higher water turgor potential (Ψ_t) that may contribute to limiting the effects of water stress on

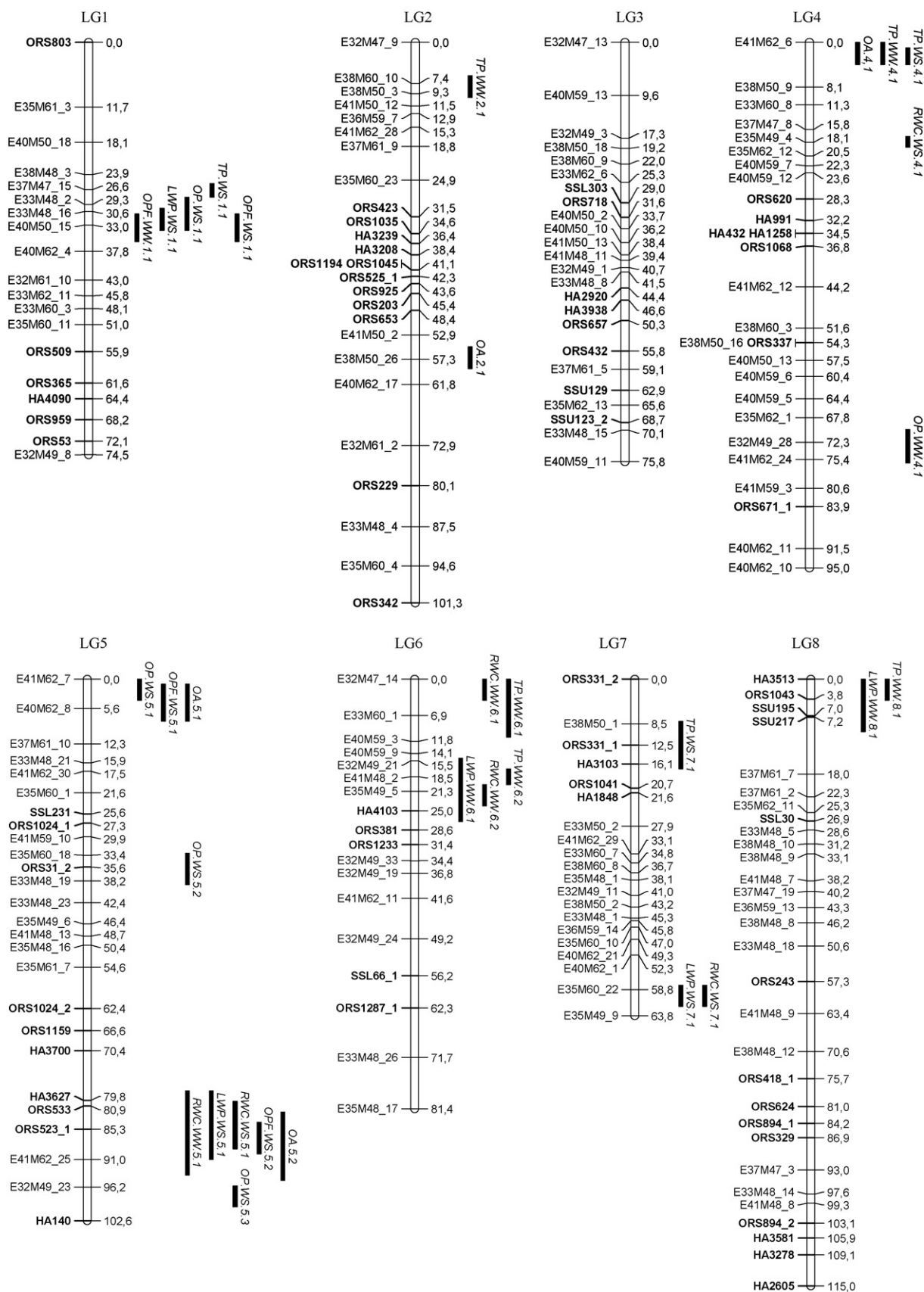


Fig. 1. Improved molecular genetic linkage map of sunflower based on 304 AFLP and 191 SSR markers using 123 ‘PAC2’ × ‘RHA266’ recombinant inbred lines (RILs). SSR loci are shown in bold-face. The positions of the QTLs are presented on the right side of the linkage groups. Bars represent intervals associated with the QTLs.

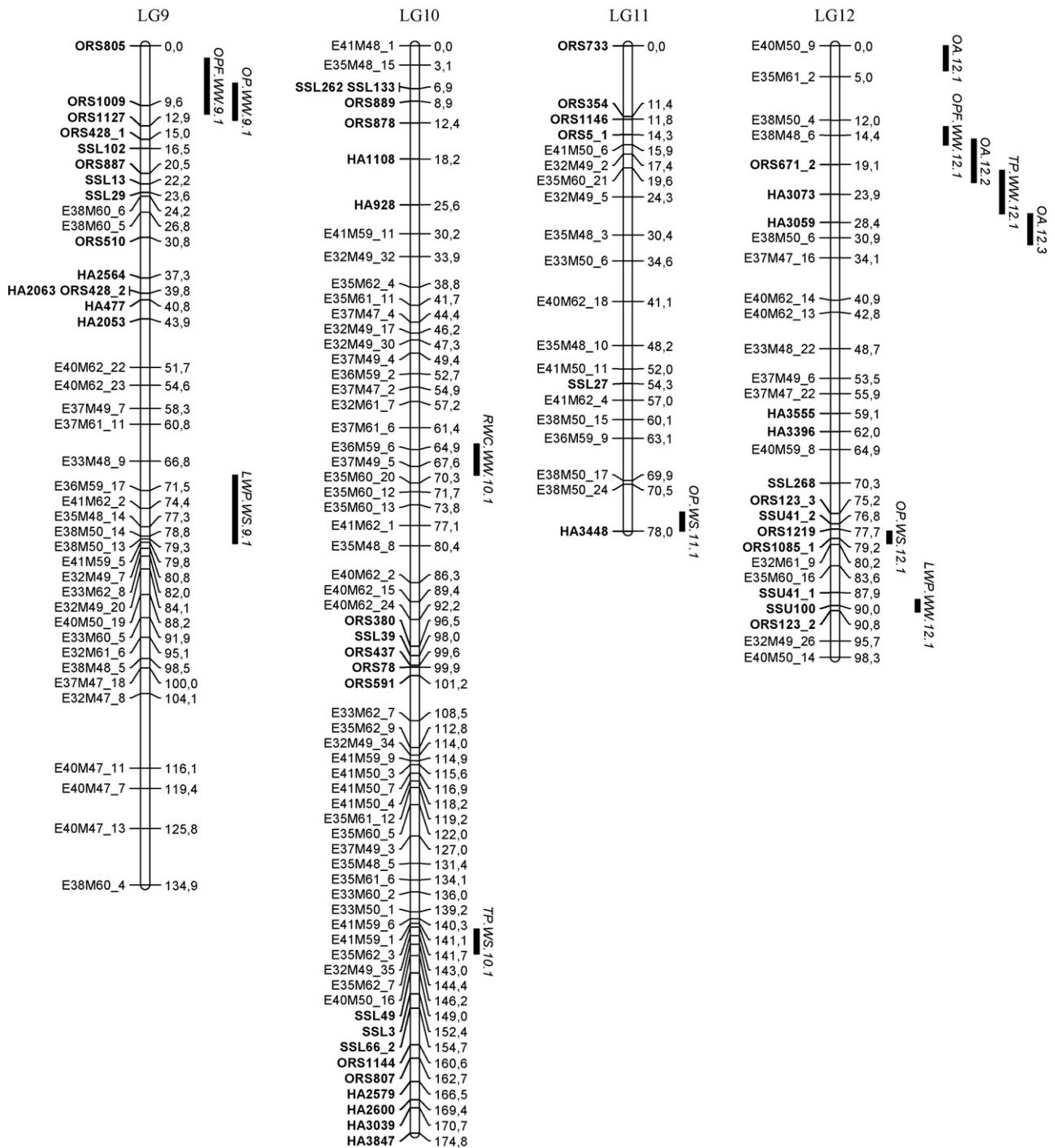


Fig. 1. (Continued)

physiological functions such as stomatal conductance, photosynthesis and growth [9]. Although OA has been reported to contribute to drought tolerance in sunflower and the development of molecular markers for OA has been proposed [9], but this study represents the first actual report of precise QTL mapping of OA and related water status traits in sunflower. Among the eight QTL detected for OA, four of them (50%) are co-located with QTLs of Ψ_t on linkage group 4 (*OA.4.1*), with a QTL for Ψ_{sFT} in well-watered RILs on linkage group 12

(*OA.12.2*) and with various additional QTLs for different traits on linkage group 5 (*OA.5.1* and *OA.5.2*). The other four QTLs for OA (50%) are located on linkage groups 2 (*OA.2.1*), 12 (*OA.12.1* and *OA.12.3*) and 13 (*OA.13.1*), and appear individual QTLs specific for OA. Similarly, several individual QTLs were detected for other water status traits on different linkage groups (Fig. 1).

The locations of QTLs identified in the present study for plant water status and OA when compared with those

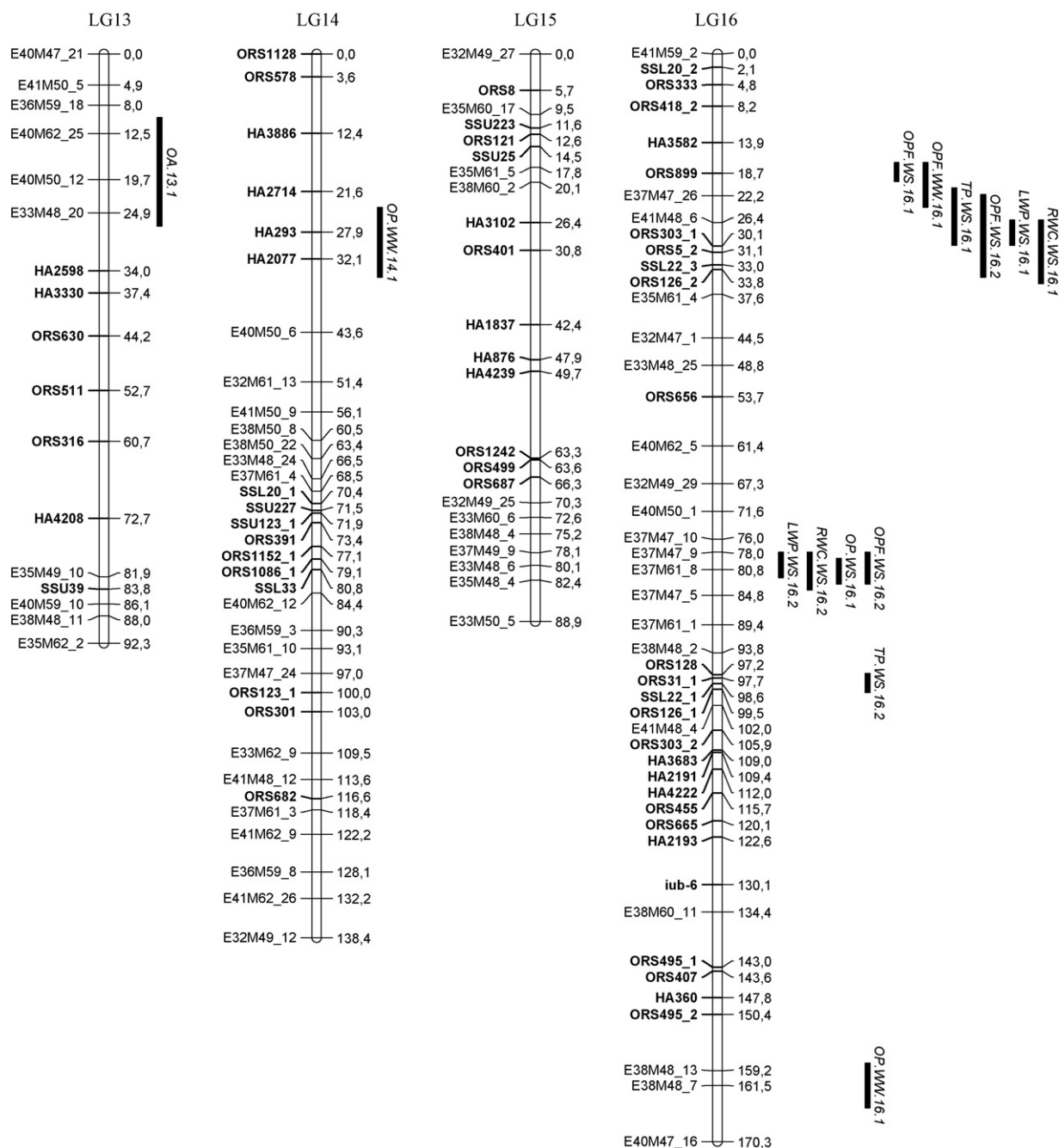


Fig. 1. (Continued)

controlling agronomic traits under well-watered conditions reported by Rachid Al-Chaarani et al. [21], showed overlapping QTLs for some of the water status and agronomical traits (Table 8). The overlapping QTLs are located on: linkage group 2 for turgor potential (Ψ_t) and stem diameter ('*TP.WW.2.1*' and '*sd-14-1*') as well as for osmotic adjustment and sowing-to-flowering period ('*OA.2.1*' and '*stf-14-1*'); linkage group 7 for relative water content and sowing-to-flowering period ('*RWC.WS.7.1*' and '*stf-4-1*') and for leaf water potential and sowing-to-flowering period ('*LWP.WS.7.1*' and '*stf-4-1*'); linkage group 12 for leaf water potential and percentage of oil in the grain ('*LWP.WW.12.1*' and '*pog-13-1*'); and linkage

group 17 for osmotic potential and stem diameter ('*OP.WW.17.1*' and '*sd-15-1*'). The co-location of QTLs for water status traits and oil percentage as well as for agronomical traits reported above suggests that a clear link has been shown between plant water status and yield-related traits, despite a relatively low number of markers in the previous map and different environmental condition under which these traits were evaluated.

QTLs for water status traits in our study overlapped with three QTLs detected for sowing-to-flowering period and two QTLs for stem diameter [21]. Previous studies showed significant positive correlations between sowing-to-flowering

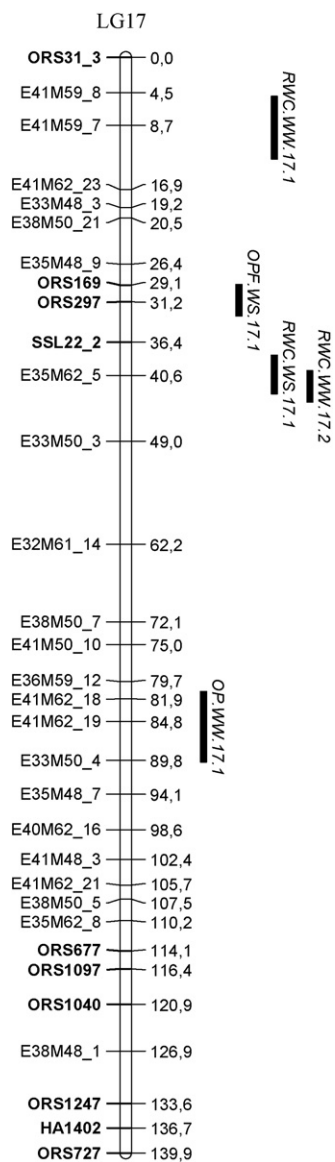


Fig. 1. (Continued).

period and yield under both well-watered and water-stressed conditions in sunflower [49]. Sowing-to-flowering period has been also reported to affect seed-oil content in different environments [26]. Stem diameter has been reported to be correlated with yield and 1000-grain weight in sunflower [21]. Therefore, the fact that QTLs for adaptive-traits (OA, RWC and Ψ_w) overlapped with those for stem diameter and sowing-to-flowering period suggests a physiological link between water status and certain growth traits, which could indirectly affect yield. However, the population structure and size used in the present study might be insufficient to separate developmental traits from physiological traits. Among these QTLs, ‘RWC.WS.7.1’, ‘LWP.WS.7.1’ and ‘OA.2.1’ are of major interest as they are involved in drought tolerance.

In this study, common QTLs showing significant effects under both well-watered and water-stressed treatments as well

Table 7

Number of QTL detected for each trait in each water treatment (*in the diagonal*) as well as QTLs in common among well-watered and water-stressed treatments for each trait (*above diagonal*)

Trait		Water treatment	
		WW	WS
Ψ_w	WW	3	0
	WS	0.08 ^{NS} (0.14 ^{NS})	6
RWC	WW	6	2
	WS	0.17 ^{**} (0.26 ^{***})	6
Ψ_s	WW	5	0
	WS	0.17 ^{**} (0.61 ^{***})	7
Ψ_t	WW	6	1
	WS	0.20 ^{**} (0.21 ^{**})	6
Ψ_{sFT}	WW	4	2
	WS	0.25 ^{***} (0.26 ^{***})	7

Phenotypic and genetic correlation coefficients (in parenthesis) between water treatments for each trait are presented. WW: well-watered condition; WS: water-stressed condition; Ψ_w : leaf water potential (MPa); RWC: relative water content (%); Ψ_s : osmotic potential (MPa); Ψ_t : turgor potential (MPa); Ψ_{sFT} : osmotic potential at full turgor (MPa); NS: non-significant.

** Significant at 0.01 probability level.

*** Significant at 0.001 probability level.

as QTLs specific for one of the treatments were detected. Among the 24 QTLs detected under well-watered conditions, 5 (about 21%) were also detected under water-stressed conditions (Table 7). The number of common QTL was zero for Ψ_w and Ψ_s , one for Ψ_t (linkage group 4) and two for Ψ_{sFT} (linkage groups 1 and 16) and RWC (linkage groups 5 and 17). The phenotypic variance (R^2) explained by some of common QTLs was, however, different under the two water treatments. For example, in the case of RWC, R^2 was 25% for the QTL operating under well-watered conditions (RWC.WW.5.1) whereas it was only 8% for the same QTL under water-stressed conditions (RWC.WS.5.1) (Tables 5 and 6). The same observation could be made for a QTL involved in Ψ_{sFT} on linkage group 1 (OPF.WW.1.1 and OPF.WS.1.1) for which R^2 values are 15% and 7% under well-watered and water-stressed conditions, respectively. Despite the small difference for the latter, it suggests, however, a differential control of the expression of RWC and Ψ_{sFT} under well-watered versus water-stressed conditions. Seemingly inconsistent effects of QTL over water treatments can explain the genetic component of the statistically significant ‘RIL \times water treatment’ interaction component [50]. However, Ψ_t was the only trait, which did not show significant ‘RIL \times water treatment’ interaction and has one common QTL with almost the same effect (6% and 8%) under both water treatments. QTLs, specific for each water treatment tended to have a larger impact on the trait compared to QTLs held in common over treatments, thus explaining the significant ‘RIL \times water treatment’. This suggests a complex picture of the genetics behind the response to drought stress in sunflower.

The majority of QTL studies in sunflower have been carried out under only one water regime. Such studies do not

Table 8

QTLs controlling plant water status and osmotic adjustment identified in the present study, which overlapped with QTLs of agronomic traits reported by Rachid Al-Chaarani et al. [21]

Water status trait in the present study	Agronomic traits (Rachid Al-Chaarani et al. [21])	Linkage groups in the present study	Corresponding linkage groups (Rachid Al-Chaarani et al. [21])	Overlapped QTLs
Turgor potential (Ψ_t)	Stem diameter (SD)	LG2	LG14	'TP.WW.2.1', 'sd-14-1'
Osmotic adjustment (OA)	Sowing to flowering (STF)	LG2	LG14	'OA.2.1', 'stf-14-1'
Relative water content (RWC)	Sowing to flowering (STF)	LG7	LG4	'RWC.WS.7.1', 'stf-4-1'
Leaf water potential (Ψ_w)	Sowing to flowering (STF)	LG7	LG4	'LWP.WS.7.1', 'stf-4-1'
Leaf water potential (Ψ_w)	Percentage of oil in grain (POG)	LG12	LG13	'LWP.WW.12.1', 'pog-13-1'
Osmotic potential (Ψ_s)	Stem diameter (SD)	LG17	LG15	'OP.WW.17.1', 'sd-15-1'

permit the separation of constitutive QTLs from adaptive ones. Sorting out constitutive from adaptive QTL effects is made possible by the evaluation of the same mapping population under different water regimes [51–53]. The present study of QTL analysis enabled us to investigate the genetic basis of trait association by looking for co-location of corresponding QTLs on the genetic map under two water regimes. Apart from increasing understanding of the genetic complexity of traits, the major output of the QTL analysis was the identification of relevant genomic regions to be included in breeding programmes for responsiveness under drought. Stable QTLs across water treatments are involved in the expression of physiological traits without being affected by water treatment (Table 7). For example, the stable QTLs for RWC, Ψ_t and Ψ_{sFT} could provide a constitutive and positive effect on RWC, turgor and osmotic capacity under either water treatments. However, most of the QTLs identified were specific for one or the other water treatment, which could be of interest for marker-assisted selection when favorable alleles are selected. We suggest that specific QTLs may correspond to stress-induced gene(s) whose differential expression contributes to drought tolerance. In sunflower, an aquaporin gene (*suntip7*), which is expressed in guard cells during the phase of stomatal closure, has been proven to be involved in plant water status [54]. It reduces membrane water permeability and encourages cellular water conservation during periods of water stress. Some of the specific QTLs involved in drought tolerance in this study may correspond to such candidate genes acting directly or in a regulatory function under water stress. We suggest that both stable and specific QTLs should be considered in breeding programmes.

The trait of main interest is OA, as it takes into account parameters from the water-stressed as well as well-watered treatments. It is also involved directly in drought tolerance. Therefore, the QTLs identified for OA might reflect an adaptive response resulting in drought tolerance. Fifty percent of the QTLs detected for OA are co-located with QTLs for plant water status traits, and 50% of them were specific for the trait (Fig. 1). It appears from this study that markers linked to OA and a majority of water status traits located on linkage groups 4 and 5 might be useful for genetic selection for drought tolerance.

In conclusion, QTL analysis for water status traits using our improved map with 191 SSRs and 304 AFLP markers, enabled

us to investigate with greater precision the genetic basis of trait association by looking for co-location of corresponding QTLs on the genetic map. The identification of genomic regions associated with water status traits and osmotic adjustment under well-watered and water-stressed conditions will be useful for marker-based approaches to improve drought tolerance in sunflower. In addition, our map complements the public SSR/INDELs and SSR/SNP maps [46,47] as a genetic framework for quantitative and qualitative trait analysis for *H. annuus* L. This study is the first to our knowledge to identify QTL in two water treatments in sunflower. As the QTLs here were identified from greenhouse studies, their usefulness should therefore be evaluated under field condition, and also validated in other genetic backgrounds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plantsci.2006.12.007.

References

- [1] W. Tezara, V. Mitchall, S.P. Driscoll, D.W. Lawlor, Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower, *J. Exp. Bot.* 375 (2002) 1781–1791.
- [2] J.M. Morgan, Osmoregulation and water stress in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 (1984) 299–319.
- [3] E.S. Ober, M. Le-Bloa, C.J.A. Clark, A. Royal, K.W. Jaggard, J.D. Pidgeon, Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet, *Field Crops Res.* 91 (2005) 231–249.
- [4] J.M. Clarke, T. McCaig, Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat, *Crop Sci.* 22 (1982) 503–506.
- [5] J.M. Morgan, Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat, *Aust. J. Agric. Res.* 34 (1983) 607–614.
- [6] M.A. Schonfeld, B.F. Johnson, B.F. Craver, D.W. Morhinweg, Water relations in winter wheat as drought resistance indicators, *Crop Sci.* 28 (1988) 526–531.
- [7] A. Blum, Osmotic adjustment and growth in barley genotypes under drought stress, *Crop Sci.* 29 (1989) 230–233.
- [8] M.A. Matin, J.H. Brown, H. Ferguson, Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley, *Agron. J.* 81 (1989) 100–105.
- [9] C.A. Chiementi, J. Pearson, A.J. Hal, Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower, *Field Crops Res.* 75 (2002) 235–246.

- [10] C.A. Chiementi, M. Marcantonio, A.J. Hal, 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 (2006) 305–315.
- [11] S. Robin, M.S. Pathan, B. Courtois, R. Lafitte, S. Carandang, S. Lancerase, M. Amante, H.T. Nguyen, Z. Li, Mapping osmotic adjustment in an advanced back-cross inbred population of rice, *Theor. Appl. Genet.* 107 (2003) 1288–1296.
- [12] B. Jongdee, S. Fukai, M. Cooper, Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice, *Field Crop Res.* 76 (2002) 153–163.
- [13] Z. Flagella, T. Rotunno, E. Tarantino, R. Di Caterina, A. De Caro, 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 (2002) 221–230.
- [14] P. Maury, M. Berger, F. Mojayad, C. Planchon, Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes, *Plant Soil* 223 (2000) 153–160.
- [15] D. Pankovic, Z. Sakac, S. Kevresan, M. Plesnicar, Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: photosynthesis, electron transport and carbon metabolism, *J. Exp. Bot.* 330 (1999) 127–138.
- [16] E.A. Bray, Plant responses to water deficit, *Trends Plant Sci.* 2 (1997) 48–54.
- [17] M.R. Foolad, L.P. Zhang, P. Subbiah, Genetic of drought tolerance during seed germination in tomato, inheritance and QTL mapping, *Genome* 46 (2003) 536–545.
- [18] K. Arumuganathan, E.D. Earle, Nuclear DNA content of some important plant species, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9 (1991) 208–219.
- [19] I. Pejic, P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino, M. Motto, Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs, *Theor. Appl. Genet.* 97 (1998) 1248–1255.
- [20] E. Flores Berrios, L. Gentsbittel, H. Kayyal, G. Alibert, A. Sarrafi, AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor. Appl. Genet.* 101 (2000) 1299–1306.
- [21] G.R. Al-Chaarani, L. Gentsbittel, X. Huang, A. Sarrafi, 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 (2004) 1353–1360.
- [22] V. Hongtrakul, M.B. Slabaugh, S.J. Knapp, DFLP, SSCP, and SSR markers for $\Delta 9$ -stearoyl-acyl-carrier protein desaturase strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines, *Mol. Breed.* 4 (1998) 195–203.
- [23] N. Paniego, M. Echaide, M. Munoz, L. Fernandez, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Crrera, R. Zandomeni, E.Y. Syarez, H. Esteban Hopp, Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Genome* 45 (2002) 34–43.
- [24] J.K. Yu, J. Mangor, L. Thompson, K.J. Edwards, M.B. Slabaugh, S.J. Knapp, Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower, *Genome* 45 (2002) 652–660.
- [25] S. Tang, J.K. Yu, M.B. Slabaugh, D.K. Shintani, S.J. Knapp, Simple sequence repeat map of the sunflower genome, *Theor. Appl. Genet.* 105 (2002) 1124–1136.
- [26] A.J. Leon, F.H. Andrade, M. Lee, Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower, *Crop Sci.* 43 (2003) 135–140.
- [27] P.F. Bert, I. Jouan, D.T. de Labrouhe, F. Serre, J. Philippon, P. Nicolas, F. Vear, 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 (2003) 181–189.
- [28] P.F. Bert, G. Dechamp-Guillaume, F. Serre, I. Jouan, D.T. de Labrouhe, P. Nicolas, F. Vear, Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*, *Theor. Appl. Genet.* 109 (2004) 865–874.
- [29] Z. Micic, V. Hahn, E. Bauer, C.C. Schon, A.E. Melchinger, QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* midstalk-rot in RIL of sunflower population NDBLOSSel \times CM625, *Theor. Appl. Genet.* 110 (2005) 1490–1498.
- [30] G.R. Al-Chaarani, L. Gentsbittel, M. Wedzony, A. Sarrafi, Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Plant Sci.* 169 (2005) 221–227.
- [31] D. Hervé, F. Fabre, E.F. Berrios, N. Leroux, Gh. Al Chaarani, C. Planchon, A. Sarrafi, L. Gentsbittel, QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under green house condition, *J. Exp. Bot.* 362 (2001) 1857–1864.
- [32] L.S. Zhang, V. Le Clerc, S. Li, D. Zhang, Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment, *Can. J. Bot.* 83 (2005) 66–72.
- [33] L. Gentsbittel, F. Vear, Y.-X. Zhang, A. Bervillé, P. Nicolas, Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theor. Appl. Genet.* 90 (1995) 1079–1086.
- [34] L. Gentsbittel, S. Mouzeyar, S. Badaoui, F. Mestries, F. Vear, D.T. de Labrouhe, P. Nicolas, Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L., *Theor. Appl. Genet.* 96 (1998) 519–525.
- [35] A.A. Schneiter, J.F. Miller, Description of sunflower growth stages, *Crop Sci.* 21 (1981) 901–903.
- [36] P.F. Scholander, H.T. Hammel, E.D. Bradstreet, E.A. Hemmingsen, Sap pressure in vascular plants, *Science* 148 (1965) 339–364.
- [37] SAS Institute, SAS/STAT User's Guide, version 6, fourth ed., vols. 1 and 2, 1996.
- [38] S. Tang, V.K. Kishore, S.J. Knapp, PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower, *Theor. Appl. Genet.* 107 (2003) 6–19.
- [39] T.M. Fulton, J. Chunwongse, S.D. Tanksley, Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants, *Plant Mol. Biol. Rep.* 13 (1995) 207–209.
- [40] E.S. Lander, P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, L. Newburg, MAPMAKER, an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations, *Genomics* 1 (1987) 174–181.
- [41] T. Schiex, C. Gaspin, CARTHAGENE, construction and joining maximum likelihood genetic maps, in: *Proceeding of ISMB*, vol. 5, Porto Carras, Halkidiki, Greece, (1997), pp. 258–267.
- [42] D.D. Kosambi, The estimation of a map distance from recombination values, *Ann. Eugen.* 12 (1944) 172–175.
- [43] C.J. Basten, B.S. Weir, Z.B. Zeng, QTL Cartographer version 1.16, Programme in Statistical Genetics, Department of statistics, North Carolina State University, 2002.
- [44] E.S. Lnader, D. Botestein, Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps, *Genetics* 121 (1989) 185–199.
- [45] K. Langar, M. Lorieux, E. Desmarais, Y. Griveau, L. Gentsbittel, A. Bervillé, Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred line, *Theor. Appl. Genet.* 106 (2003) 1068–1074.
- [46] J.K. Yu, S. Tang, M.B. Slabaugh, A. Heesacker, G. Cole, M. Herring, J. Soper, F. Han, W.C. Chu, D.M. Webb, L. Thompson, K.J. Edwards, S. Berry, A.J. Leon, C. Olungu, N. Maes, S.J. Knapp, Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower, *Crop Sci.* 43 (2003) 367–387.
- [47] Z. Lai, K. Livingstone, Y. Zou, S.A. Church, S.J. Knapp, J. Andrews, L.H. Rieseberg, Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower, *Theor. Appl. Genet.* 1118 (2005) 1532–1544.
- [48] W.D. Beavis, The power and deceit of QTL experiment: lessons from comparative studies, in: *Proceeding of the 49th Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference*, Chicago, (1994), pp. 250–266.
- [49] H. Razi, M.T. Assad, Comparison of selection criteria in normal and limited irrigation in sunflower, *Euphytica* 105 (1999) 83–90.
- [50] W.D. Beavis, P. Kim, Identification of quantitative trait loci that are affected by environment, in: M.S. Kang, H.G. Gauch (Eds.),

- Genotype-by-Environment Interaction, CRC Press, Boca Raton, 1996 , pp. 123–149.
- [51] M. Sari-Gorla, P. Krajewski, N. Di Fronzo, M. Villa, C. Frova, Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering, *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 289–295.
- [52] C. Frova, P. Krajewski, N. Di Fronzo, M. Villa, M. Sari-Gorla, Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components, *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 280–288.
- [53] R. Tuberosa, S. Salvi, M.C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri, S. Conti, Mapping morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize, *Ann. Bot.* 89 (2002) 941–963.
- [54] X. Sarda, D. Tusch, K. Ferrare, F. Cellier, C. Alcon, J.M. Dupuis, F. Casse, T. Lamaze, Characterization of closely related δ -TIP gene encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air, *Plant Mol. Biol.* 40 (1999) 179–191.

SSR locus	Motif	Upper primer sequence (5'-->3')	Lower primer sequence (5-->3')
HA 1108	ATT	GGACCTTCTATTTAGGAGGG	GGGAACATGGAATAAGGG
HA 1258	GT	GTGTGAATGTGAGTGTGAATCC	GTCACAGTTGCATATCCATCC
HA 140	GA	CTAGCAACCAACCTCATTG	GTCTCCTTCTCTTTCTCGGC
HA 1402	ATT	GTTATAAGCGCCAAATGGG	CACACACGTGCACTTTAAC
HA 1837	ATT	GCGTCGCCATCCCCTTCTG	CAAGCTCGAGATCGTCTGGTC
HA 1848	GT	TCCTCCCTTCCATCAGTG	CGGTTGTGATGATTGGGTTT
HA 2053	ATT	CACCATCACCCACCTGCACAAG	CATCAAAGCCCATTCTCAGCCC
HA 2063	GA GT	CACCGCAGATGGCCAATTCAAC	GGTTCTGCTAACCTGCAATGCG
HA 2077	GA	GATAAGGTTTTCTCTCTCCC	GAGAAAAATGAGCTGATACCG
HA 2191	GA	GGCAACTCAATATCCACACCCC	GGGTTCTTCAAGGAGAATGTGAC
HA 2193	GA	CAATACACGCAAACCCCGAAC	GCACTGCCAAAACAGTTGAC
HA 2564	GT	CTTGGGTTCTTCATAACTC	CATGTAATCACCTTTCAAG
HA 2579	GT	CGGATTTATGATTTGATTACCCG	GGATAACACTACCTTTGATGTTG
HA 2598	GAGT	TTCTCATGTGCTCAAAGATG	CCTGAACCCTTTTGTTTCTT
HA 2600	GA	GCCGAATTTGATGATTAGTGG	GAAAGTGAAGTTGGATGTGGCGG
HA 2605	GA	GCAGATTACAATATGCACAC	GTGTTGAAAGTAGTTGGTTGC
HA 2714	GA G	CCTAGTGTATAGCAACCTTTC	GTAGTGTGTATGAGGGAGATGG
HA 2920	ATG	AACGTGTTCAATTCGGATGC	GAAGATTGGTATGATGGGGC
HA 293	GA	GGGGACATCTCCCGTCCACC	CCTCATCCATCTCCATCCAATC
HA 3039	GT	GGTTGATTAAGTGTGGGTC	CCTGTGTATGACTCGTTATC
HA 3059	GA	GAGTGAGAGTAATCAATG	CTCCCTGTCATCACAATCAC
HA 3073	GA	GAGTCAATTGCTTGTATG	GCACTGAAACATTAGCATC
HA 3102	GA	CATGATGAAGTACCACCTCCATC	CCTCTCTCATCATGTAAGCC
HA 3103	GA	CCTTAAAAGGCAAACGATTCTCC	GTTACAGTACGGCGAGAATGTAGG
HA 3208	ATG	CCCTATCTCTAATCTTCCTC	GTTCTTGAAGATCTGATGTG
HA 3239	ATG	CTTAATTCCGACATAAGCAGG	CTTTCATTATTCACAACCCCC
HA 3278	GA TA	CATTTCAAACGCCCCGCTTC	GGTCAAATCGTTCCTGAATCG
HA 3330	GA	GGCTGAGTAAATGCCAAATACGG	GGTTGTTGATTACAAGCTCTCC
HA 3396	GT ATT	CCCACAGATCGAGAGTCATTAC	CCCCTGGTTTCTTGTGATG
HA 3448	TA GT	GAAGTCAAGATAGAACCTGATG	CTAGGTTCTGCATACTCAC
HA 3513	ATT/CAT	CCACATGACCCATTCAACTTC	TCATGGTTCCTGATGAG
HA 3555	CAT	GATATCTCTCATAAGTGCCG	GGTCTTGTGATGACGAAGC
HA 3581	ATC	GTAGAGGAGTATCGCCAATAGC	GTTCCAATGGCCAACGATTGTG
HA 3582	ATG	TGACCTTAATCCTTGGAGAG	CCTCTAATTCCGAAAACCTAAC
HA 360	GA	CTCACCCCTTCATCTCCTTC	CAACAAGGAACCGATAACTG
HA 3627	GT	ACATGGATTCCATTACAGGC	GCTAGATATGTAAAACAGGG
HA 3683	GA GT	GCCCTTATTCTCCTAATTGTG	GAAGAAGGAGATAGGGTATGTC
HA 3700	GA	AGTCGTGAAAAGAAAAGGG	CCTATATATCTCTCCTAACG
HA 3847	GT	CATCACTTCAACATGCCTCC	CCTAGCTCCTTTATGTAACCTC
HA 3886	ATT	GCTTATGTGGAAGCATGTCG	CAGGTTTCTACTTACGGGTCG
HA 3938	ATT	GTCAGTAAAAAGTTACCATGTTGC	GCTTGAAGATATAAAGTTGTTGC
HA 4090	GT	GCCATGATTGGCTAAGGTTCCG	TGCGTTACCGACAACACAAGG
HA 4103	GA	CACCAATCTCATCCATCTATG	CTTGTGTCACCGATTTAGGATG
HA 4208	ATT	CCCGCAATTGAATACGCGACATC	CATCTCGTTGCCGTTAACTATC
HA 4222	ATT	GGCATCAATAATATGAGGCAC	CATCACATCCATCAATCCATTC
HA 4239	ATT	GAATGATAGTGAATTGAGACAGG	CTGGCATCTATATCCATGGATAG
HA 432	GT	GGGTTTGTAGTGCCAGTAGTTGTC	CTTTATCCCCACCCCCTCC
HA 477	GT	GGATCCACACATATTAAGTAC	CGAGCGAGTGCTAGTTGTGTAAG
HA 876	TGG	CGTTATTTATAAGACCCACCCC	CAACTTGGATGTGGCCGGAG
HA 928	GT ATT	GGTCGATCATGTATGCGTGTGG	CCTTTGTAGTCCCTTACTGG
HA 991	GA	GCCCCCTTGATGCCCTTTTC	GAATCGCCATTTGAATCGCCAG

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

S. Poormohammad Kiani¹, P. Maury¹, L . Nouri¹ , A . Sarrafi², P. Grieu¹

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

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

Plant Science (Soumis)

*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

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. The difference among RILs was significant for all the traits studied in all conditions; and 'Water treatment × RILs' interaction was also observed for most of the traits in both field and greenhouse conditions. 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 detected in our previous study. 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*). The QTLs for several growth-related traits identified in the present study were also overlapped with the QTL controlling turgor potential in our previous research work on linkage group 7. The whole results do highlight interesting genomic regions for marker-based breeding programme for drought tolerance in sunflower.

Key Words: Sunflower, water stress, grain yield, QTL mapping, co-location

1. Introduction

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 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 [1,2].

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 [3,4,5]. As an alternative to a 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 [3,5,6]. 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 [6,7,8,9].

Fereres et al. [9] 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. [6] 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 osmotic adjustment was different depending genotype [10]. Gimenez and Fereres [11] and Prieto Losada [12] showed that duration of leaf area is related to rainfed sunflower yield. The yield differences were also associated with variation in total biomass [8]. 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. 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 recombinant inbred lines [13] or F2/F3 populations [14,15]. 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 recombinant inbred lines (RILs) for yield-related traits by using our recently saturated SSR and AFLP

linkage map [16], in controlled (greenhouse) and natural (field) conditions under two water regimes.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials and genetic linkage map

The characteristic of mapping population (recombinant inbred lines, RILs) and their parents (PAC2 and RHA266) used in the present study has been explained in detail in our previous study [16]. Briefly the mapping population was developed through single seed descent from F₂ plants derived from a cross between ‘PAC2’ and ‘RHA266’ and a map was constructed with 304 AFLP and 191 SSRs. This map was used in the present work for identification of QTLs for yield-related traits under different water treatments

2.2. Greenhouse experiment

Plant material, experimental design and water stress treatments are explained in our previous work [16]. A population of 78 recombinant inbred lines (RILs) and their parents (PAC2 and RHA266) were grown in the greenhouse under controlled conditions. The experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot consisted of water treatments (well-watered and water-stressed) and subplot contained genotypes (RILs and parental lines). The RILs and their two parents were randomized within each treatment-block combination. In order to simulate water deficit conditions similar to field, a progressive water stress was imposed at stage near flower bud formation (R1, Schnithier and Miller [17]) by decreasing progressively the irrigation up to 30% field capacity during 12 days, and continued up to harvest.

2.3. Field experiment

Two experiments were undertaken in the field conditions with irrigated and non-irrigated (rainfed) water treatments and three replications per each water treatment. A population of 100 RILs and their parents were 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, before flowering and at about grain filling, determined according to sunflower irrigation programme in Toulouse-France region. Another experiment ‘non-irrigated’ was not irrigated at all. Three plants per genotype per water treatments were randomly chosen for evaluation of the studied traits.

2.4. 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: $LAF = \sum 0.7L \times W$ [8]. Green leaf area of the plants was determined weekly from flowering to harvest in order to evaluate green leaf area with respect to time. An integral of weekly leaf area was considered as being an estimate of leaf area duration (LAD, cm^2 days). Plants were harvested at maturity and total dry matter 'biomass' (BIO), head weight (HW) and grain yield per plant (GYP) were measured for RILs and their parental lines in each replication for all experiments.

2.5. Statistical analysis and QTL mapping

The data were analyzed using the SAS PROC GLM [18]. A mixed model with water treatment as fixed effect and genotypes (RILs and parents) as random effect, was used for analysis of the data in both greenhouse and field conditions. Correlations between grain yield per plant (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.

QTL mapping of the studied traits was performed by composite interval mapping (CIM) conducted with QTL Cartographer, version 1.16 [19] 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 Srmapping (model 6). A LOD threshold of 3.0 was used for considering a QTL significant [13]. 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 [20]. Additive effects of the detected QTLs were estimated with the Zmapping programme (Basten et al. 2002). The percentage of phenotypic variance (R^2) explained by each QTL was estimated by QTL Cartographer [19].

3. Results

3.1. Phenotypic variation and effect of water stress

Phenotypic variation of RILs and their parents (PAC2 and RHA266) in the greenhouse and field conditions under two water treatments are shown in Table 1. In the greenhouse conditions, significant water treatment effect was observed for all of the studied traits except for days from sowing to flowering (DSF) and the number of leaf per plant (LN). In the field conditions, water stress had significant effect on only head weight (HW) and grain yield per plant (GYP). The difference among RILs was significant for all the traits studied in all

conditions. ‘Water treatment × RILs’ interaction was observed for most of the traits in both field and greenhouse conditions. Parental lines (PAC2 and RHA266) differed significantly for leaf area at flowering (LAF) and leaf area duration (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 in both water treatments of field condition. Considering all the traits studied in different growth conditions, a high transgressive segregation was observed in both greenhouse and field under different water treatments.

3.2. Correlation analysis

Correlations between grain yield per plant (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 in both greenhouse and field conditions. Grain yield per plant (GYP) was correlated with LAF, LAD, HW and BIO in all four water treatments. GYP was correlated with plant height (PH) only in the field conditions. Days from sowing to flowering (DSF) and the number leaf per plant (LN) were not correlated with GYP.

3.3. 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 Tables 3 and 4. 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 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 in Fig. 1.

Two to seven QTLs were found depending 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 (Tables 3, 4 and Fig. 1).

Several QTLs were detected for date from sowing to flowering (DSF) in four different growth conditions (Tables 3, 4 and Fig. 1) and most of them were detected under 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 in QTL expression. For leaf area at flowering (LAF), twenty-one QTLs were detected under four growth conditions, their number being from two to six depending to 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 leaf area duration (LAD) is concerned, 22 QTLs were identified under four growth conditions, explaining from 4% to 17% of the total variation. Ten QTLs were detected in only one water treatment and 12 were detected in at least two were treatments. The positive alleles for 17 QTLs come from RHA266 and for 5 QTLs they come from PAC2. A total of 17 QTLs were detected for PH being six unique QTL 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 'biomass' (BIO), nineteen QTLs were identified, explaining from 5% to 23% of variation. The number of QTLs in four growth conditions varied from one to six; 13 were detected in only one of the growth conditions and 6 were common across different growth conditions. RHA266 contributed positive alleles at 14 out of 19 QTLs.

A total of 24 QTL were identified for head weight (HW) under four growth conditions with the phenotypic variance explained from 4% to 24%. The number of QTLs differed from two to seven depending the growth condition. Among 24 QTLs, 16 were detected in only one growth condition and 8 were common across different water treatments. PAC2 contributed positive alleles at 10 QTLs and RHA266 contributed at 14 QTLs. For grain yield per plant (GYP), twenty QTLs were identified under four water treatments with the phenotypic variance explained ranging from 4% to 40%. Nine out of 21 were identified in only one growth condition and the rest were common across at least two growth conditions. PAC2 and RHA266 contributed equally at QTLs controlling GYP.

4. Discussion

4.1. Phenotypic variation and the effect of water stress

The effect of water stress in the greenhouse conditions were significant for all traits except for days from sowing to flowering (DSF) and the number of leaf per plant (LN), whereas under field conditions, the effect of water stress was significant only for head weight (HW) and grain yield per plant (Table 1) which suggest that water stress was occurred earlier in the greenhouse when compared with field 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 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 [16].

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 in 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 recombinant inbred lines [21].

The correlation analysis indicated that DSF and LN were not associated with GYP in both greenhouse and field conditions, and plant height (PH) was correlated with GYP under only field conditions (Table 2). Rachid-Al-Chaarani et al. [13] also reported that, DSF is not correlated with grain yield. Head weight (HW) and biomass (BIO) were the highest contributing factor to grain yield per plant, and leaf area duration (LAD) was more important than leaf area at flowering (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 [22,23]. Genetic differences in photosynthetic duration have been also associated with a longer grain filling duration and higher yield in maize [24].

4.2. QTLs for grain yield per plant 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 (Tables 3 and 4). 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. 1). 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. 1). 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 group 2 (*GYPN.2.1*), 3 (*GYPI.3.1* and *GYPN.3.1*), 4 (*GYPD.4.1*, *GYPI.4.1* and *GYPI.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 (*GYPI.7.1*) under non-irrigated and irrigated field conditions, respectively.

Identification of QTL influencing several traits could increase the efficiency of marker-assisted selection and enhance genetic progress [25]. The correlation among different traits as well as their co-localization observed is relevant to effort for manipulating multiple traits simultaneously.

4.3. QTLs identified for a given trait under several growth conditions

Some QTLs are associated with the same traits 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 (*BIOW.1.1* and *BIOD.1.1*; interval 61.6-66.4 cM), 2 (*LADW.2.1* and *LADD.2.1*; interval 33.5-38.3 cM) and 3 (*LAFW.3.2* and *LAFN.3.1*; *LNI.3.1*, *LNN.3.1* and *LND.3.1*; intervals 17.2-19.2 and 44.3-46.3 cM) were detected in more than one environment (Fig. 1). Beside these QTL, several additional QTL for a given trait in at least two growth conditions were detected on different linkage groups which show that some QTLs are detectable under multiple conditions. For grain yield per plant 11 out of 21 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 (*GYPI.3.1* and *GYPN.3.1*), 4 (*GYPI.4.1*, *GYPI.4.2*, *GYPD.4.1* and *GYPN.4.1*), 10 (*GYPW.10.1* and *GYPN.10.1*) and 14 (*GYPW.14.1*, *GYPD.14.1* and *GYPN.14.1*). 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 in greenhouse and non-irrigated treatment in the 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. 1). This finding was not supported with phenotypic correlation between yield and LN. The positive alleles for the QTLs controlling yield in this region come from PAC2 and for QTLs conferring plant height 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. 1).

In the previous study, QTLs controlling plant water status traits and osmotic adjustment were mapped in the same mapping population under well-watered and water-stressed conditions [16]. Comparing the QTLs found in the present study for grain yield and agro-morphological traits with those previously reported, showed the presence of some common QTLs in 14 genomic regions (Table 5). The overlapping QTL indicates a physiological link between plant water status, osmotic adjustment and agronomical traits (Table 5). Some of them 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, (*GYPW.5.1*, *HWW.5.1*, *LNN.5.2* and *LAFN.5.1*) has been previously detected as the most important DNA region for plant water status traits such as relative water content in well-watered and water stressed conditions as well as for leaf water potential, osmotic potential at full turgor and osmotic adjustment.

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, were overlapped with the QTL controlling turgor potential identified in our previous work (Fig. 1, Table 5) [16]. 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 [10,26,27,28]. 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 5), 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 them located on linkage group 5 (*GYPW.5.1*), is overlapped with the QTLs for osmotic adjustment (*OA.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*) (Table 5). Another QTL for GYP, located on linkage group 12 (*GYP1.12.1*), is overlapped with one QTL for turgor potential (*TP.WW.12.1*) and two QTLs for osmotic adjustment (*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 relative water content (*RWC.WS.16.1*) (Table 5).

We have shown partly common genetic basis for plant water status, osmotic adjustment 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 osmotic adjustment have been largely based on phenotypic association with yield under drought stress [6]. Overlapping QTLs for water status traits, osmotic adjustment and productivity has been observed in cotton [29] and barley [30].

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 the identification of consistent genomic regions (QTL) from those expressed under specific conditions for several agronomical and yield-related traits. We identified the genomic regions controlling productivity (biomass, head weight and grain yield), which overlapped with the QTLs previously reported for plant water status and osmotic adjustment [16]. The results showed a partly common genetic basis for physiological traits (plant water status and osmotic adjustment) and grain yield in recombinant inbred lines. 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 osmotic adjustment with high phenotypic variance explained, could be beneficial for pyramiding higher grain yield and drought tolerance QTLs in the same genotype. However, for any quantitative trait, there is usually a requirement to confirm the position of the QTL and carry out fine-scale mapping before MAS becomes a viable proposition.

References

- [1] G.N. Fick Sunflower breeding and genetics. In: Carter JF (ed) Sunflower science and technology. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 279-327, 1978.

- [2] G.N. Fick, J.F. Miller, The genetics of sunflower. In: Shneither AA (ed) Sunflower technology and production. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 441-495, 1997.
- [3] A. Blum Plant Breeding For Stress Environment (1988) CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- [4] S. Ceccarelli, S. Grando, Drought as a challenge for the plant breeder. Plant Growth Regulation 20 (1996) 149-155.
- [5] R. Tuberosa, S. Salvi, M.C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri, S. Conti, Mapping morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize, Ann. Bot. 89 (2002) 941–963.
- [6] C. A. Chimenti, J. Pearson, A.J. Hal, Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. Field Crops Res. 75 (2002) 235–246.
- [7] Z. Flagella, T. Rotunno, E. Tarantino, R. Di Caterina, A. De Caro, 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 (2002) 221–230.
- [8] J.O. Alza, J. M. Fernandez-Martinez, Genetic analysis of yield and related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in dryland and irrigated environments, Euphytica 95 (1997) 243-251.
- [9] E. Fereres, C. Gimenez, J.M. Fernandez, Genetic variability in sunflower cultivars under drought. I. Yield relationships, Aust J. Agric. Res. 37(1986) 573–582.
- [10] P. Maury, F. Mojayad, M. Berger, C. Planchon, Photosynthesis response to drought acclimation in two sunflower genotypes, Physiol Plant 98 (1996) 57-66
- [11] C. Gimenez, E. Fereres, Genetic variability in sunflower cultivars under drought. II. Growth and water relations, Aust. J. Agric. Res. 37 (1986) 583–597.
- [12] H. Prieto Iosada, Response to drought conditions of sunflower genotypes differing in yield potential and length of cycle. PhD Thesis University of Cordoba (1992, in Spanish).
- [13] G. Rachid Al-Chaarani, L. Gentzbittel, X. Huang, A. Sarrafi, 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 (2004) 1353-1360.
- [14] P. F. Bert, I. Jouan, D. Tourvielle de Labrouhe, F. Serre, J. Philippon, P. Nicolas, F. Vear, 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 (2003) 181-189.

- [15] L. Mokrani, L. Gentzbittel, F. Azanza, L. Fitamant, G. Al-Chaarani, A Sarrafi, 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 (2002) 149-156
- [16] S. Poormohammad Kiani, P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniogo, A. Sarrafi, Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments, *Plant Sci.* 172 (2007) 773-787.
- [17] A.A. Schneiter, J.F. Miller, Description of sunflower growth stages, *Crop Sci.* 21 (1981) 901-903.
- [18] SAS Institute Inc Sas guide for personal computers, 9th edn, 2002, SAS Institute, Cary, 2002.
- [19] C.J. Basten, B.S. Weir, Z.B. Zeng QTL cartographer version 1.16: program in statistical genetics, Department of statistics, North Carolina State University , 2002.
- [20] E.S. Lnader, D. Botestein, Mapping mendelian factors underling quantitative traits using RFLP linkage maps, *Genetics* 121 (1989) 185–199.
- [21] G.H. Zou, H.W. Mei, H.Y. Liu, G.L. Liu, S.P. Hu, X.Q. Yu, M.S. Li, J.H. Wu, L.J. Luo Grain yield responses to moisture regimes in a rice population: association among traits and genetic markers, *Theor. Appl. Genet.* 112 (2005) 106-113.
- [22] R.A. Richards, Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops, *J Exp. Bot.* 51 (2000) 447-458.
- [23] L.E. Evans, *Crop evolution, adaptation and yield*, New York, Cambridge, 1993.
- [24] W. A. Russel, Genetic improvement of maize yields, *Adv. Agron.* 46 (1991) 245-298.
- [25] N. Upadyayula, H.S. da Silva, M.O. Bohn, T.R. Rocheford, Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence and architecture, *Theor. Appl. Genet.* 112 (2006) 592-606.
- [26] J. M. Morgan, Osmoregulation and water stress in higher plants, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35 (1984) 299-319
- [27] N.C. Turner, M.M. Jones, 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, 1980.
- [28] P. Maury, M. Berger, F. Mojayad, C. Planchon, Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes, *Plant Soil* 223 (2000) 153-160.

- [29] Y. Saranja, C.X. Jiang, R.J. Wright, D. Yakir, A.H. Paterson, Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity, *Plant Cell Environ.* 27 (2004) 263-277.
- [30] B. Teulat, D. This, M. Khairallah, C. Borries, C. Ragot, P. Sourdille, P. Leroy, P. Monneveux, A. Charrier, Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor Appl Genet* 96 (1998) 688–698.

Table 1

Performance of parents (PAC2 and RHA266) and recombinant inbred lines (RILs) across two water treatments, grown in greenhouse (well-watered and water-stressed) and in the 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	65.5-95.1	74.8	72.1	77.7	63.7-96.7	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{**}
	LN	20.7	23.3	23.8	17.0-34.6	20.0	24.0	23.2	17.3-33.3	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
	LAF	2855 ^a	3615	3122	1585-4388	1978 ^a	3121	2293	1156-3368	W ^{***} , R ^{***} , I ^{NS}
	LAD	83511 ^a	126486	117451	35981-277706	36634 ^a	64464	67653	10906-192630	W [*] , R ^{***} , I ^{**}
	PH	121.0 ^a	112.7	116.1	77.7-136.0	97.7	94.7	91.8	60.7-118.3	W [*] , R ^{***} , I ^{***}
	BIO	55.6	50.6	58.6	37.6-82.9	36.8	36.8	34.0	25.8-52.8	W ^{**} , R ^{***} , I ^{**}
	HW	14.9	14.4	17.5	7.3-33.5	9.7	8.7	8.9	4.6-20.5	W ^{**} , R ^{***} , I ^{NS}
	GYP	6.7	6.6	7.7	0.6-19.3	4.4	3.0	2.9	0.0-8.6	W ^{**} , R ^{***} , I ^{***}
Field	DSF	79.7	74.7	82.7	74.7-94.7	79.7	74.7	82.7	74.7-94.7	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
	LN	23.3	23.0	27.1	17.3-37.7	22.3	22.7	26.5	17.0-38.0	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
	LAF	4380	4501	4317	1988-7739	4174 ^a	2556	3932	2479-6949	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{**}
	LAD	107404 ^a	116188	95506	40753-196143	96108 ^a	67760	92733	43384-185865	W ^{NS} , R ^{***} , I [*]
	PH	125.7 ^a	102.3	125.0	74.3-177.7	119.7 ^a	99.3	122.8	83.3-158.7	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
	BIO	131.7 ^a	103.9	125.9	48.5-255.4	117.3 ^a	58.9	111.0	37.9-227.2	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{***}
	HW	67.1 ^a	48.7	55.3	13.8-107.0	43.7 ^a	31.4	48.2	12.0-117.0	W [*] , R ^{***} , I ^{***}
	GYP	26.3	27.6	26.9	2.3-58.2	16.3	17.4	22.4	2.7-69.1	W ^{**} , R ^{***} , I ^{***}

The significant differences between parental lines are shown by ^a

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

NS: non-significant.

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), number of leaf per plant (LN), leaf area at flowering (LAF; cm²), leaf area duration (LAD; cm² days), plant height (PH; cm), total dry matter (BIO; g), head weight (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 other traits in greenhouse (well-watered and water-stressed) and in the 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***		

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

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

NS: non-significant.

Table 3 QTLs detected for yield-related traits in the greenhouse conditions under two water treatments

Well-watered						Water-stressed					
Trait	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²	Trait	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²
DSF	<i>DSFW.5.1</i>	25.5	8.7	-2.23	0.13	DSF	<i>DSFD.1.1</i>	8.0	7.2	3.02	0.15
	<i>DSFW.5.2</i>	33.3	5.1	-2.29	0.13		<i>DSFD.7.1^a</i>	12.4	3.5	-2.24	0.07
	<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>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>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>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>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
LN	<i>LNW.7.1</i>	45.2	3.4	2.05	0.14	LN	<i>LND.3.1</i>	46.3	3.2	0.84	0.05
	<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>LND.14.1</i>	79.0	6.1	-1.28	0.11
							<i>LND.15.1</i>	24.1	5.1	1.21	0.10
LAF	<i>LAFW.3.1</i>	17.2	4.2	-144	0.05	LAF	<i>LAFD.1.1</i>	25.9	6.0	131	0.09
	<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>LAFW.9.1</i>	133.7	7.6	229	0.13		<i>LAFD.10.1</i>	103.1	10.4	-188	0.19
	<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>LAFW.12.2</i>	94.7	3.6	227	0.12		<i>LAFD.13.1</i>	0.0	7.9	-153	0.10
	<i>LAFW.13.1</i>	0.0	5.2	-175	0.07		<i>LAFD.17.1</i>	109.5	3.4	-103	0.12
LAD	<i>LADW.2.1</i>	33.5	6.5	-22930	0.17	LAD	<i>LADD.1.1</i>	26.5	7.3	23318	0.14
	<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>LADW.10.1</i>	16.3	7.6	24663.	0.17		<i>LADD.3.1</i>	31.6	3.3	-10505	0.07
	<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>LADW.10.3</i>	49.3	6.3	-25265	0.14		<i>LADD.16.1</i>	22.8	5.7	-13892	0.11
	<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	PH	<i>PHD.1.1</i>	45.7	7.8	5.06	0.13
	<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>PHD.9.1</i>	116.0	10.4	-6.74	0.20
							<i>PHD.13.1</i>	18.4	8.4	-7.16	0.23
							<i>PHD.14.1</i>	79.0	3.9	-3.90	0.08
BIO	<i>BIOW.1.1</i>	66.4	3.3	3.18	0.07	BIO	<i>BIOD.1.1</i>	61.6	3.3	1.87	0.11
	<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>BIOW.10.2</i>	49.3	9.2	-5.28	0.20						
	<i>BIOW.12.1</i>	10.9	3.2	-2.89	0.06						
	<i>BIOW.12.2</i>	79.2	7.3	4.45	0.16						
	<i>BIOW.16.1</i>	169.5	4.1	-6.68	0.23						
HW	<i>HWW.5.1</i>	86.9	4.3	1.47	0.17	HW	<i>HWD.1.1</i>	64.4	11.5	1.52	0.24
	<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>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>HWW.15.1</i>	26.4	3.0	1.75	0.13		<i>HWD.10.1</i>	169.4	5.6	-1.17	0.11
							<i>HWD.16.1</i>	91.3	7.8	-1.19	0.15
							<i>HWD.16.2</i>	143.0	6.9	1.15	0.14
GYP	<i>GYPW.5.1</i>	87.5	4.0	1.87	0.20	GYP	<i>GYPD.4.1</i>	80.5	10.6	0.90	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>GYPD.13.1</i>	0.0	3.3	0.49	0.05
	<i>GYPW.14.1</i>	73.8	15.6	1.68	0.40		<i>GYPD.14.1</i>	75.3	4.7	1.14	0.31
							<i>GYPD.16.1</i>	22.0	6.5	0.89	0.15

Table 4 QTL detected for yield-related traits in the field condition under two water treatments

Irrigated						Non-irrigated					
Trait	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²	Trait	QTL	Position (cM)	LOD	Additive effects	R ²
DSF	<i>DSFI.1.1</i>	66.4	7.5	-1.95	0.14	DSF	<i>DSFN.7.1</i>	12.4	3.0	-1.75	0.11
	<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>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>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>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>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>DSFI.17.1</i>	130.8	5.9	1.68	0.12						
LN	<i>LNI.3.1</i>	44.3	3.1	1.11	0.05	LN	<i>LNN.3.1</i>	44.3	5.0	2.02	0.10
	<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>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>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>LAFI.7.1</i>	20.7	4.6	-381	0.09	LAF	<i>LAFN.3.1</i>	19.2	3.6	252	0.06
	<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>LAFI.12.1</i>	79.2	3.4	330	0.07		<i>LAFN.7.1</i>	20.7	7.7	-416	0.15
						<i>LAFN.7.2</i>	34.7	3.3	-270	0.07	
						<i>LAFN.11.1</i>	0.0	3.6	-252	0.07	
						<i>LAFN.13.1</i>	2.0	3.7	-297	0.10	
LAD	<i>LADI.1.1</i>	42.9	4.9	-9573	0.07	LAD	<i>LADN.1.1</i>	50.9	3.0	-12005	0.05
	<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>LADI.4.1</i>	44.2	10.2	15529	0.16		<i>LADN.10.1</i>	49.6	3.4	-12300	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>LADI.7.1</i>	21.6	3.1	-7011	0.04						
	<i>LADI.10.1</i>	0.0	5.0	-14286	0.17						
PH	<i>PHI.4.1</i>	44.2	4.0	5.04	0.05	PH	<i>PHN.7.1</i>	12.4	4.7	-6.63	0.12
	<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>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>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>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>BIOI.3.1</i>	0.0	4.9	-13.60	0.09	BIO	<i>BION.1.1</i>	50.9	4.8	-16.13	0.07
	<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>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>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>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>BIOI.10.1</i>	135.9	3.0	-14.33	0.05						
HW	<i>HWI.3.1</i>	0.0	6.3	-7.53	0.10	HW	<i>HWN.2.1</i>	100.6	4.9	-5.36	0.07
	<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>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>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>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>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>GYPI.3.1</i>	21.2	4.4	3.59	0.07	GYP	<i>GYPN.2.1</i>	98.6	9.2	-5.75	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>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>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>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

Foot note for tables 3 and 4

The traits are: days from sowing to flowering (DSF), number of leaf per plant (LN), leaf area at flowering (LAF; cm²), leaf area duration (LAD; cm² days), plant height (PH; cm), total dry matter (BIO; g), head weight (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 'NI' for irrigated and non-irrigated (rainfed) in the field.

^a: The common QTLs across water treatments were shown as *bold-face*

Table 5

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 [16].

Linkage group	Agronomical traits in the present study	Water status traits and osmotic adjustment (Poormohammad Kiani et al. 2007)	Overlapped QTLs
LG1	Leaf area at flowering Leaf area duration	Turgor potential (Ψ_t), Osmotic potential (Ψ_s)	'LAFD.1.1', 'LADD.1.1' 'TP.WS.1.1', '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 Head weight Leaf number per plant Leaf area at flowering	Osmotic adjustment (OA), Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}), Relative water content (RWC), Leaf water potential (Ψ_w)	'YPW.5.1', 'LNN.5.2', 'LAFNN.5.1', 'HWW.5.1', 'OA.5.2', 'OPF.WS.5.1', 'RWC.WS.5.1', 'RWC.WW.5.1', 'LWP.WS.5.1'
LG6	Leaf area duration	Relative water content (RWC), Turgor potential (Ψ_t)	'RWC.WW.6.1', 'TP.WW.6.1', 'LADI.6.1'
LG7	Several traits (Fig. 1)	Turgor potential (Ψ_t)	'several QTLs (Fig. 1)', 'TP.WS.7.1'
LG7	Leaf number per plant	Leaf water potential (Ψ_w), Relative water content (RWC)	'LWP.WS.7.1', 'RWC.WS.7.1', '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 Head weight	Turgor potential (Ψ_t), Osmotic adjustment (OA)	'YPI.12.1', 'HWI.12.1', '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 Leaf area duration	Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}), Turgor potential (Ψ_t), Leaf water potential (Ψ_w), Relative water content (RWC)	'YPD.16.1', 'LADW.16.1', 'LADD.16.1', 'OPF.WS.16.1', 'OPF.WS.16.2', 'OPF.WW.16.1', 'TP.WS.16.1', 'LWP.WS.16.1', 'RWC.WS.16.1'
LG16	Days from sowing to flowering	Leaf water potential (Ψ_w), Relative water content (RWC), Osmotic potential (Ψ_s), Osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT})	'DSFD.16.1', 'LWP.WS.16.2', 'RWC.WS.16.2', 'OP.WS.16.1', 'OPF.WS.16.2'
LG16	Leaf number per plant	Turgor potential (Ψ_t)	'LNI.16.2', 'LNN.16.1'
LG16	Total dry matter (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'

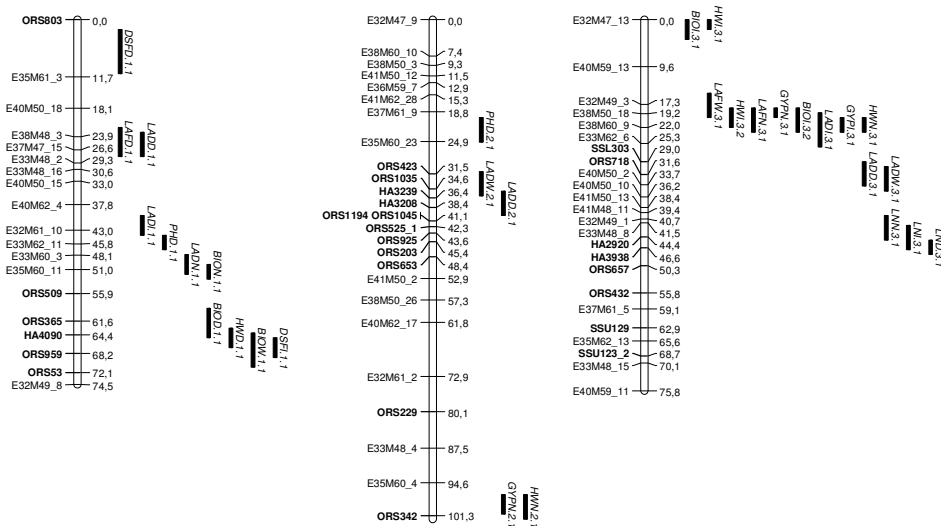
Fig. 1 Genetic linkage map and the positions of QTLs for the studied traits under different conditions. The QTLs were designated as the abbreviation of the trait followed by ‘W’ or ‘D’ for well-watered or water-stressed in the greenhouse, and by ‘I’ and ‘NI’ for irrigated and non-irrigated (rainfed) in the field.

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

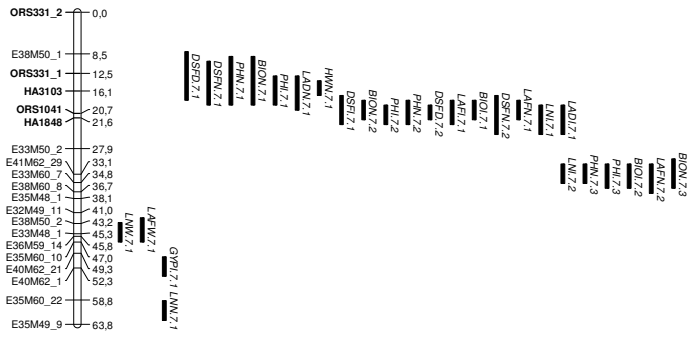
LG1

LG2

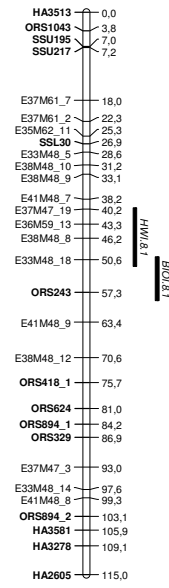
LG3



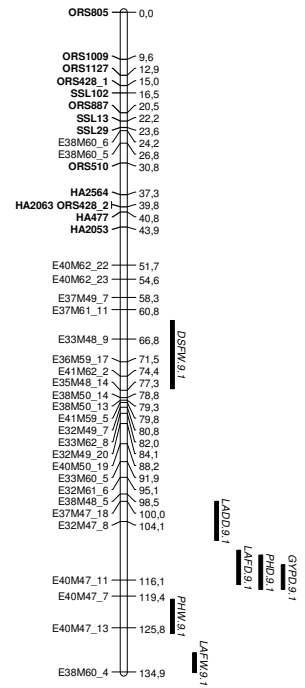
LG7



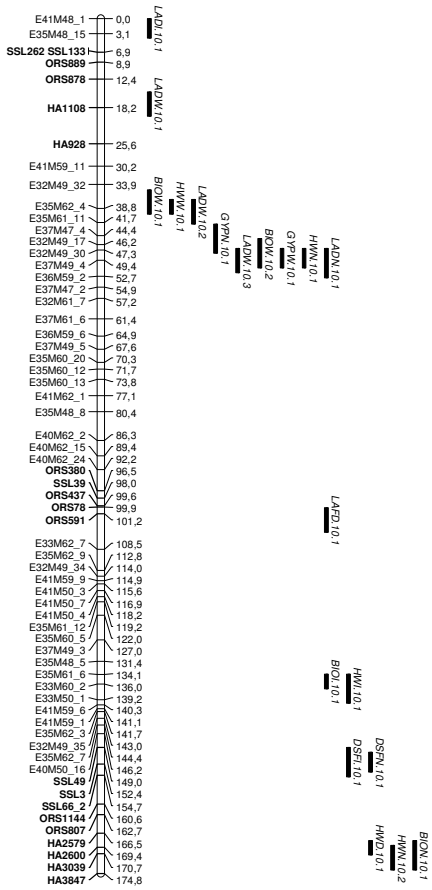
LG8



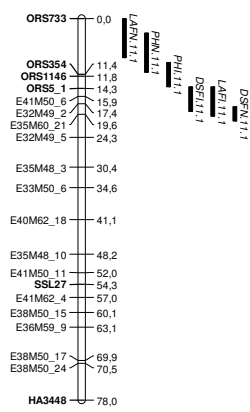
LG9



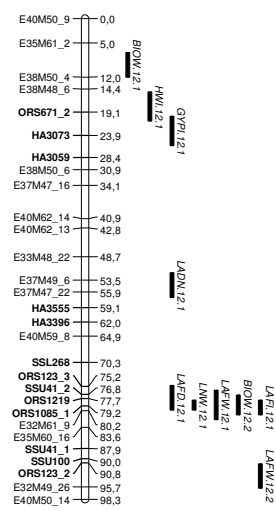
LG10



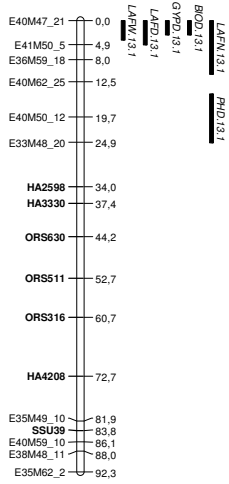
LG11



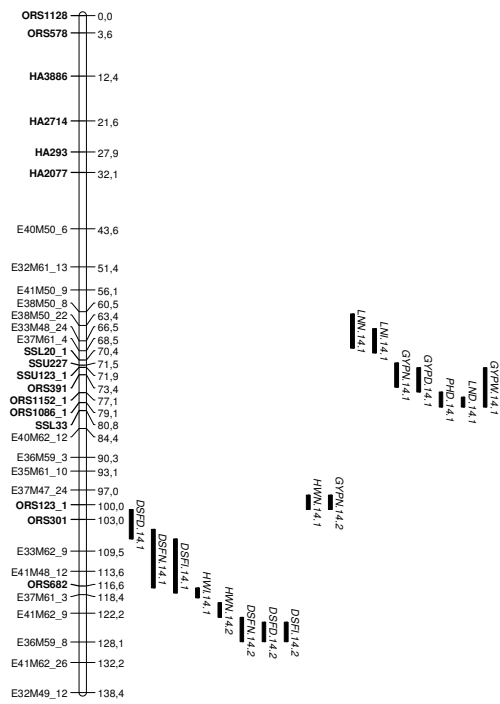
LG12



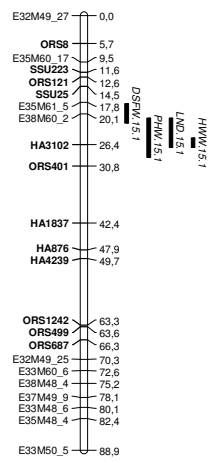
LG13



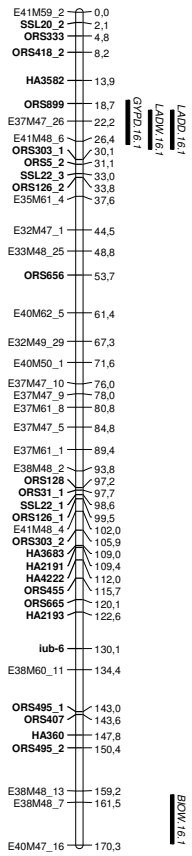
LG14



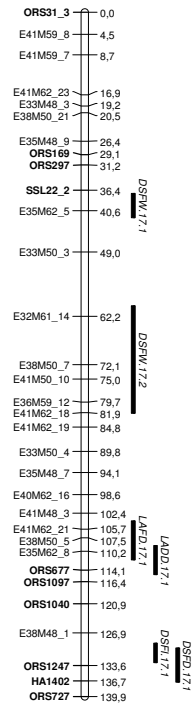
LG15



LG16



LG17



3.2. Synthèse des résultats et conclusion

3.2.1. Variation phénotypique des géotypes

L'analyse de variance effectuée sur les 78 lignées recombinantes (LIRs) cultivées en serre révèle un effet significatif du traitement hydrique pour la teneur en eau relative (RWC), le potentiel hydrique foliaire (Ψ_w), le potentiel osmotique (Ψ_s), le potentiel de turgescence (Ψ_t), le potentiel osmotique à pleine turgescence (Ψ_{sFT}) et l'ajustement osmotique (AO). La différence entre les lignées recombinantes est hautement significative pour tous les caractères étudiés. On note aussi des interactions 'géotype \times traitement hydrique' significatives ce qui indique une réponse différente à la sécheresse pour les géotypes étudiés. Le stress hydrique a également induit l'accumulation d'osmolytes (ajustement osmotique) dans les cellules des lignées recombinantes en condition de serre (Article 1, Tableau 1).

L'analyse de variance effectuée sur 100 lignées recombinantes (LIRs) cultivées au champ montre qu'il n'existe pas un effet significatif du traitement hydrique sur la teneur en eau relative 'RWC'. Par contre nous avons observé un ajustement osmotique (0.10 MPa) en réponse à la sécheresse (condition non irriguée). Ces résultats montrent que les conditions pédoclimatiques au champ n'ont pas permis d'imposer une contrainte hydrique aussi sévère qu'en serre à la floraison. Nous avons noté une différence significative entre les lignées recombinantes pour les caractères d'états hydriques. Une forte ségrégation transgressive a été observée pour tous les caractères concernant l'état hydrique étudiés en serre et au champ, et dans les deux conditions de traitements hydriques. La ségrégation transgressive serait le résultat de l'accumulation d'allèles positifs venant de différentes lignées parentales (ces résultats ne sont pas présentés dans les articles).

L'analyse de variance effectuée sur les lignées recombinantes (LIRs) cultivées en serre relève un effet significatif du traitement hydrique pour l'ensemble des caractères morphologiques et agronomiques étudiés excepté pour la précocité de floraison (DSF) et le nombre de feuilles par plante (LN) (Article 2, Tableau 1). Contrairement à la situation en serre, la différence entre les deux traitements hydriques (irrigué et non-irrigué) est significative seulement pour la masse du capitule (HW) et le rendement par plante (GYP) au champ. Ce résultat s'explique par le fait que la contrainte hydrique au champ a été imposée à un stade plus tardif de

développement (post-floraison) comparativement à la situation en serre (préfloraison). La différence entre les lignées recombinantes est hautement significative pour tous les caractères étudiés. L'interaction significative 'traitement hydrique × génotype' pour quelques caractères suggère des réponses différentes des génotypes à la contrainte hydrique. Nous avons noté que la différence entre les deux parents est significative pour LAD, PH, BIO et HW dans les deux conditions de traitements hydrique au champ, et pour LAF et LAD dans les deux conditions hydriques en serre. Par contre, pour les autres caractères (comme DSF, HW et GYP), bien qu'il n'existe pas de différences significatives entre les deux lignées parentales, on observe des différences significatives entre les lignées. Nous pouvons formuler l'hypothèse que les allèles contrôlant ces caractères sont répartis chez les deux parents. Une telle ségrégation transgressive a été déjà observée pour des caractères d'intérêt agronomique chez le tournesol (Rachid Al-Chaarani et al. 2004 ; Mokrani et al. 2002) (Article 2, Tableau 1).

3.2.2. Amélioration de la carte génétique

Dans notre laboratoire, Flores Berrios et al. (2000a) ont construit une carte génétique en utilisant des marqueurs d'AFLP et 99 lignées recombinantes issues du croisement entre 'PAC2' et 'RHA266'. Par la suite, cette carte génétique a été complétée en y ajoutant d'autres marqueurs (Rachid Al-Chaarani et al. 2004). Nous avons amélioré cette carte pour établir une nouvelle carte génétique basée sur 191 SSRs et 304 AFLPs (Article 1, Tableau 4). Cette carte a 1824.7 cM de longueur et une densité d'un marqueur par 3.7 cM. Les groupes de liaisons ont été nommés en comparant les positions des SSRs communs entre notre carte et la carte génétique référence du tournesol construit par Tang et al. (2002) avec 459 SSRs. Les marqueurs, distribués sur tous les groupes de liaisons de notre carte, permettent une « cross-reference » complète avec d'autres cartes SSR/INDELs et SSR/SNP (Yu et al. 2003 ; Lai et al. 2005). L'incorporation de 157 nouveaux SSR dans notre carte a permis d'augmenter la puissance de détection de QTLs pour les différents caractères analysés dans la présente étude. Par ailleurs, cette nouvelle carte a l'avantage de présenter un nombre de groupes de liaison (17) égal au nombre de chromosomes (17) du tournesol, ce qui n'était pas le cas pour la carte précédemment (Rachid Al-Chaarani et al. 2004) développée dans notre laboratoire. Nous pouvons noter que notre carte actuelle est un outil génétique important pour l'analyse des caractères quantitatifs et qualitatifs chez *Helianthus annuus*.

3.2.3. QTLs associés aux caractères physiologiques et agronomiques

identifiés en différentes conditions

Pour l'ensemble des caractères concernant l'état hydrique étudiés le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL se situe entre 6% et 29% (Article 1, Tableau 5 et 6). Les phénotypes transgressifs observés pour quelques paramètres peuvent être expliqués par la présence de QTLs de signes opposés chez les parents. Dans de nombreux cas, un QTL s'est avéré être associé à plusieurs caractères. Par exemple, des QTLs ont été détectés dans la condition non irriguée sur le groupe de liaison 5 pour Ψ_w , RWC, Ψ_{sFT} et AO, le groupe de liaison 7 pour Ψ_w et RWC, et le groupe de liaison 16 pour Ψ_w , RWC, Ψ_s et Ψ_{sFT} (Article 1, Figure 1). Cette co-localisation des QTLs indique l'existence d'une base génétique commune pour les caractères étudiés, pouvant être due à des effets pléiotropiques ou à des locus étroitement liés.

La région chromosomique la plus importante pour l'ajustement osmotique est située sur le groupe de liaison 5 où un QTL pour l'AO (OA.5.2) est co-localisé avec d'autres QTLs d'état hydrique. Ce QTL explique 29% de la variance phénotypique de l'AO et également 10%, 8% et 18% de la variance phénotypique de Ψ_w , RWC et Ψ_{sFT} sous contrainte hydrique respectivement. Il explique également 25% de la variance phénotypique de RWC dans des conditions bien irriguées. Les allèles favorables pour les QTLs de Ψ_w , RWC et Ψ_{sFT} viennent du parent 'RHA266', tandis que pour le QTL de l'AO, les allèles favorables viennent du parent 'PAC2'. Ceci peut expliquer la corrélation négative entre l'AO et RWC et le Ψ_w , car l'AO se produit en réponse à une diminution du potentiel hydrique foliaire (Ψ_w) et de la teneur relative en eau RWC (Morgan 1983 ; Ober et al. 2005 ; Chimenti et al. 2002). L'AO conduit à un abaissement du potentiel osmotique (Ψ_s) en raison de l'accumulation nette de solutés dans les cellules en réponse au déficit hydrique, et permet de maintenir un potentiel de turgescence plus élevé (Ψ_t). Le maintien de la turgescence au cours du déficit hydrique contribue à limiter les effets négatifs du stress hydrique sur la conductance stomatique et la photosynthèse (Maury et al. 2000 ; Chimenti et al. 2002). Ces travaux montrent que l'AO contribue à la tolérance à la sécheresse chez tournesol et Chimenti et al. (2002) suggèrent l'intérêt de développer des marqueurs moléculaires pour ce critère. Nos travaux ont permis de localiser précisément des QTLs contrôlant l'AO et des caractères associés chez le tournesol.

La majorité des QTLs identifiés pour les caractères étudiés sont spécifiques aux conditions de

traitements hydriques, mais un nombre limité de QTLs sont communs aux deux conditions de traitements hydriques. Les effets différentiels des QTLs dans les deux traitements hydriques peuvent expliquer des interactions 'génotype x traitement hydrique' significatives (Beavis & Kim 1996).

En ce qui concerne les caractères agronomiques, pour l'ensemble des 8 paramètres étudiés, le pourcentage de la variance phénotypique (R^2) expliquée 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 (Article 2, Tableau 3 et 4).

Dans de nombreux cas, un QTL s'est avéré être associé à plusieurs caractères dans les différentes conditions (champ et serre ; bien-irriguée et stressé). Par exemple, les intervalles 'E38M50_1-HA1848' et 'E41M62_29-E38M60_8' dans le groupe de liaison 7 sont associés à LN, LAF, LAD, PH, DSF, HW et BIO dans les différentes conditions étudiées., suggérant l'existence d'une base génétique 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 2, Tableau 3 et 4). Par exemple, 5 QTLs liés au rendement par plante (GYP) et ceux associés au 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 (*GYP1.7.1*). Le co-localisations 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 (Rachid-Al-Chaarani et al. 2004 ; Bert et al. 2003 ; Mokrani et al. 2002)

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 et stressé en serre et au champ). Ce QTL est co-localisé avec les QTLs contrôlant le nombre de feuilles par plante (LN) et la hauteur (PH) des plantes. Ce résultat confirme les relations entre rendement et l'architecture des plantes. Nous observons

également ce phénomène pour d'autres caractères comme BIO, LAD, LAF et LN sur les groupes de liaisons 1, 2 et 3 (Article 2, Figure 1).

3.2.4. Comparaison des QTLs des caractères adaptatifs avec ceux des caractères agronomiques

Nous avons comparé la position de QTLs associés aux paramètres d'adaptation des plantes au stress hydrique avec ceux associés aux caractères agronomiques (Article 2, Tableau 5). Les résultats montrent que plusieurs QTLs se trouvent dans la même région chromosomique. Par exemple, les quatre QTLs liés aux différents caractères morphologiques et au rendement par plante (*YPW.5.1*, *HWW.5.1*, *LNN.5.2* et *LAFN.5.1*) sont tous situés dans la même position 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 16 et 7 (Article 2, Tableau 5). Ce dernier montre une co-localisation entre potentiel 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. Elles sont situées sur les groupes de liaisons 5, 12 et 16. Les résultats de cette partie montrent que des régions génomiques peuvent être associées à la fois à la tolérance à la sécheresse et aux caractères agronomiques

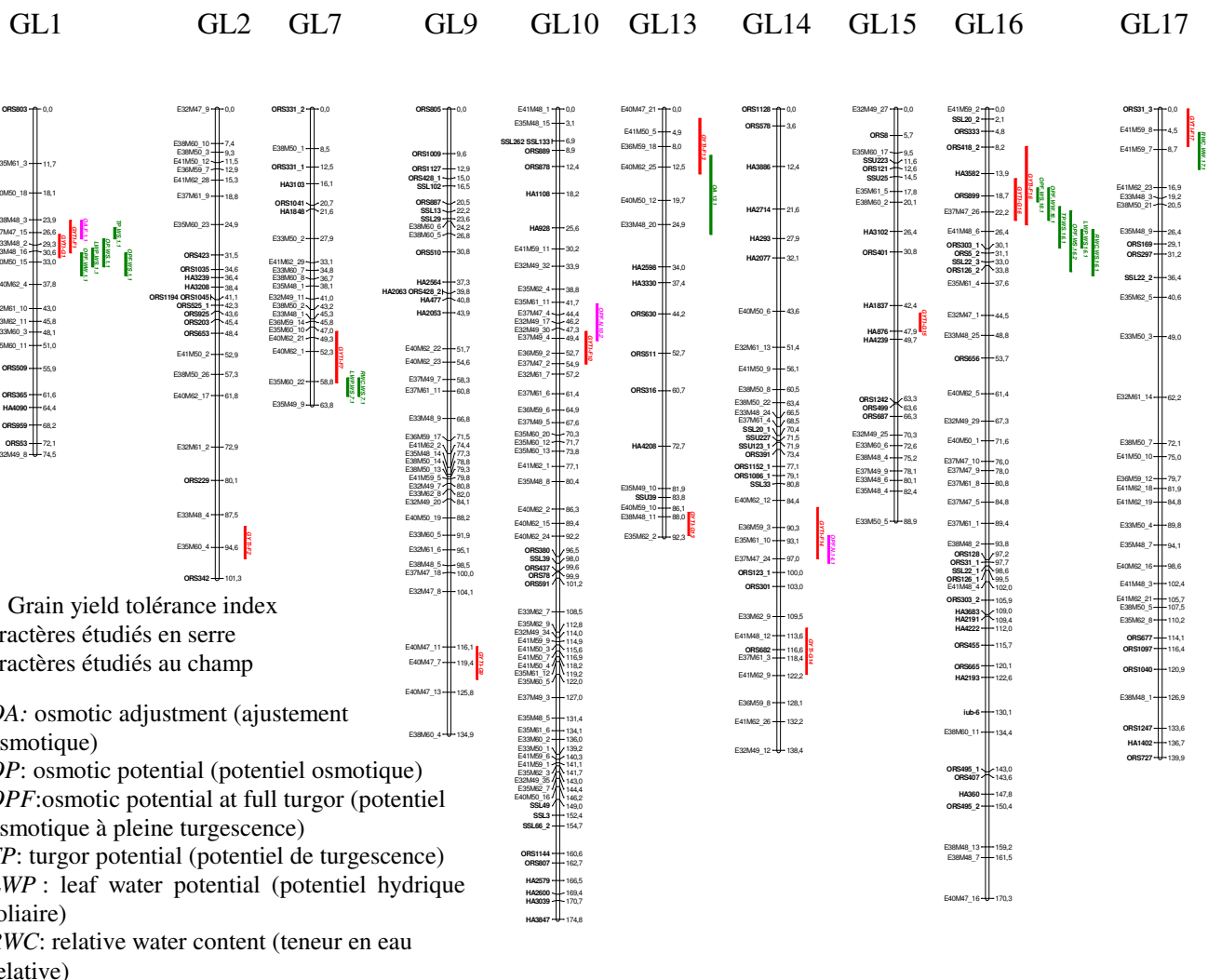
En conclusion, nous avons amélioré la carte génétique du tournesol développée dans notre laboratoire par l'intégration de 157 nouveaux marqueurs SSRs. Cette carte complète les cartes publiques SSR/INDELs et SSR/SNP (Yu et al. 2003 ; Lai et al. 2005) pour l'analyse des caractères quantitatif et qualitatif chez *Helianthus annuus* L. Nous avons étudié la base génétique de l'association entre différents caractères par l'analyse de co-localisation de QTLs.

Tableau 1. Les QTLs associés à l'indice de la tolérance.

Condition	QTL	Group de liaison	Position	LOD	Effet additif des gènes	R ²
Serre	<i>GYTI-G1^a</i>	1	29.2	3.3	-0.13	0.09
	<i>GYTI-G9</i>	9	119.3	3.8	-0.10	0.07
	<i>GYTI-G13</i>	13	92	3.9	-0.10	0.08
	<i>GYTI-G14</i>	14	116.5	4.6	0.11	0.09
	<i>GYTI-G15</i>	15	46.4	5.5	0.17	0.18
	<i>GYTI-G16^a</i>	16	18.7	5.3	0.13	0.14
Champ	<i>GYTI-F1</i>	1	26.6	3.2	0.32	0.06
	<i>GYTI-F2</i>	2	94.6	3.2	0.08	0.05
	<i>GYTI-F7</i>	7	49.2	3.2	-0.16	0.07
	<i>GYTI-F10</i>	10	50.7	4.9	-0.16	0.09
	<i>GYTI-F13</i>	13	4.8	8.1	-0.24	0.18
	<i>GYTI-F14</i>	14	90.3	3.9	0.14	0.06
	<i>GYTI-F16</i>	16	15.8	5.3	0.16	0.10
	<i>GYTI-F17</i>	17	2.0	3.5	-0.13	0.07

^a Les QTLs colocalisés sur les groupes des liaisons 1 et 16

Figure 3. Co-localisation des QTLs associés à l'indice de la tolérance et ceux associés aux caractères adaptatifs



Cette étude nous a permis d'identifier des QTLs constitutif (communs aux différents environnements) et adaptatifs (spécifiques aux différents environnements) pour un grand nombre de caractères impliqués dans l'élaboration du rendement chez le tournesol. L'identification des régions génomiques liées aux caractères de l'état hydriques et à l'ajustement osmotique et également aux caractères agronomiques chez les lignées soumises à une contrainte hydrique sera utile pour le développement de programmes de sélection pour la tolérance du tournesol à la sécheresse.

3.2.5. QTLs associés à l'indice de la tolérance et leur co-localisation avec ceux associés aux caractères adaptatifs

Un indice de la tolérance à la sécheresse a été calculé à partir des valeurs du rendement par plante pour le traitement hydrique 'irriguée' et 'non irriguée' dans les conditions de la serre et du champ (rendement dans la condition 'non irriguée'/rendement dans la condition irriguée). Au total six et huit QTLs contrôlant l'indice de tolérance ont été identifiés dans les conditions de la serre et du champ, respectivement. Pour l'ensemble des QTLs le pourcentage de la variance phénotypique (R^2) expliquée varie entre 5% et 18%. Parmi ces QTLs, deux sont co-localisés sur les groupes de liaisons 2 et 16 (Tableau 1 et Figure 3, page en face).

Nous avons comparé la position des QTLs associés à l'indice de la tolérance au stress hydrique avec ceux associés aux paramètres d'adaptation (Figure 1). Les résultats montrent que sept QTLs associés à l'indice de la tolérance se trouvent dans la même position que certains QTLs associés aux caractères adaptatifs sur les groupes de liaisons 1, 7, 10, 13, 14, 16 et 17. Deux QTLs contrôlant l'indice de la tolérance à la sécheresse dans les conditions de la serre et du champ (*GYTI-F1* et *GYTI-G1*) sont co-localisés avec celui de l'ajustement osmotique au champ (*OA.F.1.1*) et avec les QTLs contrôlant potentiel de turgescence et potentiel hydrique foliaire, sur le groupe de liaison 1. Un autre QTL contrôlant l'indice de la tolérance à la sécheresse au champ (*GYTI-F13*) est co-localisé avec celui de l'ajustement osmotique en serre (*OA.13.1*) sur le groupe de liaison 13. On observe également une co-localisation entre les QTLs contrôlant potentiel de turgescence, potentiel hydrique foliaire et la teneur en eau relative avec les QTLs contrôlant l'indice de la tolérance à la sécheresse sur les groupes de liaisons 7 (*GYTI-F7*), 10 (*GYTI-F10*), 14 (*GYTI-F14*), 16 (*GYTI-G16* et *GYTI-F16*) et 17 (*GYTI-F17*).

Le stress hydrique diminue la croissance et la productivité des plantes, en ralentissant le taux de division et d'expansions de cellules principalement en raison d'une perte de turgescence liée à l'altération de l'état hydrique cellulaire. Les diminutions du potentiel hydrique foliaire (Ψ_w) et de la teneur en eau relative de la plante (RWC) observées en réponse à la contrainte hydrique conduisent à une diminution des capacités photosynthétiques chez le tournesol (Tezara et al. 2002).

Maintenir l'état hydrique de la plante est considéré comme un mécanisme adaptatif important pour maintenir l'activité physiologique au cours du déficit hydrique (Conroy et al. 1988). Ajustement osmotique est considéré très important pour son rôle positif dans le maintien de la turgescence lors de la déshydratation foliaire (Turner & Jones 1980; Maury et al. 2000; Ober et al. 2005). Nos résultats montrent que la capacité de la plante à maintenir la turgescence et l'ajustement osmotique en réponse à la contrainte hydrique et la tolérance à la sécheresse en terme de rendement peut avoir une base génétique commune. Cette base génétique commune montre l'importance des réponses adaptatives à la sécheresse pour l'amélioration du rendement chez le tournesol.

CHAPITRE IV : Variabilité génétique des réponses physiologiques à la sécheresse par analyse de l'expression différentielle des gènes chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.)

4.1. Introduction

Le stress hydrique, facteur limitant de la croissance des plantes et la production végétale, induit diverses réponses biochimiques et physiologiques chez les plantes. La teneur en eau relative (RWC) et le potentiel hydrique (Ψ_w) et ses composantes, potentiel de turgescence (Ψ_t) et potentiel osmotique (Ψ_s), sont des paramètres le plus employés pour évaluer l'état hydrique des plantes. Le maintien de la turgescence par l'augmentation de la concentration en solutés au niveau cellulaire, [l'ajustement osmotique (AO)], est probablement le mécanisme le plus important pour maintenir l'activité physiologique lors d'abaissement de potentiel hydrique (Ψ_w) (Morgan 1984 ; Ober et al. 2005). Lors d'un déficit hydrique, les paramètres d'échange gazeux, la transpiration (Tr) et plus particulièrement la photosynthèse nette (Pn), sont fortement affectée (Maury et al. 1996 ; Tezara et al. 2002). La réduction de la photosynthèse, liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, est supposée dépendre à la fois i) de la fermeture des stomates, avec pour conséquence une diminution de la conductance à la diffusion du CO₂, ii) d'une limitation biochimique du chloroplaste pour fixer le CO₂ (Graam & Boyer 1990), probablement associée à la régénération limitante du RuBP (Gimenez et al. 1992 ; Flexas & Medrano 2002). Lors d'un déficit hydrique modéré, la diminution de l'activité photosynthétique est principalement due à la fermeture de stomates (Pinheiro et al. 2004 ; Muller & Whitsitt 1996). Pour des déficits hydriques plus sévères, les contraintes biochimiques peuvent plus directement limiter la photosynthèse au niveau chloroplastique (Lawlor 1995). Une telle diminution de l'assimilation du CO₂ conduit à un excès d'énergie photochimique au niveau chloroplastique pouvant induire des phénomènes de photoinhibition (Maury et al. 1996). En effet, l'excès d'énergie peut avoir comme conséquence la production d'espèces actives d'oxygène (AOS) au sein du chloroplaste, qui est potentiellement dommageable pour le photosystème II (PSII) (Asada 1999).

Il est suggéré que la variabilité génétique de la résistance à la sécheresse est principalement liée à l'expression différentielle des gènes répondant à la sécheresse (krishnan et al. 1989 ; Joshi et al. 1997). Un grand nombre de gènes qui répondent à la sécheresse au niveau transcriptionnel ont été décrits dans la littérature (Bohnert et al. 1995 ; Ingram & Bartels 1996 ; Braillement 2002, 2004 ; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 1997, 1999, 2000 ; Seki et al. 2001, 2002; Watkinson et al. 2003; Oono et al. 2003; Boominathan et al. 2004). La caractérisation d'adaptations phénotypiques associées aux réponses moléculaires devraient

nous permettre d'évaluer plus précisément le rôle des changements de l'expression des gènes induits par le stress hydrique (Ouvard et al. 1996).

Dans ce cadre, cette partie de la thèse présente deux travaux de recherches. Ces travaux ont été réalisés sur quatre LIRs retenues sur la base de leurs réponses contrastées à la sécheresse et leurs lignées parentales (PAC-2 et RHA-266). Une caractérisation de l'état hydrique foliaire et des processus photosynthétiques ainsi qu'une analyse de l'expression différentielle de 16 gènes associés au stress hydrique ont été réalisés sur ces 6 géotypes placés en conditions d'alimentation en eau non limitant et en situation de contrainte hydrique. Un premier travail a été plus spécifiquement axé sur les caractères de l'état hydrique des plantes (la teneur en eau relative, le potentiel hydrique foliaire et le potentiel de turgescence) et les échanges gazeux (photosynthèse et conductance stomatique), avec une analyse de l'expression différentielles de gènes plus spécifiquement impliqués dans des mécanismes d'osmorégulation comme les aquaporines, déhydrines....Un deuxième travail a consisté à analyser le fonctionnement photochimique de la photosynthèse et l'expression différentielle de gènes impliqués dans protection contre le stress oxydatif. Les associations entre ces adaptations phénotypiques et l'expression des différents gènes ont été évaluées afin de déterminer le rôle putatif de ces gènes dans l'adaptation à la sécheresse. Ensuite, pour les différents géotypes analysés, le rapport possible entre l'expression des gènes et les effets positifs ou négatifs d'allèles de régions génomiques (QTLs) ont été étudiés.

Ces résultats ont fait l'objet des deux articles suivants:

1) Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentbittel L, Sarrafi A (2007) Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Theoretical and Applied Genetic 114: 193-207

2) Poormohammad Kiani S, Maury P, Grieu P, Sarrafi A (2007) Chlorophyll fluorescence variation and differential expression of antioxidant genes under well-watered and water-stressed conditions in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Science (soumis)

Genetic variability for physiological traits under drought conditions and differential expression of water stress-associated genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

S. Poormohammad Kiani · P. Grieu · P. Maury · T. Hewezi ·
L. Gentzbittel · A. Sarrafi

Received: 24 February 2006 / Accepted: 30 September 2006 / Published online: 14 November 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Genotypic variation for water status and gas exchange parameters under different water treatments (well-watered and water-stressed plants before and after rehydration) were investigated in a population of recombinant inbred lines (RILs) of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Afterwards, four RILs and parental lines presenting contrasting responses to dehydration and rehydration were selected to determine the differential expression of four water-stress associated genes: aquaporin, dehydrin, leafy cotyledon1-like protein and fructose-1,6 biphosphatase. Water stress revealed a high genetic variability for water status and gas exchange parameters when compared with well-watered genotypes. Genetic gain when selected RILs were compared with the best parent was significant for most traits due to transgressive segregation. QTL mapping and graphical genotyping showed that RILs carrying different genomic regions for some QTLs presented also physiological different

characteristics as well as gene expression patterns. The expression level of aquaporin genes in leaves of four RILs and their parents was down regulated by water stress and was associated with relative water content (RWC). Down-regulation was also associated with genomic regions having alleles with negative effects on plant water status. The level of dehydrin transcripts increased in leaves of all studied RILs in response to water stress. Transcript accumulations of dehydrin and leafy cotyledon1-like genes, likely involved in protective tolerance processes, were not correlated directly with plant water status or QTL effects. Down-regulation of fructose-1,6 biphosphatase was observed under water stress. Net photosynthesis rate (P_n) and the fructose-1,6 biphosphatase gene expression levels were associated mainly after rehydration. This phenomenon indicates an association between physiological response to water stress and differential expression of water-stress related genes.

Communicated by D. A. Lightfoot.

S. Poormohammad Kiani · P. Grieu · P. Maury
UMR 1248 INRA-INPT/ENSAT,
Agrosystèmes Cultivés et Herbagers (ARCHE),
BP 52627, Castanet Tolosan 31326, France

T. Hewezi
Department of Plant Pathology, Iowa State University,
Ames, IA, USA

S. Poormohammad Kiani
L. Gentzbittel · A. Sarrafi (✉)
Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes
(BAP), IFR 40, INP-ENSAT, BP 32607, 18 Chemin de
Borde Rouge, Castanet Tolosan 31326, France
e-mail: sarrafi@ensat.fr

Introduction

Water stress, the most limiting factor of plant growth and crop production, induces various biochemical and physiological responses in plants. Water stress decreases plant growth by slowing the 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. Relative water content (RWC) and water potential (Ψ_w) and its components, turgor potential (Ψ_t) and osmotic potential (Ψ_s), are parameters most commonly used to assess plant water status. Turgor maintenance by means of increases in cell

solute concentration, osmotic adjustment (OA), is probably the most important mechanism for maintaining physiological activity as water potential (Ψ_w) falls (Morgan 1984; Ober et al. 2005). Gas exchange parameters, transpiration (Tr) and net photosynthesis (P_n), regulated by stomatal conductance (g_s), decrease as water stress increases in sunflower (Tezara et al. 2002). Stomata are mainly sensitive to leaf water status, tending to close with decreasing leaf water potential. Moreover, water stress can also limit net photosynthesis by metabolic impairment of CO_2 fixation, leading to an increase of the intercellular CO_2 concentration (C_i) (Flexas and Medrano 2002). In sunflower, different water stress treatments decrease relative water content (RWC), leaf water potential (Ψ_w) and osmotic potential (Ψ_s), resulting in progressive and significant decline in stomatal conductance (g_s) and net photosynthesis (P_n) (Tezara et al. 2002; Maury et al. 1996). Genetic variation and QTL mapping has been reported for photosynthesis and water status traits under well-watered conditions in sunflower (Hervé et al. 2001). Variation was also observed for osmotic adjustment in sunflower genotypes under water stress (Jamaux et al. 1997). As far as we know, the genetic bases of physiological traits associated with drought tolerance in sunflower have not yet been reported.

Genetic variability in the stress response has been suggested to be mainly due to the differential expression of stress-responsive genes (Krishnan et al. 1989; Joshi et al. 1997). The interface between the expression of stress responsive genes and plant physiological response to drought stress is critical for translating molecular genetics into advances in crop production under stress conditions (Bruce et al. 2002). A large number of genes have been described that respond to drought at the transcriptional level and the mechanisms of the molecular response to water stress in higher plants have been analyzed by studying the expression of genes responding to drought and other abiotic stresses (Bohnert et al. 1995; Ingram and Bartels 1996; Bray 2002, 2004; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 1997, 1999, 2000; Seki et al. 2001, 2002; Watkinson et al. 2003; Oono et al. 2003; Boominathan et al. 2004). Stress-inducible genes have been also used to improve the stress tolerance of plants by gene transfer (Holmberg and Bülow 1998; Bajaj et al. 1999). It is thus critical to study the functions of stress-induced genes to understand the mechanisms involved in stress tolerance in plants. Correlating phenotypic adaptations with molecular responses should enable us to evaluate the role of drought-induced changes in gene expression during adaptation. Indeed, linking the

expression of a gene to a high degree of tolerance suggests a possible role for this gene in adaptation (Ouvard et al. 1996).

In the present study, among the different ways in which sunflower can maintain physiological activity as water stress increases, relative water content, turgor maintenance and protective tolerance processes were investigated in 38 recombinant inbred lines (RILs). Based on the genetic characteristics of the RILs, four RILs and parental lines presenting contrasting responses to dehydration and rehydration were selected to determine the differential expression of four water-stress associated genes. Plant water status characters (relative water content, leaf water potential and turgor potential) and their effects on gas exchange (photosynthesis and stomatal conductance), as the water stress phenotypic adaptation parameters, were evaluated in the selected RILs and their parents. The putative correlations between these phenotypic adaptations and the expression of four selected genes (aquaporin, fructose-1,6 bisphosphatase, dehydrin and leafy cotyledon1-like protein) were also evaluated in order to determine their putative role in adaptation. Among these four genes, an aquaporin gene (*suntip7*), which is expressed in guard cells of sunflower during the phase of stomatal closure, (Sarda et al. 1997) has been chosen because of its direct involvement in plant water status (Sarda et al. 1999; Luu and Maurel 2005; Jang et al. 2004). Fructose-1,6 bisphosphatase (*cFB-Pase*) is a key enzyme of the photosynthetic carbon reduction cycle and extremely sensitive to H_2O_2 produced under stress (Charles and Halliwell 1981). Reduced fructose-1,6 bisphosphatase leads to a reduction in photosynthesis activity (Zrenner et al. 1996). Therefore a part of photosynthesis reduction under water stress may be due to change in fructose-1,6 bisphosphatase gene expression. The dehydrin gene used in our experiment (*HaDhn1*) is a gene of the *D-11* subgroup of late-embryogenesis-abundant (LEA) proteins (Dure et al. 1989; Close et al. 1993), which is correlated with drought tolerance in sunflower (Ouvard et al. 1996; Cellier et al. 1998). The fourth gene (*HaLIL*) used in the present study is a sunflower gene encoding leafy cotyledon1-like protein (Fambrini et al. 2006). Leafy cotyledon is a regulator of late-embryogenesis-abundant proteins (LEA), which are involved in drought and salt tolerance (Parcy et al. 1997; Reid and Walker-Simmons 1993; Moons et al. 1995). Therefore they might be involved directly in drought tolerance or via changes in LEAs (dehydrins) during vegetative growth stages. The putative association of these four genes with phenotypic adaptation (plant water status and photosynthesis) was evaluated.

Finally, for each selected genotype (RILs and parents), the possible relationship between genomic regions with positive or negative allele effects and transcript abundance was investigated.

Materials and methods

Plant material

The 38 recombinant inbred lines (RILs) used in this experiment are F9 pure lines coming from a population of 150 RILs which were developed through single seed descent from F₂ plants derived from a cross between ‘PAC-2’ and ‘RHA-266’. RILs and their parents were grown in the greenhouse under controlled conditions. Plants were individually grown in plastic pots (4.0l) containing a mixture of 40% soil, 40% compost and 20% sand. Temperature was maintained at 25/18 ± 2°C (day/night) and relative humidity was about 65–85 ± 5%. Supplementary light giving an approximately 16 h light period and 8 h dark period was maintained during experiment. The experiment consisted of three blocks, and each block was split into two main plots (well-watered and water-stressed). Three plants per genotype were cultivated in each main plot and randomly allocated at the beginning of the experiment.

Four genotypes contrasting in their response to water stress and their two parental lines were used for gene expression analysis by real-time RT-PCR in order to determine putative relationships between plant physiological response and genomic regions with positive or negative allele effects as well as with water stress-induced gene expression.

Water stress treatments

Water deficit was induced in 45-day-old plants near the stage R1 (Schneiter and Miller 1981), with the 14th true leaf fully expanded, for a period of 12 days. Both well-watered and water-stressed plants were weighed and water loss replaced carefully. Well-watered (control) plants received sufficient water to maintain soil water content close to pot capacity. Water-stressed plants were subjected to a progressive water stress and irrigated with a water volume of 60, 50, 40 and 30% of pot capacity during 12 days with weighing and replacing of the lost water volume. After 12 days of differential watering, plants were not watered the following morning and the physiological measurements were made that day. When measurements were finished, a young fully expanded leaf was harvested from well-watered and water-stressed plants, frozen in liquid

nitrogen, and stored at –80°C for RNA extraction and gene expression analysis. Both well-watered and water-stressed plants were rehydrated close to pot capacity after physiological measurements. Thirty-six hours after rehydration, photosynthesis and related traits (gas exchange parameters) were measured. A young fully expanded leaf was again harvested from each plant for RNA extraction.

Physiological traits

Leaf water potential (Ψ_w) was measured with a pressure chamber (Model 3000, Soil Moisture Equipment Crop, Santa Barbara, CA, USA; Scholander et al. 1965) on the last fully expanded leaf (around leaf number 15) for each individual plants. After the measurement of Ψ_w , relative water content (RWC) was determined ($RWC = \frac{F_w - D_w}{T_w - D_w}$), where F_w is fresh weight, T_w is turgid weight after 24 h rehydration at 4°C in a dark room by placing the petioles in a container with distilled water, and D_w is dry weight after oven drying for 24 h at 80°C. In all cases half the lamina of the sampled leaf was used for RWC determination (lamina with midrib vein) and the remaining half (without the midrib vein) was used for measurement of leaf osmotic potential (Ψ_s). Leaf turgor potential was also determined ($\Psi_t = \Psi_w - \Psi_s$). Both leaf osmotic potential (Ψ_s) and osmotic potential at full turgor (Ψ_{sFT}) were measured on expressed sap of frozen and thawed leaves using 10 µl aliquots placed in an osmometer (Wescor Model 5520, Logan, UT, USA) calibrated with manufacturer solutions. Osmotic potentials (Ψ_s) were determined by converting the osmometer reading (in 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 the rehydration method (Blum 1989), with the following equation: $OA = \Psi_{sFT(WW)} - \Psi_{sFT(WS)}$, where OA is osmotic adjustment, $\Psi_{sFT(WW)}$ 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.

Measurements of gas exchange were done with a portable Li-6400 photosynthesis system (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) between 10 and 14 h. Leaves at the same position as that sampled for RWC were used for gas exchange measurements. Measurements of net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (g_s) and intercellular CO₂ concentration were made at light-saturation of 1,500 µmol m⁻² s⁻¹ photosynthetic

photon flux density (PPFD), ambient CO₂ concentration (approximately 400 μmol mol⁻¹), leaf temperature controlled at 25 ± 2°C and with relative humidity of 60 ± 5%.

Statistical analysis

Physiological trait data were analyzed by ANOVA and GLM with SAS v.8.0 for PC (SAS Institute Inc, NC, USA). Comparison of mean treatments was made with a GLM and the LSD test for a priori pair wise comparisons (all treatment means versus control) and SNK test for comparison of the means of other parameters.

QTL mapping

An AFLP and SSR genetic linkage map developed by our department (Al-Chaarani et al. 2004) was used to map QTLs involved in the expression of water status traits (RWC, Ψ_w, Ψ_s, Ψ_t and OA) as well as net photosynthesis rate (P_n) under water stress before rehydration. The QTL mapping of the studied traits was performed by composite interval mapping (CIM), using QTL Cartographer, version 1.16 (Basten et al. 2002). GGT software (Van Berloo 1999) was then used to create a “graphical genotype” for each offspring, to show how chromosome segments at each QTL locations were inherited from each parent. Graphical genotypes were used to show the differences among four selected RILs for RT-PCR in term of chromosomal segments at QTL positions.

RNA extraction and cDNA synthesis

Young fully expanded leaves, harvested from each treatment combination (well-watered and water-stressed plants before and after rehydration) were frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. For each treatment combination, the leaves collected from three plants were pooled in one sample prior to RNA preparation. The pooled leaf samples were used to

extract total RNA as described by Verwoerd et al. (1989). Three biological repeats were performed. Single-stranded cDNA was synthesized from DNase-treated RNA using the Advantage RT-for-PCR Kit (Ozyme). The reaction mixture containing 5 μg of total RNA and 40 pMol oligo (dT15) was heated at 70°C for 10 min. Then 8 μl of 5× reaction buffer, 2 μl of dNTP mix (0.625 mM each), 1 μl (1 Unit) of RNase inhibitor and 2 μl (400 Units) of MMLV reverse transcriptase were added. The reaction was incubated at 42°C for 1 h. An additional 200 Units of MMLV reverse transcriptase was added and the mixture was incubated for another 60 min at 42°C followed by heating at 70°C for 15 min to stop the synthesis reaction.

Quantitative real-time RT-PCR

The expression levels of four selected genes were tested in the four above-mentioned RILs and two parental lines (‘PAC-2’ and ‘RHA-266’), which present contrasting responses to water stress and different genomic regions. Gene expression analysis was performed using different treatment combinations (well-watered and water-stressed plants before and after rehydration) in three replications. Gene-specific primers were designed using the Primer Express software, version 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Oligonucleotide primer sequences are shown in Table 1. Quantitative real-time RT-PCR was performed using the method described by Hewezi et al. (2006). Quantification of the relative changes in gene expression was performed using the 2^{-ΔΔCT} method as described by Livak and Schmittgen (2001).

Results

Genetic variation for physiological traits

Analysis of variance for 38 RILs and their parents ‘PAC-2’ and ‘RHA-266’ summarized in Table 2,

Table 1 Primers used for quantitative real-time RT-PCR expression analysis

Sequence name	Putative function	Accession	Sequence of primers (5′-3′)
X95950	Aquaporin	X95950	F: TCCACCTTGCTCTTCGTCTTC R: TCTGCTGTCAATTTGGCGTAA
X92647	Dehydrin	X92647	F: TGAAGGAATTGTGTGAGGCGTAT R: GGAGCCATGCAAACCTTTATTCTT
AJ863116	Putative leafy cotyledon1-like protein	AJ863116	F: CGCAAAAGAAACGATCCAAGA R: TCATTTCGTTACCTGTCCACA
DH0AL23ZC07ZM1	Fructose-1,6 bisphosphatase	CD850867	F: TGGCACGTGTCGTTCTCGTA R: CTTCTTGCCATGCCTTGAG

Table 2 Analysis of variance for physiological traits on well-watered and water-stressed genotypes of sunflower before and after rehydration

Trait	Before rehydration			After rehydration								
	Water-stressed			Well-watered			Water-stressed					
	MSG	Range	Mean	MSG	Range	Mean	MSG	Range	Mean	MSG	Range	Mean
P_n	32.14 ^{NS}	11.8/25.0	19.7	7.94 ^{**}	0.2/6.7	3.3	33.05 ^{NS}	13.4/26.7	18.9	41.43 [*]	6.5/20.6	12.4
g_s	0.09 ^{NS}	0.37/1.14	0.72	0.0007 ^{NS}	0.00/0.08	0.03	0.09 ^{NS}	0.20/1.04	0.59	0.03 ^{NS}	0.06/0.45	0.22
Ci	884.18 ^{NS}	270/359	300	7911.5 ^{**}	139/361	215	855.4 ^{NS}	244/313	288	1583.45 ^{NS}	190/280	244
Tr	2.97 ^{NS}	3.96/8.56	7.03	0.34 ^{NS}	0.13/1.37	0.77	3.40 ^{NS}	4.94/8.68	6.50	3.44 ^{NS}	1.40/5.81	3.48
RWC	23.12 ^{NS}	80.4/91.7	86.0	92.19 ^{***}	59.5/80.7	71.3						
Ψ_w	0.027 ^{NS}	-0.97/-0.58	-0.78	0.21 ^{**}	-1.3/-2.54	-1.8						
Ψ_s	0.028 [*]	-1.05/-1.43	-1.21	0.25 ^{**}	-1.31/-2.69	-1.84						
Ψ_t	0.02 ^{NS}	0.31/0.75	0.43	0.03 ^{**}	-0.24/0.39	0.04						
OA	-	-	-	0.06 ^{***}	-0.1/0.58	0.20						

MSG genotype mean square, g_s stomatal conductance (mol H₂O m⁻² s⁻¹), Ci intercellular CO₂ concentration (μmol mol⁻¹), Tr transpiration (mmol H₂O m⁻² s⁻¹), RWC relative water content (%), Ψ_w leaf water potential (MPa), Ψ_s osmotic potential (MPa), Ψ_t turgor potential (MPa), OA osmotic adjustment (MPa)

*, **, *** and NS significant at 0.05, 0.01, 0.001 levels and non-significant, respectively

showed highly significant differences among genotypes (MS_G) for some of traits studied under the four treatment combinations (well-watered and water-stressed plants; before and after rehydration). After rehydration, variation among RILs was significant only for net photosynthesis (P_n). Gas exchange trait variation summarized in Table 2 shows that net photosynthesis (P_n), stomatal conductance (g_s), transpiration (Tr) and intercellular CO₂ concentration (Ci) of RILs were decreased due to water stress. For example, leaf net photosynthesis (P_n) of well-watered RILs ranged from 11.8 to 25.0 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹. This was reduced in water-stressed RILs from 0.2 to 6.7 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹. All values of gas exchange parameters were increased after rehydration (Table 2) and a wide range of net photosynthesis values (6.5–20.6 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) in rehydrated water-stressed plants was observed. However, rehydrated water-stressed plants presented a lower value for gas exchange parameters when they are compared with well-watered plants, suggesting that some RILs had not recovered 36 h after relief of water stress.

Plant water status traits presented in Table 2 show that relative water content (RWC) of all RILs declined with water stress. RWC of well-watered plants ranged from 80.4 to 91.7% while in water-stressed plants it ranged from 59.5 to 80.7%. Water stress also decreased leaf water potential (Ψ_w) and its components, osmotic potential (Ψ_s) and turgor potential (Ψ_t), in RILs. Osmotic adjustment (OA) was observed in RILs subjected to water stress with the mean value of 0.20. OA ranged from -0.1 to 0.58 MPa showing high genetic variation in RILs.

Genetic variability for all physiological traits studied is presented in Table 3. No significant difference was detected between the two parental lines for all traits studied under water stress before rehydration. The differences between the mean of 38 RILs (\bar{X}_{RIL}) and the mean of their parents (\bar{X}_P) in the four treatment combinations (well-watered and water-stressed plants before and after rehydration) were not significant for all traits studied except for osmotic potential (Ψ_s). The comparison between the best parent and the best RIL showed a significant difference for most of physiological studied traits among water-stressed plants. Significant differences were also observed when the mean parent was compared with the mean of 10% selected RILs for some physiological traits (Table 4).

Correlations between different physiological traits are presented in Table 5. Highly significant positive correlations were shown between leaf water potential (Ψ_w), relative water content (RWC), turgor potential (Ψ_t) and net photosynthesis (P_n). Significant positive

Table 3 Genetic gain for gas exchange parameters on well-watered (WW) and water-stressed (WS) genotypes of sunflower before and after rehydration

Parameter	Before rehydration						After rehydration									
	P _n		g _s		Ci		Tr		P _n		g _s		Ci		Tr	
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS
PAC-2 (P1)	16.3	3.2	0.54	0.03	276	222	6.35	0.78	22.8	15.8	0.64	0.32	293	252	7.40	4.62
RHA-266 (P2)	20.8	3.5	0.81	0.03	304	177	7.34	0.68	22.8	7.4	0.75	0.18	293	261.3	8.03	3.14
P1-P2	4.5 ^{NS}	0.2 ^{NS}	0.27 ^{NS}	0.00 ^{NS}	28 ^{NS}	45 ^{NS}	0.99 ^{NS}	0.10 ^{NS}	0.0	8.4 ^{**}	0.09 ^{NS}	0.14 ^{NS}	0.0 ^{NS}	9.3 ^{NS}	0.63 ^{NS}	1.48 ^{NS}
$\bar{X}_{P=(P1+P2)/2}$	18.5	3.3	0.67	0.03	291	200	6.84	0.73	22.8	11.6	0.69	0.25	293	256.7	7.71	3.88
\bar{X}_{RIL}	19.7	3.3	0.72	0.03	300	215	7.03	0.77	18.9	12.4	0.59	0.21	289	244.4	6.50	3.48
$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	1.2 ^{NS}	0.0 ^{NS}	0.05 ^{NS}	0.00 ^{NS}	9.0 ^{NS}	16 ^{NS}	0.18 ^{NS}	0.04 ^{NS}	3.9 ^{NS}	0.8 ^{NS}	0.10 ^{NS}	0.04 ^{NS}	4.0 ^{NS}	12.3 ^{NS}	1.21 ^{NS}	0.40 ^{NS}
B RIL	25.0	6.7	1.14	0.08	360	319	8.56	1.74	26.8	20.6	1.04	0.45	313	280.7	8.69	5.81
GGB= BRIL - BP	4.2 ^{NS}	3.3 ^{**}	0.33 ^{NS}	0.05 ^{**}	56 ^{NS}	97 ^{NS}	1.22 ^{NS}	0.96 ^{**}	4.0 ^{NS}	4.8 ^{NS}	0.29 ^{NS}	0.12 ^{NS}	20 ^{NS}	19.4 ^{NS}	0.66 ^{NS}	1.187 ^{NS}
10%SRIL	24.5	6.3	1.02	0.06	330	286	8.45	1.46	23.3	19.9	0.91	0.41	312	275.5	8.39	5.48
GG10% = 10%SRIL - \bar{X}_P	5.9 ^{NS}	2.6 ^{NS}	0.35 ^{NS}	0.03 ^{NS}	39 ^{NS}	86 ^{NS}	1.61 ^{NS}	0.73 ^{NS}	0.5 ^{NS}	8.3 ^{**}	0.22 ^{NS}	0.16 ^{NS}	19 ^{NS}	18.8 ^{NS}	0.68 ^{NS}	1.59 ^{NS}
LSD _{0.05}	9.44	3.25	0.63	0.04	67.25	111.27	3.36	0.81	8.53	7.97	0.44	0.28	49.38	65.52	2.88	2.93

P_n net photosynthesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s stomatal conductance ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Ci intercellular CO₂ concentration ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), Tr transpiration ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), PAC-2 (P1) and RHA-266 (P2) parental lines, \bar{X}_P mean of two parental lines, \bar{X}_{RIL} mean of recombinant inbred lines (RILs), BRIL the best RIL, BP the best parent, 10%SRIL 10% selected RILs, GGB genetic gain when the best RIL is compared with the best parent, GG10% genetic gain when 10% selected RILs are compared with mean of parents, LSD_{0.05} least significant differences calculated using $t_{0.05}$ and error mean square of each trait

*** and NS significant at 0.01 level and non-significant

correlations were also shown between relative water content (RWC), leaf water potential (Ψ_w) and stomatal conductance (g_s) indicating the response of stomata to water supply.

High genetic variability was observed in four selected RILs and their parents mainly under water stress conditions (Table 6); these treatments and lines were used for RT-PCR gene expression analysis.

QTL mapping

The QTL analysis was performed in plants grown under water-stressed conditions before rehydration (Fig. 1). QTL mapping showed the presence of several QTLs involved in the expression of water status traits (RWC, Ψ_w , Ψ_s , Ψ_t and OA) as well as net photosynthesis rate (P_n). Co-localization was observed for some traits on different linkage groups. The genomic regions with alleles increasing these traits come from both parental lines (Fig. 1). Graphical genotyping for the selected RILs (C100, C133, C147 and LR54) used for RT-PCR showed how chromosome segments having the alleles with positive or negative effects were inherited from parental lines (Fig. 1), which partially explains the differences among RILs in term of physiological traits as well as transcript abundance.

Quantitative real-Time RT-PCR analysis of gene expression

The results of analysis by real-time RT-PCR of aquaporin expression presented in Fig. 2a show that expression of the aquaporin gene in the leaves of all studied lines is down-regulated by water stress. A large variation was observed in the relative expression of aquaporin among our studied genotypes (Fig. 2a). Aquaporin transcript level decreased from five-fold control in 'PAC-2' to about 100-fold control in LR54 under water stress. The transcript level of aquaporin greatly increased by rehydration in all RILs when compared with its level of expression before rehydration (Fig. 2b). However, transcript level differed among RILs and both up and down-regulation was observed in the studied genotypes (Fig. 2b). The level of dehydrin transcript was increased in leaves of all studied RILs in response to water stress (Fig. 2c). Major differences were observed among RILs for the accumulation of dehydrin transcript. Dehydrin transcript accumulated about 90-fold in C100 compared to well-watered control plants of this genotype. The transcript level of dehydrin strongly decreased in all RILs after rehydration but differed among RILs (Fig. 2d). 'RHA-266' showed the highest transcript

Table 4 Genetic gain for plant water relation parameters on well-watered (WW) and water-stressed (WS) genotypes of sunflower

Parameter	RWC		Ψ_w		Ψ_s		Ψ_t		OA
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WS
PAC-2 (P1)	88.2	71.5	-0.79	-1.62	-1.15	-1.61	0.36	0.00	0.06
RHA-266 (P2)	86.2	69.4	-0.75	-1.65	-1.12	-1.68	0.46	0.03	0.03
P1-P2	4.0 ^{NS}	2.1 ^{NS}	0.04 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.07 ^{NS}	0.10 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.03 ^{NS}
$\bar{X}_{P=(P1+P2)/2}$	87.2	70.4	-0.77	-1.63	-1.13	-1.64	0.41	0.01	0.04
\bar{X}_{RIL}	86	71.3	-0.78	-1.80	-1.21	-1.84	0.43	0.04	0.20
$\bar{X}_{RIL} - \bar{X}_P$	1.2 ^{NS}	0.90 ^{NS}	0.01 ^{NS}	0.17 ^{NS}	0.08 ^{NS}	0.20 ^{**}	0.02 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.16 ^{NS}
B RIL	91.7	80.7	-0.58	-1.30	-1.05	-1.30	0.75	0.39	0.58
GGB= BRIL - BP	5.5 ^{NS}	9.2 ^{**}	0.17 ^{NS}	0.32 ^{**}	0.07 ^{NS}	0.31 ^{**}	0.29 ^{NS}	0.36 ^{**}	0.52 ^{**}
10%SRIL	90.9	80	-0.61	-1.43	-1.06	-1.49	0.58	0.26	0.48
GG10% = 10%SRIL - \bar{X}_P	3.7 ^{NS}	9.6 ^{**}	0.16 ^{NS}	0.20 ^{NS}	0.07 ^{NS}	0.17 ^{**}	0.17 ^{NS}	0.25 ^{**}	0.44 ^{**}
LSD _{0.05}	8.62	6.92	0.54	0.23	0.54	0.16	0.65	0.23	0.23

PAC-2 (P1) and RHA-266 (P2) parental lines, BRIL the best RIL, BP the best parent, 10%SRIL 10% Selected RILs, GGB genetic gain when the best RIL is compared with the best parent, GG10% genetic gain when 10% selected RILs are compared with mean of parents, LSD_{0.05} least significant differences calculated using $t_{0.05}$ and error mean square of each trait, RWC relative water content (%), Ψ_w leaf water potential (MPa), Ψ_s osmotic potential (MPa), Ψ_t turgor potential (MPa), OA osmotic adjustment (MPa)

** and NS significant at 0.01 and non-significant

Table 5 Simple correlation coefficients between relative water content (RWC), leaf water potential (Ψ_w), turgor potential (Ψ_t), net photosynthesis (P_n), stomatal conductance (g_s), transpiration (Tr) and osmotic adjustment (OA) in Recombinant Inbred Lines (RILs) and two parents ('PAC-2' and 'RHA-266') of sunflower

	RWC	Ψ_w	Ψ_t	P_n	g_s	Tr
Ψ_w	0.86***					
Ψ_t	0.56***	0.75***				
P_n	0.72***	0.77***	0.67***			
g_s	0.63***	0.70***	0.63***	0.88***		
Tr	0.81***	0.80***	0.72***	0.93***	0.95***	
OA	-0.42***	-0.51***	0.24**	0.12 ^{NS}	0.03 ^{NS}	0.005 ^{NS}

RWC relative water content (%), Ψ_w leaf water potential (MPa), Ψ_t turgor potential (MPa), P_n net photosynthesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s stomatal conductance ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Tr transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), OA osmotic adjustment (MPa),

, * and NS, significant at 0.01, 0.001 probability levels and non-significant

level after rehydration. 'RHA-266' could not recover from drought stress after rehydration as indicated by its net photosynthesis after rehydration (Table 6). The expression level of putative leafy cotyledon1-like protein gene decreased under water stress in all genotypes, suggesting down-regulation of this gene under water stress (Fig. 3a). Differences in expression patterns were found in the putative leafy cotyledon1-like protein gene among RILs. The expression level of leafy cotyledon1-like protein in LR54, which displayed lower RWC and photosynthesis under water stress (Table 6), decreased to 5.5-fold control (Fig. 3a). The expression patterns of fructose-1,6 bisphosphatase under water stress and rehydration conditions are shown in Fig. 3c and d. The transcript level of fructose-1,6 bisphosphatase was decreased by water stress in all genotypes except in C100, which showed a slight transcript increase under water stress, close to control levels.

Discussion

Genetic variation for physiological traits

Water stress revealed genotypic variability (MS_G) for the physiological traits studied as more significant variances were observed among water-stressed RILs compared with well-watered ones (Table 2). Burke (2001) and Srikanthbabu et al. (2002) have also shown that genetic variability for the stress response could only be seen upon exposure to an induction stress. Some RILs maintained their RWC under water stress. Drought resistance of a plant is related to its ability to maintain higher relative water content in the leaves under water stress (Suprunova et al. 2004). Net photosynthesis (P_n) in rehydrated water-stressed plants differed substantially between the two parents, indicating differential abilities for recovery from water stress (Table 3). This suggests that parental lines carry

Table 6 Physiological characteristics of four RILs and their parents ('PAC-2' and 'RHA-266') selected for gene expression analysis by quantitative real-time RT-PCR

Genotype	P_n		g_s		Ci		Tr		RWC		Ψ_w		Ψ_s		Ψ_t		OA
	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WW	WS	WS
Before rehydration																	
C100	18.7 ^a	3.9 ^{ab}	0.51 ^a	0.03 ^b	314 ^a	183 ^{ab}	6.36 ^a	0.69 ^b	86.7 ^a	79.0 ^a	-0.76 ^a	-1.50 ^a	-1.11 ^a	-1.56 ^a	0.35 ^a	0.05 ^b	0.25 ^b
C133	20.5 ^a	6.7 ^a	0.74 ^a	0.06 ^a	287 ^a	203 ^{ab}	7.39 ^a	1.36 ^a	87.4 ^a	73.0 ^{ab}	-0.79 ^a	-1.82 ^{ab}	-1.25 ^a	-1.79 ^{bc}	0.46 ^a	0.03 ^b	0.06 ^d
C147	19.3 ^a	4.4 ^{ab}	0.65 ^a	0.03 ^b	257 ^a	143 ^b	5.55 ^a	0.79 ^b	85.4 ^a	78.8 ^a	-0.97 ^a	-1.60 ^{ab}	-1.33 ^a	-1.62 ^a	0.35 ^a	0.03 ^b	0.11 ^c
LR54	20.9 ^a	1.6 ^b	0.70 ^a	0.02 ^b	302 ^a	264 ^a	6.98 ^a	0.51 ^b	85.5 ^a	59.5 ^d	-0.81 ^a	-2.00 ^c	-1.15 ^a	-2.33 ^d	0.34 ^a	0.33 ^a	0.49 ^a
PAC-2	16.3 ^a	3.2 ^{ab}	0.54 ^a	0.03 ^b	277 ^a	222 ^{ab}	6.35 ^a	0.78 ^b	86.7 ^a	71.5 ^{ab}	0.79 ^a	-1.62 ^{ab}	-1.15 ^a	-1.62 ^a	0.36 ^a	0.00 ^c	0.06 ^d
RHA-266	20.6 ^a	3.4 ^{ab}	0.76 ^a	0.02 ^b	298 ^a	177 ^{ab}	6.86 ^a	0.68 ^b	85.7 ^a	69.4 ^c	0.87 ^a	-1.65 ^{ab}	-1.27 ^a	-1.68 ^{ab}	0.40 ^a	-0.03 ^c	0.03 ^d
After rehydration																	
C100	14.8 ^a	20.3 ^a	0.57 ^a	0.45 ^a	290 ^a	264 ^a	6.28 ^a	5.77 ^a									
C133	23.7 ^a	20.3 ^a	0.88 ^a	0.38 ^{ab}	302 ^a	259 ^a	8.20 ^a	5.08 ^a									
C147	21.9 ^a	16.9 ^{ab}	0.54 ^a	0.33 ^{ab}	271 ^a	262 ^a	6.10 ^a	4.37 ^a									
LR54	14.1 ^a	13.7 ^{ab}	0.30 ^a	0.19 ^b	269 ^a	246 ^a	4.94 ^a	3.62 ^a									
PAC-2	22.8 ^a	15.8 ^{ab}	0.64 ^a	0.32 ^{ab}	293 ^a	252 ^a	7.40 ^a	4.62 ^a									
RHA-266	22.8 ^a	7.4 ^b	0.75 ^a	0.18 ^b	293 ^a	261 ^a	8.02 ^a	3.14 ^a									

In a column, means followed by common letter(s) are not significantly different at 0.05 level by SNK

WW well-watered plants, WS water-stressed plants, P_n net photosynthesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), g_s stomatal conductance ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Ci intercellular CO_2 concentration ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), Tr transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), RWC relative water content (%), Ψ_w leaf water potential (MPa), Ψ_s osmotic potential (MPa), Ψ_t turgor potential (MPa), OA osmotic adjustment (MPa)

different genes for recovery, and these are inherited in RILs via transgressive segregation. This results in significant differences among RILs after rehydration for net photosynthesis (Table 2). Otherwise, the two parents did not differ significantly for net photosynthesis before rehydration. According to these results, it is probable that the genes responsible for drought resistance could be different from those responsible for recovery from water stress during rehydration. Significant differences between the best parent and the best RIL and/or between 10% selected RILs and the mean of parents (Table 3) might be due to transgressive segregation resulting from the accumulation of favorable alleles in some RILs.

The significant correlation between osmotic adjustment (OA) and turgor potential (Ψ_t) in our study showed that the plants subjected to water stress maintained turgor through osmotic adjustment, which consequently resulted in maintenance of photosynthesis under water stress (Table 5). OA is considered to be important for the maintenance of photosynthetic activity during dehydration (Conroy et al. 1988), through its role in turgor maintenance (Turner and Jones 1980; Maury et al. 2000; Ober et al. 2005). The correlation between net photosynthesis (P_n) and stomatal conductance (g_s) was also highly significant. Stomatal limitation is considered to decrease both net photosynthesis (P_n) and CO_2 concentration in the intercellular space of the leaf (Ci) (Cornic 2000). In our experiment water stress increased intercellular CO_2 concentration (Ci) in some RILs and decreased it in

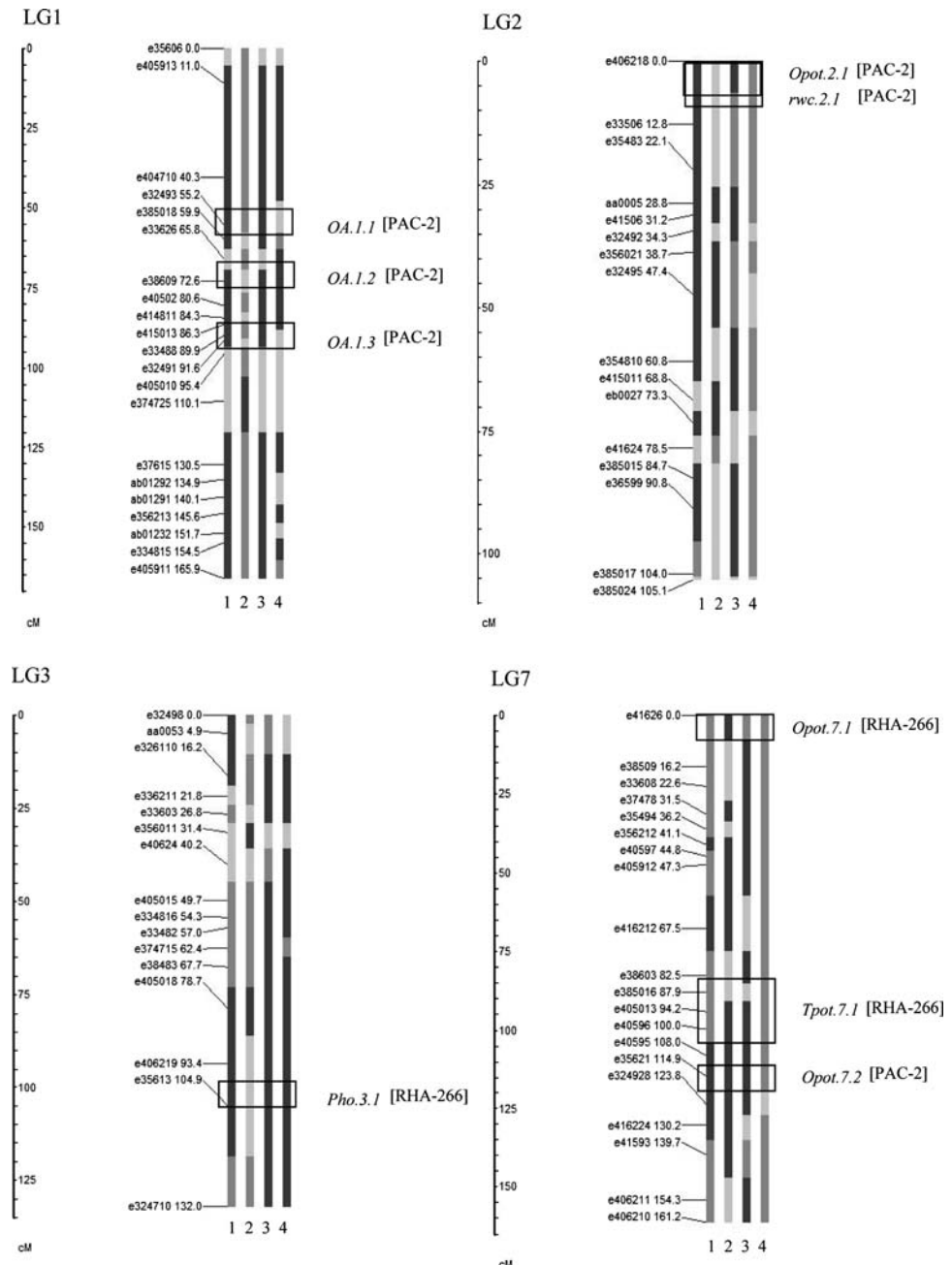
some others depending on genotypes (variation range; Table 2). These results indicate that while stomatal conductance (g_s) is decreased, intercellular CO_2 concentration (Ci) can be increased due to metabolic limitation of photosynthesis or by increased CO_2 production from respiration relative to photosynthesis, which has been also reported by Lawlor (1995).

Large differences were observed among genotypes selected for analysis of gene expression (Table 6). Net photosynthesis (P_n) of C100 and C133 genotypes may not be limited by metabolic factors because these RILs maintain high RWC under water stress. Therefore intercellular CO_2 concentration (Ci) decreased due to drawing down by photosynthesis under water stress, and was increased after rehydration via stomatal opening. In the LR54 genotype, limited photosynthesis by metabolic factors (non-stomatal limitation) resulting from low RWC, results in increase of intercellular CO_2 concentration (Ci), as has been previously described by Lawlor and Cornic (2002) and Lawlor (2002). We propose that intercellular CO_2 concentration (Ci) decreases in C100 and C133 genotypes due to a high rate of photosynthesis, whereas Ci is increased in LR54 because of respiration and metabolic limitations on photosynthesis.

Quantitative real-Time RT-PCR analysis of gene expression and QTL mapping

The expression level of aquaporin is closely associated with RWC, leaf water potential (Ψ_w) and osmotic

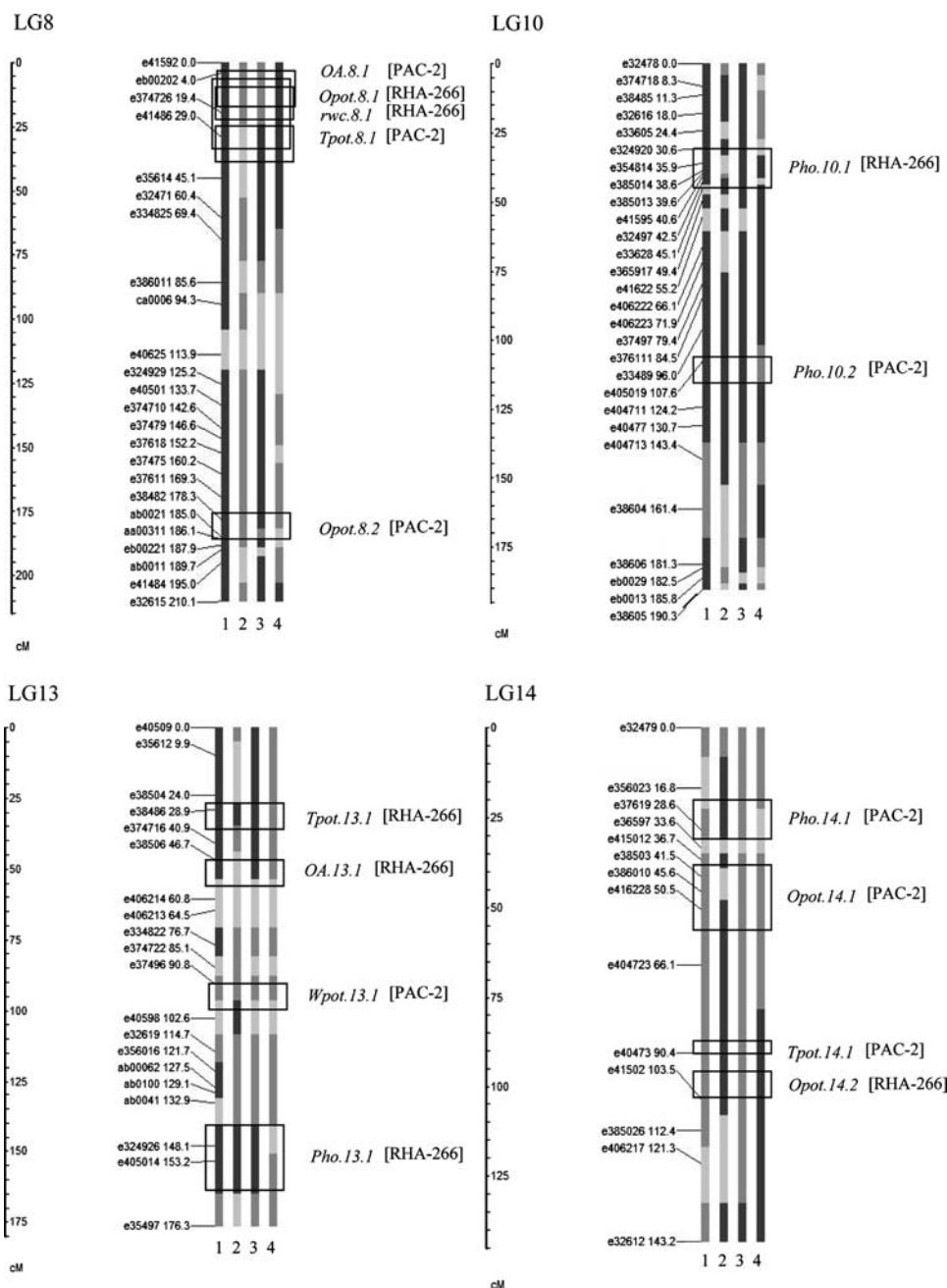
Fig. 1 Graphical genotyping to visualize the linkage groups (LG) and genomic regions of C100 (1), C133 (2), C147 (3) and LR54 (4) from PAC-2 (black) and RHA-266 (dark gray) and unknown genomic regions (light gray). The markers with their positions are presented in the left side and QTLs are presented in the right side of linkage groups. The QTLs were designated as osmotic adjustment (*OA*), relative water content (*rw*), water potential (*Wpot*), osmotic potential (*Opot*), turgor potential (*Tpot*) and photosynthesis (*Pho*) following linkage group and QTL number. For each QTL, [PAC-2] and [RHA-266] show that genomic region with positive alleles come from PAC-2 or RHA-266, respectively (determined by QTL cartographer V 1.6 as the sign of additive gene effect)



potential (Ψ_s) (Fig. 2a; Table 6). LR54 showed the greatest decrease in transcript level of aquaporin (100-fold control) (Fig. 2a). This genotype also had the lowest relative water content (RWC), leaf water potential (Ψ_w), osmotic potential (Ψ_s) and net photosynthesis (P_n) as well as the highest intercellular CO_2 concentration (C_i), probably due to chloroplastic impairments under water stress (Table 6). Other genotypes, which presented higher RWC (up to 79%), Ψ_w and Ψ_s under water stress, showed lower decreasing of aquaporin gene expression (Table 6). On the other

hand, when RWC and Ψ_w or Ψ_s is decreased, aquaporin gene expression is also decreased in order to conserve remaining cellular water against further stress. Smart et al. (2001) reported that down-regulation of aquaporin gene expression results in reduced membrane water permeability and may encourage cellular water conservation during periods of water stress. In contrast, there are examples of aquaporin genes, which are up-regulated by water stress resulting in greater osmotic water permeability and facility of water flux (Yamaguchi-Shinozaki et al. 1992; Yamada et al. 1997).

Fig. 1 continued



QTL mapping revealed that for QTLs of RWC (*rwc.2.1*) and Ψ_s (*Opot.7.2*), located respectively, on linkage groups 2 and 7, the favorable alleles come from ‘PAC-2’. Graphical genotyping (Fig. 1) showed that for the two mentioned QTLs, LR54 is the only genotype that carries a negative genomic region from ‘RHA-266’ (Fig. 1; LG2, and LG7). These genomic regions (*rwc.2.1* and *Opot.7.2*) may be associated with differences in aquaporin transcript abundance and also water status. Negative alleles of LR54 could decrease aquaporin gene expression under conditions of

low RWC and Ψ_s . However, LR54 carries genomic regions having alleles with positive effects for all QTLs of turgor potential (Ψ_t) and OA, which explains why LR54 showed the highest level of Ψ_t and OA compared with other genotypes (Fig. 1). This suggests that two mechanisms could be involved when the plants are subjected to water limited conditions: one that decreases aquaporin gene expression to conserve the cellular water, and another that increases turgor potential via osmotic adjustment. Comparison of aquaporin gene expression between LR54 and ‘RHA-266’

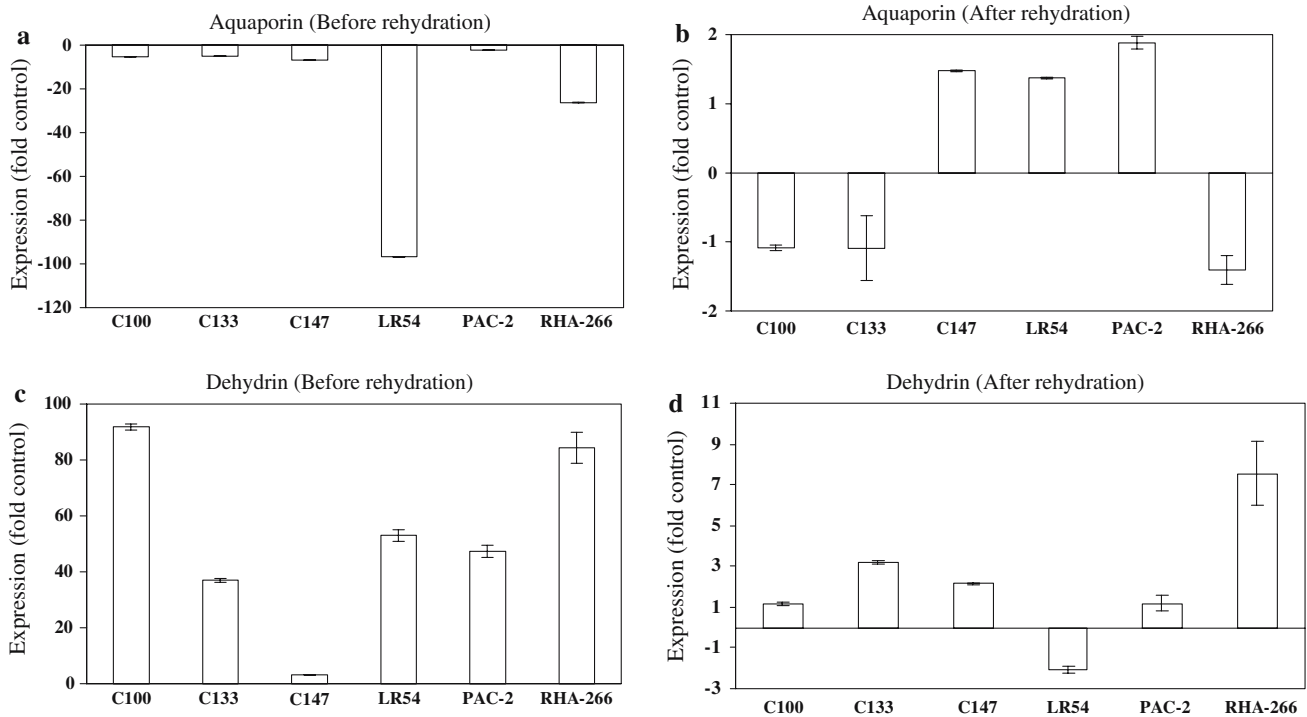


Fig. 2 Effect of water stress on the expression of the aquaporin and dehydrin genes in four sunflower RILs and parental lines (‘PAC-2’ and ‘RHA-266’) studied by quantitative real-time RT-PCR. The transcript levels of each gene in the leaf of water-stressed plants before rehydration (Fig. 2a, c) and water-stressed

plants after rehydration (Fig. 2b, d) were plotted as the relative expression (fold) of the non-stressed (well-watered) control plants exposed. The transcript level of actin was used as a reference. Values are mean ± SE of three independent replicates

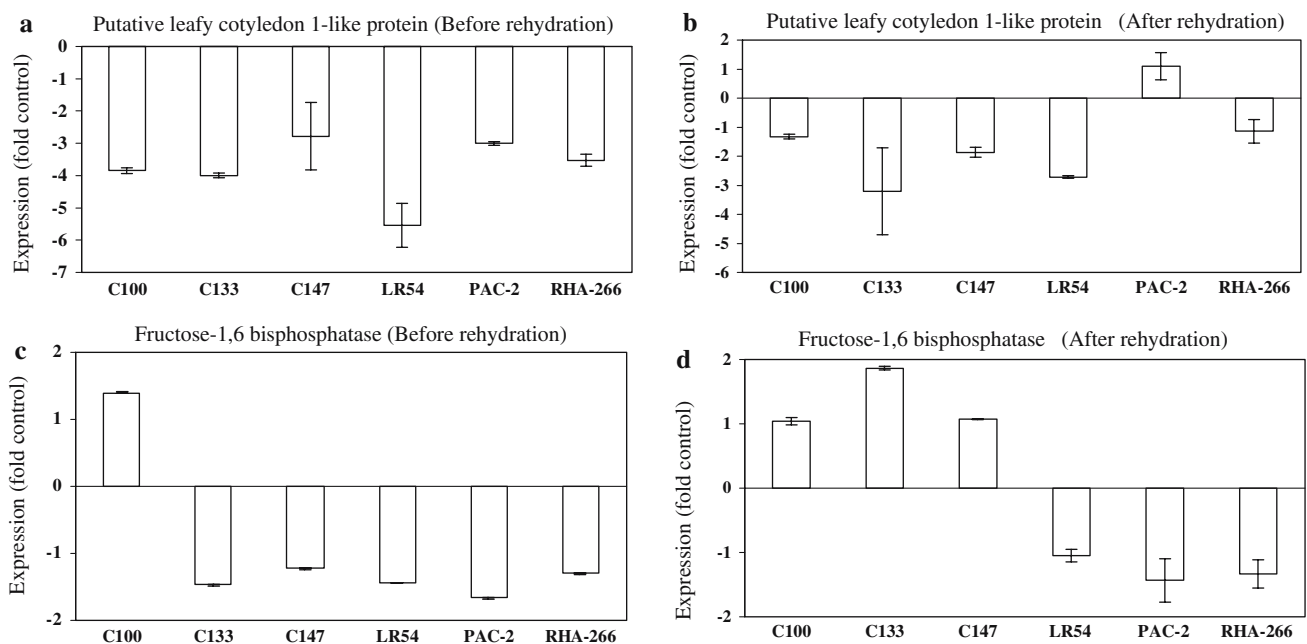


Fig. 3 Effect of water stress on the expression of Putative leafy cotyledon1-like protein and Fructose-1,6 biphosphatase genes in four sunflower RILs and parental lines (‘PAC-2’ and ‘RHA-266’) studied by quantitative real-time RT-PCR. The transcript levels of each gene in the leaf of water-stressed plants before

rehydration (Fig. 3a, c) and water-stressed plants after rehydration (Fig. 3b, d) were plotted as the relative expression (fold) of the non-stressed (well-watered) control plants exposed. The transcript level of actin was used as a reference. Values are mean ± SE of three independent replicates

before and after rehydration shows the probable role of aquaporin in recovery from water stress. Since both ‘RHA-266’ and LR54 showed the lowest aquaporin gene expression under water stress (before rehydration), the observed higher transcript level in LR54 compared with ‘RHA-266’ after rehydration may be associated with ability to recover from water stress (Table 6). Aquaporins play a significant role in recovery from water stress in *Arabidopsis* (Martre et al. 2002). Aquaporin gene expression in our experiment increased during leaf rehydration, which should increase membrane water permeability and facilitate water transport in and out of leaves as described by Vander Willigen et al. (2004). Sarda et al. (1997) showed that the transcripts of aquaporin (*suntip7*) accumulate when stomata are closed.

Despite a high accumulation of dehydrin (up to 90-fold control) under water stress, the transcript level of dehydrin is not associated simply with plant water status and the RILs with the same RWC and Ψ_w showed a great difference in dehydrin transcript accumulation under water stress (Table 6; Fig. 2). C100 and C147 genotypes, which showed the highest (90-fold control) and the lowest (five-fold control) dehydrin accumulation respectively, presented equivalent water status and gas exchange under water stress (Table 6; Fig. 2c). Our results are in agreement with those previously reported by Cellier et al. (1998) in which dehydrin transcripts generally accumulate to high levels in water-stressed sunflower lines, but transcripts did not accumulate as a function of leaf water potential. The results of QTL mapping and graphical genotyping confirmed that there is not a clear relationship between dehydrin transcript accumulation and positive alleles carried by RILs for different QTLs (Figs. 1, 2c). Otherwise, we could not find any QTL for which there is a difference between C147 (presenting the lowest transcript accumulation) and other genotypes in term of positive or negative allele effects. This is not surprising because dehydrin is reported to be involved in water stress tolerance via structural protection rather than changes in water status traits or photosynthesis (Ramanjulu and Bartels 2002). Our results suggest that the preferential accumulation of dehydrin transcripts in the leaves of some RILs such as C100 (Fig. 2c) is associated with the adaptive response occurring in this genotype during a period of drought. The high level of dehydrin in ‘RHA-266’ after rehydration suggests that dehydrin may be involved in structural protection, which has been reported previously (Dure et al. 1989; Baker et al. 1988). ‘RHA-266’ could not recover from water stress in terms of photosynthesis and dehydrin

gene expression remained high after rehydration (Table 6).

Reduction of putative leafy cotyledon1-like protein in our RILs under water stress (up to six-fold compared with control) showed for the first time its potential role in water stress response in sunflower. We showed that the expression level of putative leafy cotyledon1-like protein gene is decreased significantly by dehydration and increased by rehydration; it may play an essential role in drought tolerance. However, it is not accumulated as a function of plant water status; and QTLs were not associated with transcript abundance. Moreover, this regulator may not contribute in up-regulation of dehydrin gene. Future studies would dissect the role of putative leafy cotyledon1-like protein in water stress tolerance and in regulation of dehydrins as a member of LEA in sunflower.

In our study, photosynthesis was decreased by water stress in all RILs (Table 6) which may be partially due to down-regulation of fructose-1,6 biphosphatase under water stress (Fig. 3c). Two QTLs for photosynthesis (‘*Pho.10.2*’ and ‘*Pho.13.1*’) was closely associated with photosynthesis capacity of four RILs but not with transcript abundance of fructose-1,6 biphosphatase under water stress (Fig. 1). These two QTLs explain large differences observed between LR54 and other genotypes for P_n (Table 6). Another QTL, which may contribute to the greater photosynthesis capacity observed for C133 under water stress, is located on linkage group 14 (*Pho.14.1*). C133 carries positive alleles from ‘PAC-2’ for this QTL. Although the four RILs carry different genomic regions for three mentioned QTLs, they presented almost the same transcript abundance of fructose-1,6 biphosphatase (Fig. 3c). Therefore these three QTLs were not associated with transcript abundance, but were associated with phenotypic variation. Two other QTLs, for which all four genotypes received negative alleles from parental lines, are located on linkage group 3 (*Pho.3.1*) and 10 (*Pho.10.1*). Alleles increasing phenotypic responses associated with these two QTLs come from ‘RHA-266’ but all four RILs received these QTL regions from ‘PAC-2’ or an unknown segment (C133). These QTLs might be associated with down-regulation of fructose-1,6 biphosphatase because all RILs showed the same down-regulation of fructose-1,6 biphosphatase and also contain negative alleles for these QTLs. During rehydration after water stress, the RILs that showed a high net photosynthetic rate (P_n) (Table 6) displayed a transcript level of fructose-1,6 biphosphatase close to well-watered plants (Fig. 3d). This association between photosynthesis and fructose-1,6 biphosphatase is necessary as sucrose

synthesis must be balanced with the momentary rate of photosynthesis (Stitt 1990). These results show that down-regulation of fructose-1,6 biphosphatase could play a role in non-stomatal limitation of photosynthesis, resulting in decrease of photosynthesis under water stress.

We can conclude that sunflower genotypes subjected to progressive drought at the pre-flowering stage, as often happens in field conditions, presented a large variation and contrasted responses in terms of water status maintenance and photosynthetic potential. The four selected RILs and parents, which display contrasting response to water stress, present relationships between (1) water status and aquaporin gene expression and (2) net photosynthesis and fructose-1,6 biphosphatase gene expression mainly after rehydration. The transcript levels of aquaporin and fructose-1,6 biphosphatase are associated with QTLs having positive or negative alleles controlling water status and photosynthesis. In contrast, dehydrin and leafy cotyledon1-like genes expression are not correlated directly with plant water status, probably due to the slow drought establishment, which allowed different adaptive responses in our study. The large genetic variation among RILs studied here could be useful for selecting genotypes in terms of a given physiological characteristic for investigation of water stress tolerance.

Acknowledgments The authors thank Professor Catherine Carter (South Dakota States University) for English corrections.

References

- Al-Chaarani G, Gentzbittel L, Huang X, Sarrafi A (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
- Bajaj S, Targolli J, Liu LF, Ho THD, Wu R (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Mol Breed* 5:493–503
- Baker J, Steele C, Dure L (1988) Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11:277–291
- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2002) QTL cartographer version 1.16: program in statistical genetics. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh
- Blum A (1989) Osmotic adjustment and growth in barley genotypes under drought stress. *Crop Sci* 29:230–233
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099–1111
- Boominathan P, Shukla R, Kumar A, Manna D, Negi D, Verma PK, Debasis C (2004) Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiol* 135:1608–1620
- Bray EA (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot* 89 Spec No:803–811
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55:2331–2341
- Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC (2002) Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J Exp Bot* 53:13–25
- Burke JJ (2001) Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. *Physiol Plant* 112:167–170
- Cellier F, Conejero G, Breittler JC, Casse F (1998) Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. *Plant Physiol* 116:319–328
- Charles SA, Halliwell B (1981) Light activation of fructose biphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. *Planta* 151:242–246
- Close TJ, Fenton RD, Moonan F (1993) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol Biol* 23:279–286
- Conroy JP, Virgona JM, Smillie RM, Barlow EW (1988) Influence of drought acclimation and CO₂ enrichment on osmotic adjustment and chlorophyll a fluorescence of sunflower during drought. *Plant Physiol* 86:1108–1115
- Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci* 5:187–188
- Dure III L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol* 12:475–486
- Fambrini M, Durante C, Cionini G, Geri C, Giorgetti L, Michelotti V, Salvini M, Pugliesi C (2006) Characterization of LEAFY COTYLEDON1-LIKE gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. *Dev Genes Evol* 216:253–264
- Flexas J, Medrano H (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plant: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89:183–189
- Hervé D, Fabre F, Flores Berrios E, Leroux N, Al charani Gh, Planchon C, Sarrafi A, Gentzbittel 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
- Hewezi T, Petitprez M, Gentzbittel L (2006) Primary metabolic pathways and signal transduction in sunflower (*Helianthus annuus* L.): comparison of transcriptional profiling in leaves and immature embryos using cDNA microarray. *Planta* 223:948–964
- Holmberg N, Bulow L (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci* 3:61–66
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:377–403
- Jamaux I, Steinmetz A, Belhasen E (1997) Looking for molecular and physiological markers for osmotic adjustment in sunflower. *New Phytol* 137:117–127
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 54:713–725
- Joshi CP, Klueveva NY, Morrow KJ, Nguyen HT (1997) Expression of a unique plastid localized heat shock protein is genetically linked to acquired thermotolerance in wheat. *Theor Appl Genet* 95:834–841

- Krishnan M, Nguyen HT, Burke JJ (1989) Heat shock protein synthesis and thermotolerance in wheat. *Plant Physiol* 90:140–145
- Lawlor DW (1995) The effects of water deficit on photosynthesis In: Smirnoff N (ed) *Environment and plant metabolism flexibility and acclimation*. BIOS Scientific publishers, Oxford
- Lawlor DW (2002) Limitation of photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. *Ann Bot* 89:871–885
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. *Plant Cell Environ* 25:275–294
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408
- Luu DT, Maurel M (2005) Aquaporins in the challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ* 28:85–96
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, Gretchen BN, Park SN, Maarten JC (2002) Plasma membrane aquaporin play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol* 130:2101–2110
- Maury P, Mojayad F, Berger M, Planchon C (1996) Photosynthesis response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiol Plant* 98:57–66
- Maury P, Berger M, Mojayad F, Planchon C (2000) Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant Soil* 223:153–160
- Moons A, Bauw G, Dekeyser R, Von Montagu M, Van Der Straeten D (1995) Novel ABA responsive proteins in vegetative rice tissue. *Curr Topics Plant Physiol* 10:288–289
- Morgan J M (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35:299–319
- Ober ES, Le Bloa M, Clark C JA, Royal A, Jaggard K W, Pidgeon J D (2005) Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crop Res* 91:231–249
- Oono Y, Seki M, Nnjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Lida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Monitoring expression profile of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* 34:868–887
- Ouvrard O, Cellier F, Ferrare K, Tousch D, Lamaze T, Dupuis J-M, Casse-Delbart F (1996) Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol Biol* 31:819–829
- Parcy F, Valon C, Kohara A, Miséra S, Giraudat J (1997) The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*, *FUSCA3* and *LEAFY COTYLEDON1* genes act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* 9:1265–1277
- Ramanjulu S, Bartels D (2002) Drought and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* 25:141–151
- Reid JL, Walker-Simmons MK (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant Physiol* 102:125–131
- Sarda X, Tousch D, Ferrare K, Legrand E, Dupuis JM, Casse-Delbart F, Lamaze T (1997) Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J* 12:1103–1111
- Sarda X, Tousch D, Ferrare K, Cellier F, Alcon C, Dupuis JM, Casse F, Lamaze T (1999) Characterization of closely related δ -TIP gene encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Mol Biol* 40:179–191
- Schneider AA, Miller JF (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Sci* 21:901–903
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339–364
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1,300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses using full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13:61–72
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kanya A, Nakajama M, Enju A, Sakurai T, Satou K, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31:279–292
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 115:327–334
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1999) Molecular responses to drought stress In: Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K Molecular (eds) *Responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants* Austin, RG Landes, TX, pp 11–28
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3:217–223
- Smart LB, Moskal WA, Cameron KD, Bennett AB (2001) MIP Genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol* 42:686–693
- Srikanthbabu V, Ganesh K, Krishnaprasad BT, Gopalakrishna R, Savitha M, Udaya Kumar M (2002) Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response (TIR) technique. *J Plant Physiol* 159:535–545
- Stitt M (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory protein in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:153–185
- Supronova T, Krugman T, Fahima T, Chien G, Shams I, Korel A, Nevo E (2004) Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant Cell Environ* 27:1297–1308
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll S P, Lawlor DW (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J Exp Bot* 375:1781–1791
- Turner NC, Jones MM (1980) Turgor maintenance by osmotic adjustment; a review and evaluation. In: Turner N, Kramer PJ (eds) *Adaptation of plants to water and high temperature stress*. Wiley, New York, pp 87–107
- Van Berloo R (1999) GGT software for the display of graphical genotypes. *J Heredity* 90:328–329
- Vander Willigen C, Pammenter NW, Mundree SG, Farrant JM (2004) Mechanical stabilization of desiccated vegetative tissues of the resurrection grass *Eragrostis nindensis*: does a TIP3;1 and/or compartmentalization of subcellular components and metabolites play a role? *J Exp Bot* 55:651–661
- Verwoerd TC, Bekker BM, Hoekema A (1989) A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acid Res* 17(16):2362
- Watkinson JJ, Sioson AA, Vasquez-Robinet C, Shukla M, Kuma D, Ellis M, Heath LS, Ramakrishnan N, Chevone B, Watson L T, Van Zyl L, Egertsdotter U, Sederoff R R, Grene R (2003) Photosynthetic acclimation is reflected in specific

- patterns of gene expression in drought-stressed loblolly pine. *Plant Physiol* 133:1702–1716
- Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H (1997) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol* 38:1226–1231
- Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992) Molecular cloning of 9 cDNA that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana* sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol* 33:217–224
- Zrenner R, Krause KP, Apel P, Sonnewald U (1996) Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthesis sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant J* 9:671–681

Chlorophyll fluorescence variation and differential expression of antioxidant genes under well-watered and water-stressed conditions in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.)

S. Poormohammad Kiani¹, P. Maury¹, P. Grieu¹, A. Sarrafi²

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

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

Plant science (soumis)

*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 research were to map QTLs involved in genetic variability for chlorophyll fluorescence parameters in recombinant inbred lines (RILs) and their two parents and to determine the differential expression of various antioxidant genes by quantitative real-time RT-PCR in four selected RILs and their parental lines under different water treatments. Results showed that the progressive water stress did not cause long-term down-regulation of photosynthesis apparatus (ΦP); but it reduced actual efficiency of PSII electron transport ($\Phi PSII$). Some RILs showed a high capacity for energy dissipation via non-photochemical quenching (NPQ) and over-excitation of PSII reaction centers (1-qP) occurred in some RILs. The transcript abundance of all antioxidant genes was changed by water stress and based on the magnitude of up-regulation, significant higher level of POD was observed. Despite a strong up-regulation of POD (up to 67-fold control) by water stress, the expression of POD was not associated directly with phenotyping responses to drought. The putatively drought-tolerant genotype (C100) showed the highest transcript level for SOD, CAT, PSI P700 and PSII 32 Kda Protein resulting in the maintenance of photosynthesis under water stress. The contribution of both parental lines in QTL expression resulted in transgressive segregation observed at phenotypic level. QTL mapping and graphical genotyping showed that the positive or negative alleles of some QTLs such as '*NPQD.11.1*' and '*1-qPD.2.1*' could be associated with the transcript abundance of SOD and CAT in the putatively drought-tolerant genotype (C100).

Key words: Chlorophyll fluorescence; QTL; Real-Time RT-PCR; Graphical genotyping

1. Introduction

Drought tolerance may be exhibited by plants through their ability to maintain physiological processes like photosynthesis at lower water potentials [1]. Upon moderate water stress, photosynthetic activity decreases mainly due to stomatal closure, which constitutes the stomatal limitation of photosynthesis [2,3]. As the water stress progresses, biochemical constraints may limit the photosynthesis more directly [4]. Water-stressed plants must dissipate excess light energy, since photosynthesis would not be able to utilize efficiently the photochemical energy [5]. Otherwise excess energy may result in increased production of activated oxygen species (AOS) in chloroplasts, which is potentially harmful to photosystem II (PSII) [6].

Various energy dissipation pathways serve as photoprotective mechanisms: (1) light energy can be used in the re-fixation of photorespired CO₂, (2) other reactions, such as Mehler-type reactions can contribute to balance the electron flow and (3) thermal energy dissipation via the xanthophylls cycle as well as down-regulation of photochemical efficiency are also involved in the excess light energy dissipation [5,7,8,9].

Chlorophyll fluorescence parameters are commonly used to study the functioning of photosynthetic apparatus under drought stress. This method has been used to investigate the response of sunflower to water stress [5,10]. They reported that water stress did not cause a long-term effect on photochemical efficiency of PSII in sunflower, but it decreased 'actual' quantum efficiency of PSII electron transport (Φ PSII). However, the response of sunflower photochemical efficiency to drought stress is genotype-dependant [5]. Similar to sunflower, water stress decreased Φ PSII in the leaves of *Phaseolus vulgaris* L. and *Coffea canephora* without long-term effect on photosynthetic apparatus of *Coffea canephora* [2,11].

To cope with AOS, plants are endowed with an integrated system of non-enzymatic (tocopherols, β -carotene, glutathione and ascorbic acid) as well as different enzymatic antioxidants [12,13]. The enzymatic antioxidants include superoxide dismutase (SOD), which reacts with superoxide radicals (O₂⁻) and converts them to O₂ and hydrogen peroxide (H₂O₂). H₂O₂ is then detoxified by catalase (CAT) and/or ascorbate peroxidase (APX) [12,13]. In addition, peroxidases (POD) also play an important role in the antioxidative protection [14,15]. Glutathione S-transferase (GST) is also involved in detoxification of AOS and in protection from lipid peroxidation [16]. Failure in the antioxidant defense system may result in oxidative damage to several cell constituents such as proteins, DNA and membrane lipids [6].

It is critical to study the functions of stress-induced genes to understand the mechanisms involved in stress tolerance in plants. Correlating phenotypic adaptations with molecular responses should enable us to evaluate the role of drought-induced changes in gene expression during adaptation. In our previous study plant adaptation to water stress in terms of water status characters (relative water content, leaf water potential and turgor potential) and their effects on gas exchange (photosynthesis and stomatal conductance), were evaluated in recombinant inbred lines of sunflower [17]. We showed an association between transcript abundance of aquaporin gene and plant water status especially relative water content (RWC) under water stress. Down-regulation of aquaporin gene was also associated with genomic regions having alleles with negative effects on plant water status under drought conditions. By contrast, transcript accumulations of dehydrin and leafy cotyledon1-like genes, likely involved in protective tolerance processes, were not correlated directly with plant water status or QTL effects.

The present research was undertaken to complete the previous one and permit to enlarge our understanding of mechanisms underlying water stress in sunflower. The objectives of this research were: to study genetic variability for chlorophyll fluorescence parameters in recombinant inbred lines (RILs) of sunflower under water stress, to map QTLs for the studied traits using our new saturated map [18] and to determine the differential expression of various antioxidant genes by quantitative real-time RT-PCR in four selected RILs and their parental lines under different water treatments. The putative association of these genes with phenotypic adaptation was also evaluated. Finally, for each selected RILs and parents, the possible relationship between QTLs with positive or negative alleles and transcript abundance as well as phenotypic performance was investigated.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and water stress treatments

Plant material, experimental design and water stress treatments as well as rehydration methods are explained in our previous work [17]. Briefly, a population of 78 recombinant inbred lines (RILs) and their parents (PAC2 and RHA266) were grown in the greenhouse under controlled conditions. The experiment consisted of a split-plot design with three blocks. The main plot consisted of water treatments (well-watered and water-stressed) and subplot consisted of genotypes (RILs and parental lines). The RILs and their two parents were randomized within each treatment-block combination. Four genotypes contrasting in their response to water stress and their two parental lines were used for gene expression analysis by real-time RT-PCR in order to determine putative relationships between plant physiological

response and genomic regions with positive or negative allele effects as well as with water stress-induced antioxidant genes expression.

Water deficit was induced in 45-day-old plants, near the stage R1 [19], for a period of 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. After 12 days of differential watering, the chlorophyll fluorescence measurements were made. When measurements were finished, a young fully expanded leaf was harvested from well-watered and water-stressed plants, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for RNA extraction and gene expression analysis. Both well-watered and water-stressed plants were rehydrated to field capacity after leaf harvesting. Thirty-six hours after rehydration, a young fully expanded leaf was again harvested from each plant for RNA extraction.

2.2. Chlorophyll fluorescence parameter measurements

Chlorophyll fluorescence was measured with a pulse-amplitude modulation fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany). Four chlorophyll fluorescence parameters were studied as following: the potential photochemical efficiency of photosystem II electron transport (ΦP), the actual efficiency of PSII electron transport (ΦPSII), non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and the proportion of closed PSII traps (1-qP). The chlorophyll fluorescence parameter measurements were done according to method described in detail by Maury et al. [5].

2.3. Statistical analysis

The data was analyzed using the SAS PROC GLM (SAS Institute Inc, NC, USA) [20]. A mixed model with water treatment as fixed effect, and genotypes (RILs and parents) as random effect, was used for analysis of the experimental data.

2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

Young fully expanded leaves, harvested from each treatment combination (well-watered and water-stressed plants before and after rehydration) were frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . These leaves were used for RNA extraction as described by Verwoerd et al. [21]. Single-stranded cDNA was synthesized using the method described previously [17].

2.5. Quantitative real-time RT-PCR gene expression analysis

The expression levels of eight genes putatively involved in oxidative stress tolerance were tested in the four selected RILs and two parental lines (PAC2 and RHA266), which

present contrasting responses to water stress. Gene expression analysis was performed with the plantes under different treatment combinations (well-watered and water-stressed plants before and after rehydration) in three replications. Gene-specific primers were designed using the Primer Express software, version 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Oligonucleotide primer sequences are shown in Table 1. Quantitative real-time RT-PCR was performed using the method described by Hewezi et al. [22]. Quantification of the relative changes in gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as described by Livak and Schmittgen [23].

2.6. Linkage map, QTL mapping and graphical genotyping

An AFLP and SSR genetic linkage map improved recently [18] was used to map QTLs involved in the expression of chlorophyll fluorescense parameters. This map contains 304 AFLP and 191 SSR markers. QTL mapping of the studied traits was performed by composite interval mapping (CIM) using QTL Cartographer, version 1.16 [24] and mean values of three replications for each RIL in each water treatment. GGT software [25] was used to create a ‘graphical genotype’ for each offspring using new map data, to show how chromosome segments at each QTL location was inherited from each parent. Graphical genotypes were used to show the differences among four selected RILs for RT-PCR in term of chromosomal segments (positive or negative alleles) at QTL positions.

3. Results

3.1. Genetic variation for physiological traits

Analysis of variance for RILs and their parents ‘PAC2’ and ‘RHA266’ summarized in Table 2, showed significant effect of water stress on actual quantum efficiency of PSII electron transport (Φ_{PSII}), non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and the proportion of closed PSII traps (1-qP). Water stress did not affect the potential photochemical efficiency of PSII electron transport (Φ_P). Differences among genotypes were significant for Φ_P , NPQ and 1-qP. The water treatment-genotype interaction was significant for only 1-qP.

Actual quantum efficiency of PSII electron transport (Φ_{PSII}) was reduced by water stress from 0.451 in well-watered RILs to 0.240 in water-stressed RILs. Water stress increased the value of non-photochemical fluorescence quenching (NPQ). NPQ ranged from 0.850 to 2.201 in well-watered plants, with the mean value of 1.261. It ranged from 1.508 to 3.022 in water-stressed plants with the mean value of 2.282 (Table 2). Water stress increased the mean value of the proportion of closed PSII traps (1-qP) from 0.242 in well-watered

plants to 0.481 in water-stressed plants and the difference between parents was significant for this trait.

Based on physiological differences among RILs, four RILs as well as their parental lines were selected for gene expression analysis using quantitative real-time RT-PCR. The six genotypes showed different characteristics (Fig. 1). C100 maintained actual quantum efficiency of PSII electron transport (Φ_{PSII}) close to its control plants. LR54, C147 and RHA266 were highly affected by water stress showing high value for the proportion of closed PSII traps (1-qP). However, C147 was similar to C100 in terms of Φ_{PSII} .

3.2. Quantitative real-Time RT-PCR analysis of gene expression

The transcript abundance of all antioxidant genes was changed by water stress depending on genotype and gene, but the expression of genes was returned close to control genotypes after recovery (Fig. 2). The transcript abundance of Peroxidase (POD) increased remarkably by water stress. It was accumulated by up to 66-fold control in RHA266. After rehydration, the transcript abundance was decreased in all RILs except in C133, which showed the same transcript level before and after rehydration (25.84 and 25.86-fold control respectively). Down regulation of POD was observed after rehydration in RHA266 and C100. RHA266, which showed the highest transcript level before rehydration, presented the lowest level of POD transcript after rehydration (-2.28 fold-control). Catalase (CAT) gene expression was up-regulated by water stress and down-regulated by rehydration (Fig. 2c and d). It was accumulated by 3.9-fold control in C100 (the highest level) and by 1.23-fold control in LR54 (the lowest level). The transcript level of CAT was decreased after rehydration. LR54 showed the highest decreasing CAT transcript level (-2.41-fold control). Both up- and down-regulation were observed for Superoxide dismutase (SOD) gene expression under water stress (Fig. 2e). However, again C100 showed the highest transcript level (2.47-fold). Rehydration caused different transcript level depending genotypes (Fig. 2f). Water stress increased the Glutathione *S*-transferase (GST) gene expression from 1.89-fold control in C133 genotype to 3.78-fold control in LR54 and RHA266 (Fig. 2g). After rehydration, it was down-regulated in all genotypes except C133 which showed a value close to its control. However LR54 showed the highest transcript decreasing of 2-fold control. Ascorbate peroxidase (APX) was up-regulated by water stress from 1.38-fold to 2.56-fold control depending genotype (Fig. 2i and j). Both up and down-regulation were observed after rehydration. Again LR54 showed the lowest level of APX transcript (-1.51-fold control). Both up and down regulation were observed for PSI P700 gene expression under water stress. C100 showed the highest level of transcript abundance (1.33-fold control) (Fig. 2k). However, transcript level was close to

well-watered plants under water stress. After rehydration C100 showed the highest PSI P700 transcript decreasing (-2.60-fold control) (Fig. 2l). The transcript abundance of PSII 32Kda Protein was up-regulated by water stress in all RILs except in C133, which decreased slightly remaining close to its control plant (-1.12-fold control) (Fig. 2m). C100 showed the highest transcript level (3.01-fold control). After rehydration, gene expression of PSII 32Kda Protein was down-regulated in all RILs except in C133, which showed up-regulation of 1.5-fold control. Gamma-tocopherole gene expression was down-regulated by water stress. LR54 showed the lowest transcript level (-1.90-fold control) compared with other genotypes. The transcript level of Gamma tocopherol was increased in two RILs (LR54 and C147) after rehydration. In other four genotypes it was not changed by rehydration.

3.3. QTL mapping

QTL analysis of the studied traits was performed under well-watered and water-stressed conditions before rehydration (Table 3; Fig. 3). QTL mapping showed the presence of several QTLs involved in the expression of different chlorophyll fluorescence parameters. The number of detected QTLs varied from 5 to 9 depending on the traits and water treatments. Co-location was observed for the QTLs of different traits under both water treatments on 10 linkage groups out of 17 (Table 3; Fig. 3). The phenotypic variance explained by each QTL (R^2) ranged from 5% to 26% (Table 3). The sign of additive genes effects show that the genomic regions with alleles increasing these traits come from both parental lines (Fig. 2; Table 3). Graphical genotyping for the selected RILs (C100, C133, C147 and LR54) used for quantitative real-time RT-PCR showed how chromosome segments having the alleles with positive or negative effects were inherited from parental lines (Fig. 3), which partially explains the differences among RILs in terms of physiological traits as well as transcript abundance of antioxidant genes.

4. Discussion

4.1. Genetic variation for chlorophyll fluorescence parameters

A large genetic variation was observed for the studied traits under both well-watered and water-stressed conditions, which is evidence of transgressive segregation (Table 2). The potential photochemical efficiency of PSII electron transport (Φ_P) was not reduced by water stress in our experiment. Pankovic et al. [10] found also that Φ_P is not decreased under drought conditions in sunflower. Our result is also in agreement with the result observed in *Arabidopsis thaliana* and *Coffea* by Jung [14] and Pinheiro et al. [2] respectively. Both

authors reported that ΦP was not affected by water stress suggesting that water stress did not cause long-term down-regulation on photosynthesis apparatus.

Actual quantum efficiency of PSII electron transport (Φ_{PSII}) measures the proportion of the light absorbed by chlorophyll associated with PSII, which is used in photochemistry and it can give a measure of overall photosynthesis [26]. Water stress reduced PSII from 0.451 to 0.240 in our experiment, which may be due to decrease in the rates of consumption of ATP and NADPH by photosynthesis [27]. When drought stress is severe, decreases in the rate of utilisation of ATP and NADPH in photosynthesis will not be compensated by increase in water-water cycle and photorespiration, or by other electron sinks, and consequently, Φ_{PSII} decreases [28]. This observation was also reported in *Arabidopsis thaliana* and *Coffea canephora*, where water stress reduces actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) [2,14].

Water stress significantly increased non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) from 1.261 in well-watered condition to 2.282 in water-stressed one (Table 2). Any change in NPQ measures the efficiency of heat dissipation that protects the leaf from light-induced damages [29]. Therefore increased NPQ in some RILs suggest their capacity to be protected through thermal energy dissipation (Table 2).

Increased 1-qP values under water-stressed condition in our study could be due to closure of reaction centers, which is associated to PSII inactivation, resulting from a saturation of photosynthesis and other electron sinks by light [30]. We have observed that even when thermal energy dissipation occurred via NPQ, over-excitation was occurred in some RILs under water stress especially in LR54 genotype.

4.2. Quantitative real-Time RT-PCR gene expression analysis and QTL mapping

The genotypes used for analysis of gene expression presented different responses to water stress (Fig. 1). LR54 and C147 showed the highest values of non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and the proportion of closed reaction centers (1-qP) as well as decreased actual quantum efficiency of PSII electron transport (Φ_{PSII}) (Fig. 1). Our previous study showed that LR54 is the most susceptible lines to water stress in terms of photosynthesis and relative water content maintenance [17]. A high level of NPQ and 1-qP for LR54 in the present study is in agreement with the high level of intercellular CO_2 concentration in the previous research work; suggesting non-stomatal limitation for photosynthesis in this genotype [30]. Genotypes C147 and RHA266 showed also to be more affected by water stress than C100 and C133, as shown by higher 1-qP in the present work (Fig 1). The parental lines differed for 1-qP and RHA266 is more affected by water stress than PAC2. The genotype

C100 maintained Φ PSII close to its control plants and presented a low NPQ and 1-qP resulting a higher performance under water stress. Regarding these observations we can conclude that C100 and LR54 are highly contrasted, whereas C147 and C133 are intermediate between C100 and LR54 (Fig. 1).

The general comparison of the antioxidant genes expression showed that water stress changed the transcript level of almost all antioxidants with a differential response in different genotypes (Fig. 2). The changes in antioxidant gene expression in genotypes subjected to water stress suggest that oxidative stress is potentially an important component of water stress in sunflower. The transcript level of peroxidase (POD), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathion-s-transferase (GST) and ascorbat peroxidase (APX) were up-regulated by water stress in all RILs (Fig. 2a, c, e, g, and i). However, SOD decreased slightly remaining close to control in C147 and RHA266 by water stress (Fig. 2e).

Peroxidase appeared to be the most affected by water stress-imposed oxidative stress, as there was a strong increasing in transcript abundance under water stress (Fig. 2a). It was accumulated from 4-fold (C147) to 66.6-fold control (RHA266) depending on genotypes. The increase in the POD transcript along with other antioxidants in all genotypes indicated the diffusion of H_2O_2 from the chloroplasts. Srivalli et al. [31] and Oidaira et al. [32] reported an increase in POD activity under water stress and low temperature respectively. It is reported that POD is an important enzyme in antioxidant defence mechanism in rice [31], which protects cells against the destructive effect of H_2O_2 [33,34]. Guo et al. [35] also reported that POD is the most abundant enzyme, which is related to freezing resistance. This is in agreement with our findings that POD level is the highest in water-stressed RILs of sunflower.

Despite a strong up-regulation of POD (up to 67 fold-control) by water stress, the expression of POD was not associated directly with phenotyping responses to drought. For example, LR54 showed the highest NPQ and 1-qP under water stress when compared to the other genotypes (Fig. 1), but did not show the highest level of POD transcript abundance. Similarly RHA266, which showed the highest transcript accumulation under water stress, presented the values of NPQ and 1-qP close to that of C147 and LR54 (Fig. 1). Additionally, C100, which could be considered as a relatively tolerant genotype (maintaining Φ PSII close to control under water stress) presented a level of POD close to LR54.

Contribution of both parental lines to QTLs expression, as shown by positive and negative additive gene effects (Table 3), might result in transgressive segregation observed for chlorophyll fluorescence parameters (Table 2). Transgressive segregation was observed for

plant water status and photosynthesis-related traits in our previous study for the same RILs [17,18].

A comparison between QTLs having positive or negative alleles under water stress and physiological performance as well as gene expression level showed that for a QTL of NPQ, located on LG11 (*NPQD.11.1*), positive alleles come from RHA266 parent (Table 3). Graphical genotyping showed that, C100 is the only genotype, which received negative alleles for this QTL from PAC2 (Fig. 2). Therefore the low value of NPQ for C100 compared to the other three genotypes under water stress (Fig. 1) may be partially due to this QTL. However the alleles differences (positive or negative) among four genotypes (C100, C133, C147 and LR54) for this QTL does not reflect their difference in terms of POD gene expression (Fig. 2a). By contrast, another QTL located on LG3 for 1-qP under water stress (*1-qPD.3.1*) could be associated with the large difference between C133 and other genotypes for POD expression; as C133 is the unique genotype having positive alleles from RHA266 for this QTL; and also greater POD gene expression under drought (Fig. 2a and Fig. 3). As RHA266 parent presented the highest POD gene expression (67-fold control), we suggest that transferring positive alleles from RHA266 to C133 may resulted in higher POD gene expression in C133. However, in contrast to *NPQD.11.1*, this QTL (*1-qPD.3.1*) is associated with POD gene expression rather than with physiological performance.

Superoxide dismutase (SOD) catalyzes the dismutation of two superoxide radicals (O_2^-), resulting in the production of H_2O_2 and O_2 [36]. H_2O_2 is then detoxified by catalase (CAT) and/or ascorbate peroxidase (APX). C100 genotype showed the highest level for CAT and SOD expression (Fig. 2c and e). Except for C100, other genotypes showed transcript abundance of SOD and CAT close to their control plants. The highest transcription accumulation of SOD (2.5-fold control) and CAT (4-fold control) in C100 may be related to high H_2O_2 scavenging ability by both enzymes acting together resulting in a high capacity to tolerate stress. Regarding the physiological characteristics of six genotypes in Fig. 1, the probable role of antioxidant enzymes gene expression in maintaining photosynthesis performance can be suggested. C100 showed the highest level of Φ_P , Φ_{PSII} and the lowest level of NPQ and 1-qP suggesting that its photosynthesis performance maintained relatively constant under water stress (Fig. 1). Similarly, C100 showed the highest transcript level for SOD, CAT as well as PSI P700 and PSII 32 Kda Protein (Fig. 2b, c, f, g). In our previous study we also observed that C100 presents a high level of dehydrin gene expression and maintain fructose-1,6 bisphosphatase gene expression close to control plants during water stress [17]. The whole results of our previous research and the present study indicate that the

protective systems (antioxidants and dehydrin genes) in C100 are efficient resulting in maintaining physiological activity close to control under water stress.

In stressful conditions, plants generally increase the activity of many antioxidant enzymes; the elevated activity level usually correlates with increased stress tolerance [37]. Of these enzymes, CATs and SODs are considered as the most efficient antioxidant enzymes in higher plants [38], both of which are up-regulated with high levels in C100 (Fig. 2c and e). We suggest that photosynthesis maintenance (the Φ PSII value close to its control with low value for NPQ and 1-qP) observed for C100 could be the result of the accumulation of different antioxidants in this genotype during water stress.

Comparison of QTL mapping and transcript abundance showed that negative alleles of C100 for '*NPQD.11.1*', could be associated with transcript abundance. Increasing SOD and CAT as well as PSI P700 and PSII 32 Kda in C100 contribute to remove excitation energy, which does not need to be dissipated through NPQ. Therefore heat dissipation (NPQ) remains low under water stress in C100. Beside this QTL, another one '*1-qPD.2.1*' could also be associated with the transcript abundance under water stress. For this QTL, C100 is the only genotype, which received positive alleles from RHA266. Considering that other three genotypes received negative alleles from PAC2, we suggest that this QTL could be also associated with the transcript accumulation in C100 compared with other genotypes (Fig. 3; Fig. 2a, c and d). However, this QTL is associated with transcript abundance and not with 1-qP.

LR54 and RHA266 showed the highest level of glutathione *S*-transferase (GST); and C147 showed the highest level of ascorbate peroxidase (APX) (Fig. 2g and i). These three genotypes (C147, LR54 and RHA266) showed the highest proportion of closed PSII reaction centers (1-qP) due to the limitation of photosynthesis apparatus under water stress (Fig. 1). It seems that ascorbate-glutathione cycle enzymes (GST and APX) were up-regulated with higher levels in three mentioned genotypes because light saturation of photosynthesis was occurred with higher degree than the others; as shown by 1-qP values in Fig. 1. It seems that the allele effects of the identified QTLs were not associated simply with transcript abundance of GST and APX, as the genotypes with different allele effects presented the same level of transcript abundance and vice-versa.

PSI P700 gene expression remained close to control; and PSII 32kDa protein was up-regulated (up to 2-fold control) depending genotypes (Fig. 2k and m). PSII 32kDa protein is involved in electron transport and quinone-binding in the photosystem II complex. The

increased transcript abundance of PSII 32kDa protein in C100 genotype, which showed 2-fold transcript accumulation, may result in electron transport facility under water stress.

It has been reported that AOS scavenging depends on the integrated system of non-enzymic and enzymatic antioxidants [12]. Gamma-tocopherol methyltransferase may not be involved efficiently in drought tolerance as in contrast to all other genes, it was down-regulated. LR54 showed 2-fold decreasing gamma-tocopherol transcript under water stress. Santrucek and Krepelka [39] showed that alpha-tocopherol protects cell membranes against oxidative damages. However the role of gamma-tocopherol as antioxidant is not still quite clear.

After 36h of rehydration the expression of GST, APX, PSI P700, SOD, CAT, POD and PSII 32 kDa protein returned to the control levels in all genotypes with some exceptions (Fig. 2). Taken as a whole, down-regulation of antioxidants after rehydration indicates that active oxygen species formed during water stress, are efficiently removed upon rehydration in all genotypes except in C133 which may needs further times to remove AOS by increasing the content of different antioxidants. C133 genotype showed up-regulation of antioxidant enzymes such as POD (25-fold control), APX, SOD and CAT after rehydration, which was higher when compared with all other genotypes. However, RHA266 showed also up-regulation for some genes but close to control plants.

In conclusion, the progressive water stress did not cause long-term down-regulation of photosynthesis apparatus (ΦP); but it reduced actual efficiency of PSII electron transport ($\Phi PSII$). Some RILs showed a high capacity for energy dissipation via non-photochemical quenching (NPQ) and over-excitation of PSII reaction centers (1-qP) was also occurred in some RILs. Differential expression of the antioxidants under drought conditions highlighted the different role of each of them in drought acclimation process in sunflower. The expression of all genes encoding antioxidant enzymes were increased under water stress; and based on the magnitude of up-regulation, significant higher level of POD showed its important role as antioxidant enzyme. Different antioxidant co-operating with higher level in C100 resulted in maintenance of photosynthetic performance (high $\Phi PSII$ and low 1-qP values). The positive and negative alleles of some QTLs were associated with higher physiological activity and sometimes with the transcript abundance of some antioxidant enzymes. Although the association of some QTLs with antioxidant gene expression was observed, further work is necessary for precisely identification of genes related to each QTLs.

References

- [1] F.I. Pugnaire, L. Serrano, J. Pardos, In: M. Passaraki (Eds), Handbook of photosynthesis, Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 271-283.
- [2] A. Hugo. Pinheiro, M. DaMatta Fabio, R.M. Chaves Agnaldo, P.B. Fontes Elizabeth, E. Loureiro Marcelo, Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clone of *Coffea canephora* subjected to long-term drought, *Plant Sci.* 167 (2004) 1307-1314.
- [3] J.E. Muller, M.S. Whitsitt, Plant cellular response to water deficit, *Plant Growth regul.* 20 (1996) 41-46.
- [4] D.H. Lawlor, The effects of water deficit on photosynthesis, in: N. Smirnoff (Eds), Environment and Plant Metabolism-Flexibility and Acclimation, BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1995, pp. 129-156.
- [5] P. Maury, F. Mojayad, M. Berger, C. Planchon, Photochemical response to drought acclimation in two sunflower genotypes, *Physiol. Plant* 98 (1996) 57-66.
- [6] K. Asada, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 601-639.
- [7] W.W. Adams, B. Demming-Adams The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter, *Plant Cell Environ.* 18 (1995) 117-127.
- [8] G.Y. Ben, C.B. Osmond, T.D. Sharkey, Comparison of photosynthetic responses of *Xanthium strumarium* and *Helianthus annuus* to chronic and acute water stress in sun and shade, *Plant Physiol.* 84 (1987) 476-482.
- [9] W. Bilger, O. Bjorkman, Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L, *Planta* 184 (1991) 476-482.
- [10] D. Pankovic, Z. Sakac, S. Kevresan, M. Plesnicar, Acclimation to long-term water deficit in the leaves of two sunflower hybrids: Photosynthesis, electron transport and carbon metabolism, *J. Exp. Bot.* 330 (1999) 127-138.
- [11] G. Cornic, J.M. Briantais, Partitioning of photosynthetic carbon flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentration and during drought stress, *Planta* 183 (1991) 178-184.

- [12] K. Asada, Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue, in: C. H. Foyer, P. M. Mullineaux (Eds), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 77-104.
- [13] R. Mittler, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends Plant Sci. 7 (2002) 405-410.
- [14] S. Jung, Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought, Plant Sci. 166 (2004) 459-466.
- [15] J.G. Scandalios, Oxygen stress and superoxide dismutases, Plant Physiol. 101 (1993) 7-12.
- [16] M. Katsuhara, T. Otsuka, B. Ezaki, Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathion S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*, Plant Sci. 169 (2005) 369-373.
- [17] S. Poormohammad Kiani, P. Grieu, P. Maury, T. Hewezi, L. Gentzbittel, A. Sarrafi, 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 (2007a) 193-207.
- [18] S. Poormohammad Kiani, P. Talia, P. Maury, P. Grieu, R. Heinz, A. Perrault, V. Nishinakamasu, E. Hopp, L. Gentzbittel, N. Paniego, A. Sarrafi, Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments, Plant Sci. (2007b) doi:10.1016/j.plantsci.2006.12.007.
- [19] A.A. Schneiter, J.F. Miller, Description of sunflower growth stages, Crop Sci. 21 (1981) 901-903.
- [20] SAS Institute Inc, Sas guide for personal computers, 9th edn, 2002, SAS Institute, Cary.
- [21] T.C. Verwoerd, B.M. Bekker, A. Hoekema, A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs, Nucleic Acid Res. 17 (1989) 2362.
- [22] T. Hewezi, M. Petitprez, L. Gentzbittel, Primary metabolic pathways and signal transduction in sunflower (*Helianthus annuus* L.): comparison of transcriptional profiling in leaves and immature embryos using cDNA microarray, Planta 223 (2006) 948-964.
- [23] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, Methods 25 (2001) 402-408.
- [24] C.J. Basten, B.S. Weir, Z.B. Zeng, QTL cartographer version 1.16, Program in Statistical Genetics, Department of Statistics, North Carolina State University, 2002.
- [25] R. Van Berloo, GGT software for the display of graphical genotypes. J. Heredity 90 (1999) 328-29.

- [26] R.N. Baker, E. Rosenqvist, Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities, *J. Exp. Bot.* 403 (2004) 1607-1621.
- [27] G.H. Mohammed, W.D. Binder, S. L. Guillies, Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation, *Scand. J. For. Res.* 10 (1995) 383-410.
- [28] Y. Fracheboud, J. Leipner, The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature and drought stress. In: DeLL JR, Tiovonen PMA eds, *Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology*. Boston: Klower Academic Publishers, 2003, pp 125-150.
- [29] K. Maxwell, G.N. Johnsen, Chlorophyll fluorescence-a practical guide, *J. Exp. Bot.* 345 (2000) 659-668.
- [30] C.B. Osmond, J. Ramus, G. Levavasseur, L.A. Franklin, W.J. Henley, Fluorescence quenching during photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid, *Planta* 190 (1993) 97-106.
- [31] B. Srivalli, S. Geetanjali, K.C. Renu, Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water followed by recovery, *Physiol. Plant* 119 (2003) 503-512.
- [32] H. Oidaira, S. Sano, T. Koshiha, T. Ushimaro, Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *J. Plant Physiol.* 156 (2000) 811-813.
- [33] C. Sudhakar, A. Lakshmi, S. Grirdarakumar, Changes in antioxidant enzymes activity in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity, *Plant Sci.* 161 (2001) 613-619.
- [34] C.L. Lin, C.H. Kao, Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings, *Plant Growth Reg.* 37 (2002) 177-184.
- [35] F.X. Guo, M.X. Zhang, Y. Chen, W.H. Zhang, S.J. Xu, J.H. Wang, L.Z. An, Relation of several antioxidant enzymes to rapid freezing resistance in suspension cultured cells from alpine *Chorispora bungeana*, *Cryobiology* 52 (2006) 241-250.
- [36] K.H. Baek, D.Z. Skinner, Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines, *Plant Sci.* 165 (2003) 1221-1227.
- [37] R.D. Allen, Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants, *Plant Physiol.* 107 (1995) 1049-1054.
- [38] K.D. Vichnevetskaia, D.N. Roy, Oxidative stress and antioxidative defence with emphasis on plant antioxidants, *Environ. Rev.* 7 (1999) 31-51.
- [39] M. Santrucek, J. Krepelka, Antioxidants-potential chemotherapeutic agents, *Drugs of future*, 13 (1988) 974-996.

Table 1

Primers used in quantitative real-time RT-PCR expression analysis.

Target gene	Accession	Sequence of primers (5' to 3')
Peroxidase (POD)	CD846768	F: GGTCGCCTTATCAGGATCTCAT R: CTTCCCCGAAACCTAACACATC
Catalase (CAT)	CD846315	F: GTTGTCCGGAAAGCGTGATAA R: CTCCTGCCTGCTTGAAGTTGT
Superoxide dismutase (SOD)	AJ786258	F: GCAGAAGGTGCTCCCACAAC R: CCATGTGGTCCGGGTTTAAG
Glutathion <i>S</i> -transferase (GST)	CD846763	F: TTCACATTGGCGGATCTTCA R: TTCGCCTTTGTTCCAAACAAA
Ascorbate peroxidase (APX)	CD852589	F: CAGTTGGCAGGTGTTGTTGCT R: TCCGGGATGGAAAGGAACTT
PSI P700	CX944063	F: CGTGGAAATACATGCCACTCA R: TAGTGCGCATTTCGGTCAAC
PSII 32 Kda Protein	CX944441	F: GCTGCTTCCCATATTGGGTAAA R: TCCGGTGCCATTATTCCTACTT
Gamma-tocopherol methyltransferase	CD852146	F: AAGGGTTGGCCGATAAGGTT R: ATCAGGAAACGGCTGGTTCA

Table 2

Analysis of variance for physiological traits on well-watered and water-stressed recombinant inbred lines of sunflower

Trait	Well-watered				Water-stressed				Effects
	PAC2	RHA266	RILs		PAC2	RHA266	RILs		
			Range	Mean			Range	Mean	
ΦP	0.805	0.803	0.762-0.852	0.807	0.790	0.804	0.765-0.846	0.806	W ^{NS} , R ^{***} , I ^{NS}
$\Phi PSII$	0.436	0.431	0.345-0.532	0.451	0.331	0.262	0.118-0.370	0.240	W ^{**} , R ^{NS} , I ^{NS}
NPQ	1.324	1.012	0.850-2.201	1.261	2.371	2.353	1.508-3.022	2.282	W ^{**} , R [*] , I ^{NS}
1-qP	0.213	0.375 ^a	0.000-0.476	0.242	0.326	0.685*	0.000-0.823	0.481	W ^{***} , R ^{***} , I ^{***}

 ΦP : potential photochemical efficiency of PSII electron transport $\Phi PSII$: actual efficiency of PSII electron transport

NPQ: non-photochemical fluorescence quenching

1-qP: proportion of closed PSII traps

^a: significant difference between PAC2 and RHA266 (LSD at 0.05)

W: water treatment effect

R: RIL (genotype) effect

I: water treatment×RIL effect

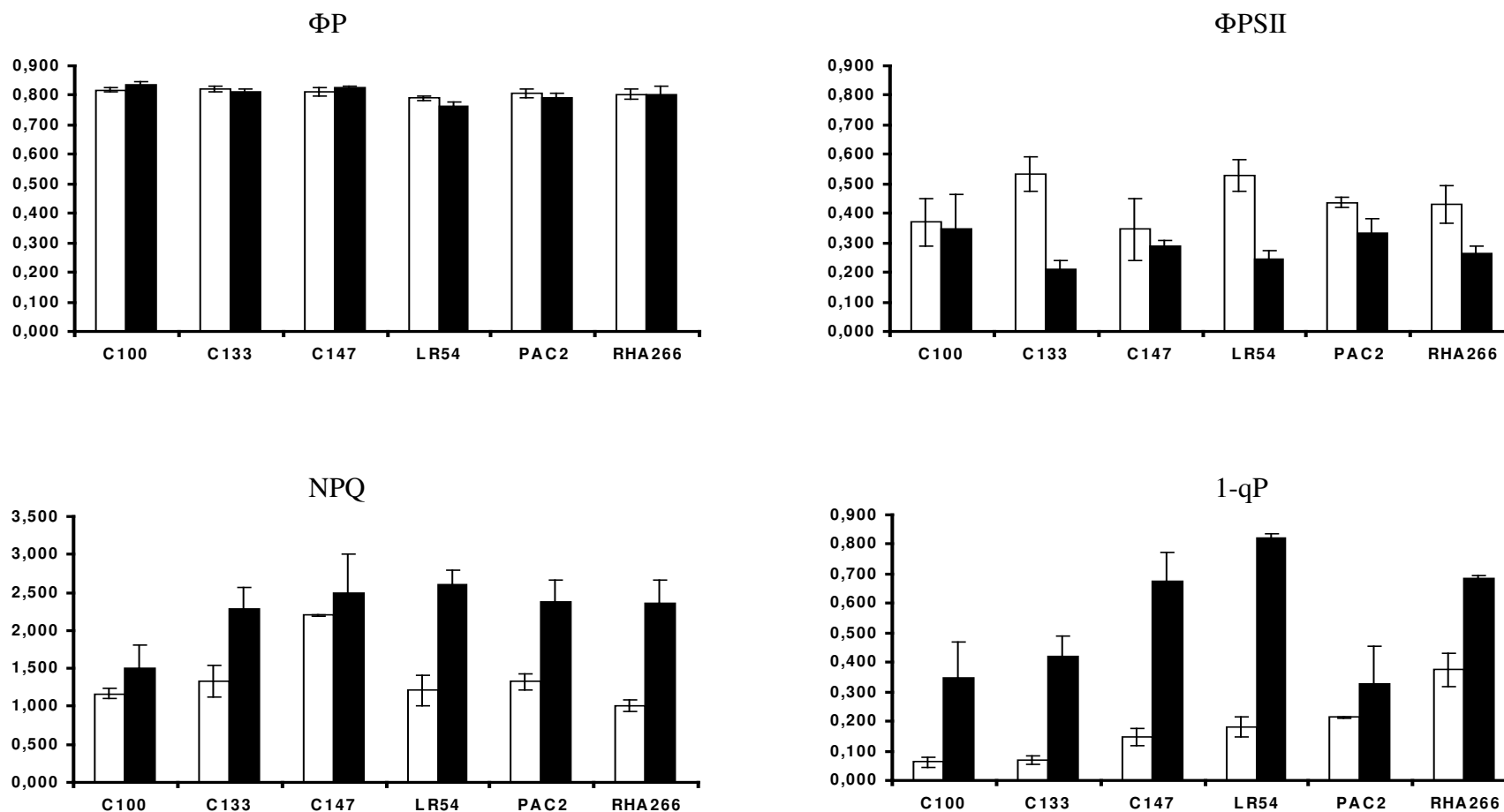
, * and NS, significant at 0.01, 0.001 probability levels and non-significant

Table 3

QTL detected for physiological traits by composite interval mapping (CIM) in RILs from the cross PAC2 × RHA266 under well-watered and water-stressed conditions.

Traits	Well-watered						Water-stressed					
	QTL name	Linkage group	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²	QTL name	Linkage group	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ²
ΦP	<i>ΦPW.3.1</i>	3	2.0	3.55	0.007	0.11	<i>ΦPD.2.1</i>	2	78.9	4.17	-0.005	0.07
	<i>ΦPW.5.1</i>	5	33.3	5.02	0.008	0.15	<i>ΦPD.4.1</i>	4	28.2	10.70	0.010	0.16
	<i>ΦPW.16.1</i>	16	169.5	3.87	-0.009	0.21	<i>ΦPD.5.1</i>	5	33.3	3.66	0.005	0.06
	<i>ΦPW.17.1</i>	17	8.6	9.17	-0.009	0.19	<i>ΦPD.6.1</i>	6	30.6	8.93	0.008	0.13
	<i>ΦPW.17.2</i>	17	42.6	5.65	0.007	0.13	<i>ΦPD.7.1</i>	7	45.8	6.09	-0.006	0.07
	<i>ΦPW.17.3</i>	17	116.3	3.28	-0.006	0.08	<i>ΦPD.17.1</i>	17	2.0	3.39	-0.005	0.07
						<i>ΦPD.17.2</i>	17	14.6	8.96	-0.008	0.16	
ΦPSII	<i>ΦPSIIW.1.1</i>	1	28.5	6.59	0.022	0.21	<i>ΦPSIID.4.1</i>	4	72.2	5.50	0.031	0.10
	<i>ΦPSIIW.7.1</i>	7	27.8	5.00	0.014	0.10	<i>ΦPSIID.7.1</i>	7	12.4	5.92	0.024	0.13
	<i>ΦPSIIW.8.1</i>	8	107.8	6.28	-0.019	0.18	<i>ΦPSIID.9.1</i>	9	97.1	9.59	-0.034	0.17
	<i>ΦPSIIW.9.1</i>	9	26.1	3.81	-0.012	0.08	<i>ΦPSIID.12.1</i>	12	79.2	6.39	-0.024	0.16
	<i>ΦPSIIW.12.1</i>	12	32.9	3.41	-0.013	0.09	<i>ΦPSIID.13.1</i>	13	52.7	4.43	-0.024	0.11
	<i>ΦPSIIW.14.1</i>	14	32.0	5.97	0.018	0.16						
NPQ	<i>NPQW.4.1</i>	4	30.2	4.09	-0.149	0.16	<i>NPQD.1.1</i>	1	61.6	3.67	0.111	0.12
	<i>NPQW.7.1</i>	7	14.4	5.09	0.111	0.14	<i>NPQD.3.1</i>	3	19.2	3.34	-0.094	0.08
	<i>NPQW.7.2</i>	7	27.6	6.09	0.111	0.14	<i>NPQD.11.1</i>	11	30.3	7.17	-0.154	0.19
	<i>NPQW.8.1</i>	8	59.2	3.13	0.108	0.09	<i>NPQD.16.1</i>	16	84.8	3.29	0.108	0.08
	<i>NPQW.11.1</i>	11	13.7	5.38	0.130	0.11	<i>NPQD.17.1</i>	17	36.4	3.74	-0.104	0.10
	<i>NPQW.11.2</i>	11	32.3	3.36	-0.107	0.09						
	<i>NPQW.12.1</i>	12	53.4	6.38	0.112	0.14						
	<i>NPQW.13.1</i>	13	62.7	3.85	-0.097	0.11						
1-qP	<i>1-qPW.4.1</i>	4	60.3	8.22	0.046	0.11	<i>1-qPD.2.1</i>	2	71.7	5.68	-0.105	0.09
	<i>1-qPW.7.1</i>	7	21.6	5.66	-0.047	0.10	<i>1-qPD.3.1</i>	3	17.2	9.02	-0.310	0.24
	<i>1-qPW.9.1</i>	9	28.7	3.59	-0.033	0.05	<i>1-qPD.4.1</i>	4	56.3	12.72	0.191	0.26
	<i>1-qPW.12.1</i>	12	30.9	7.36	-0.053	0.11	<i>1-qPD.7.1</i>	7	20.7	12.58	-0.175	0.24
	<i>1-qPW.13.1</i>	13	34.0	4.18	0.036	0.07	<i>1-qPD.10.1</i>	10	134.0	5.25	0.219	0.19
	<i>1-qPW.15.1</i>	15	16.4	9.05	-0.057	0.18	<i>1-qPD.12.1</i>	12	77.7	3.07	-0.082	0.05
							<i>1-qPD.13.1</i>	13	21.7	3.23	-0.134	0.11
						<i>1-qPD.15.1</i>	15	12.5	4.63	-0.090	0.07	
						<i>1-qPD.17.1</i>	17	116.3	3.06	0.077	0.05	

Fig. 1. Physiological characteristics of four RILs and their parents ('PAC2' and 'RHA266') selected for gene expression analysis by quantitative real-time RT-PCR. The values are the mean of three replicates \pm SE.



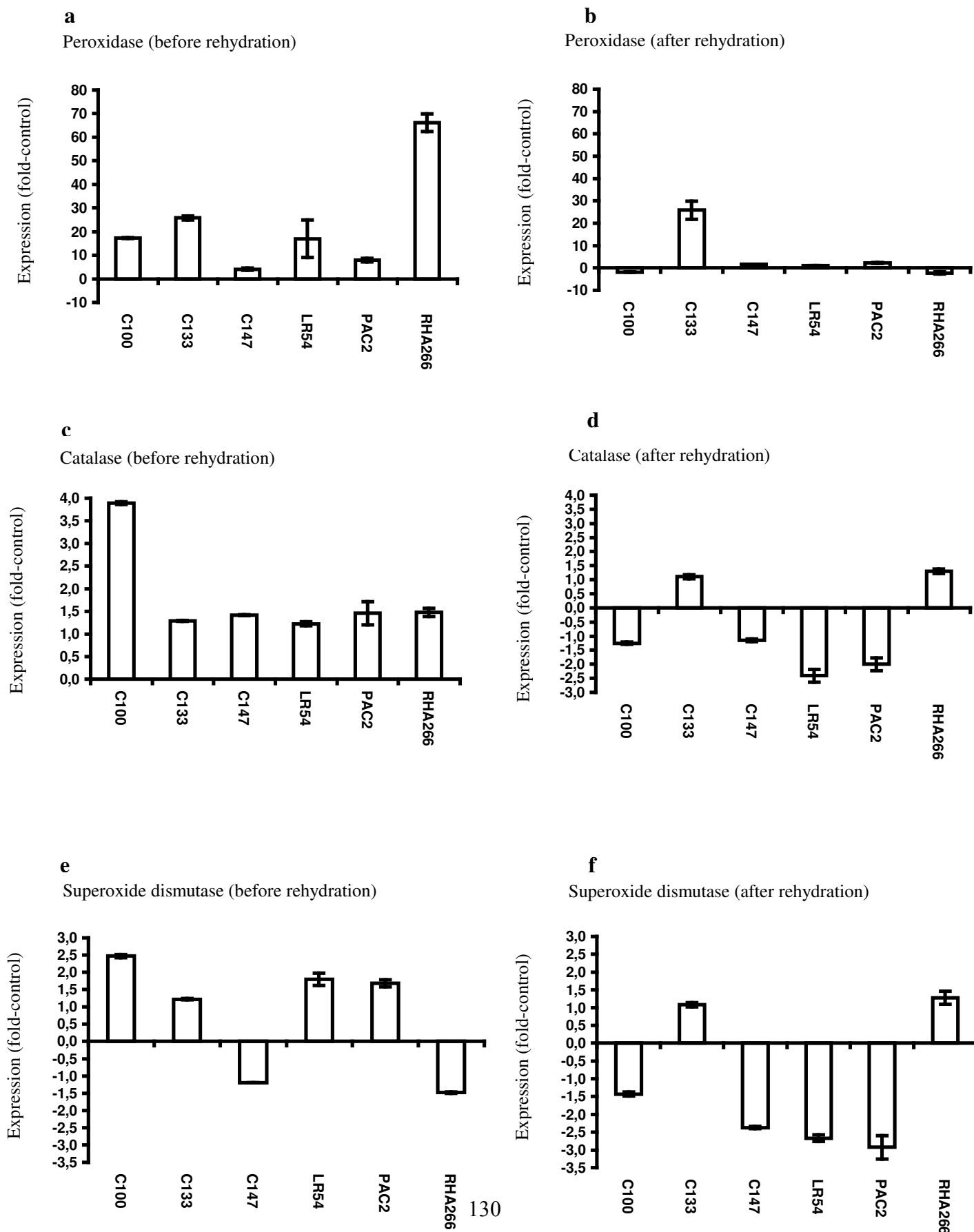
ΦP: potential photochemical efficiency of PSII electron transport

ΦPSII: actual efficiency of PSII electron transport

NPQ: non-photochemical fluorescence quenching

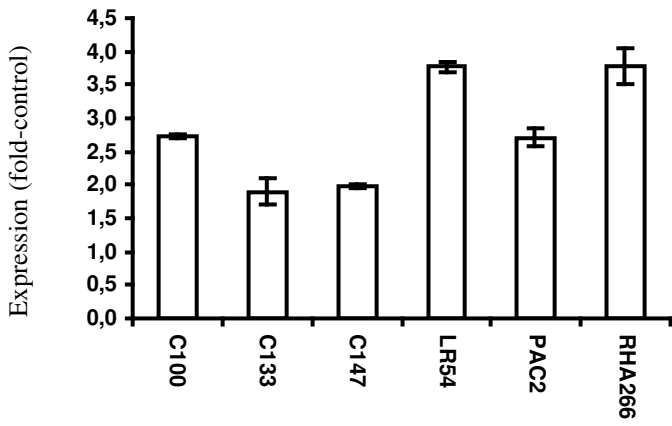
1-qP: proportion of closed PSII traps

Fig. 2. Effect of water stress before and after rehydration on different genes expression determined by quantitative real-time RT-PCR. The transcript levels of each gene in the leaf of water-stressed plants before and after rehydration were plotted as the relative expression (fold) of the non-stressed (well-watered) control plants. The transcript level of actin was used as a reference. Values are mean \pm SE of three independent replicates



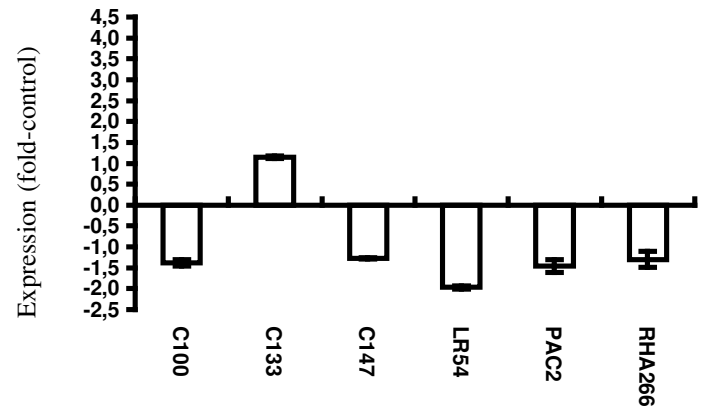
g

Glutathion-s-transferase (before rehydration)



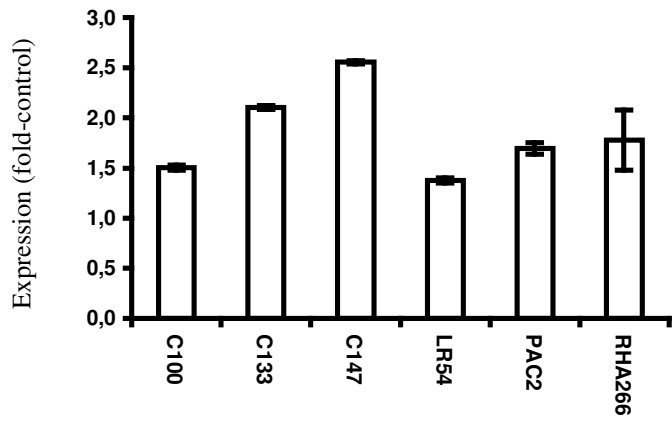
h

Glutathion-s-transferase (after rehydration)



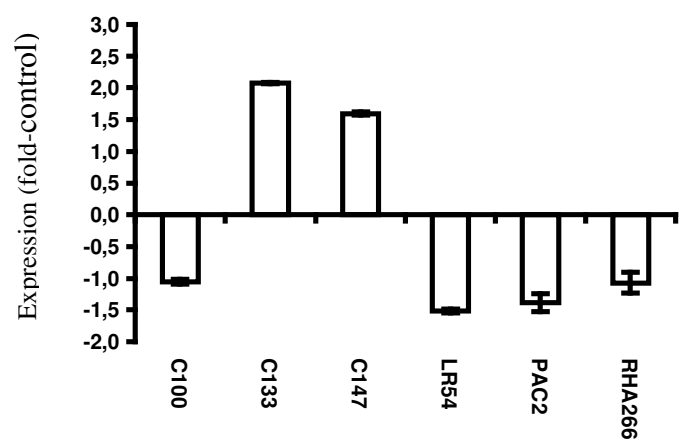
i

Ascorbate peroxidase (before rehydration)



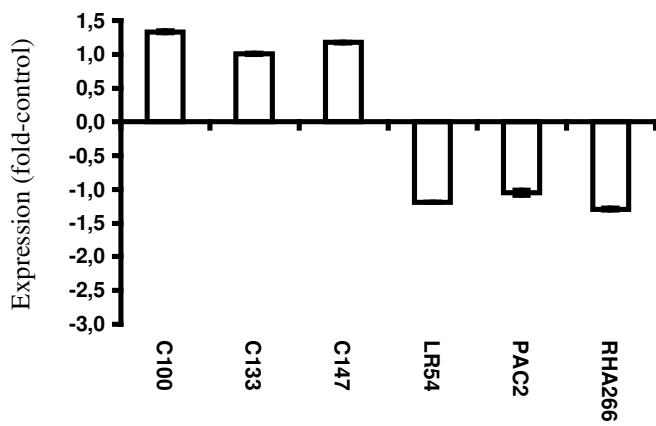
j

Ascorbate peroxidase (after rehydration)

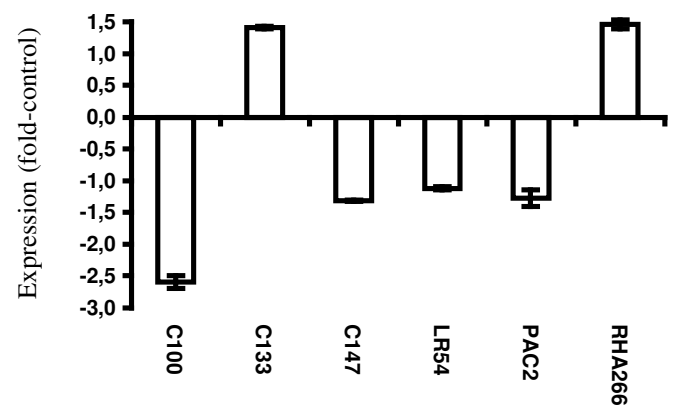


k

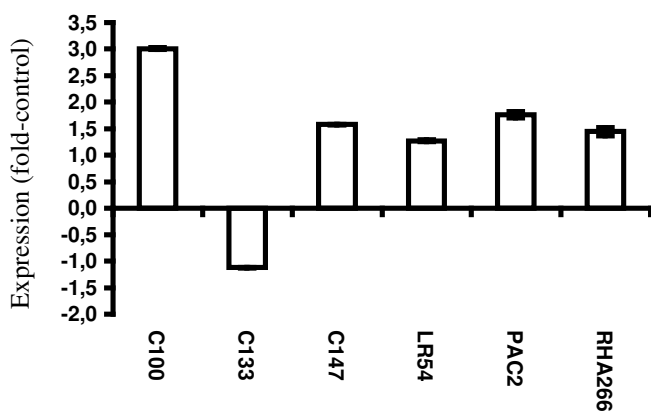
PSI P700 (before rehydration)

**l**

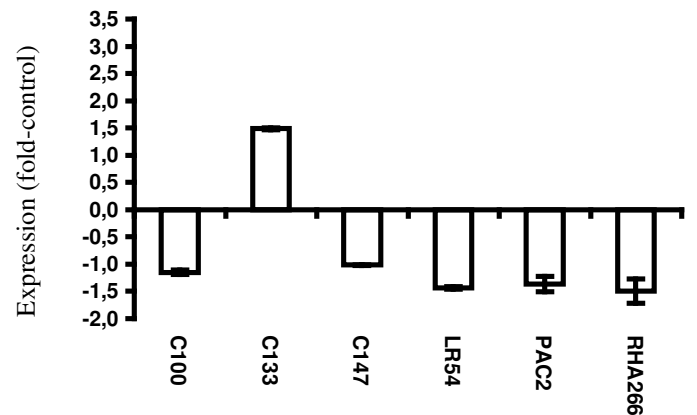
PSI P700 (after rehydration)

**m**

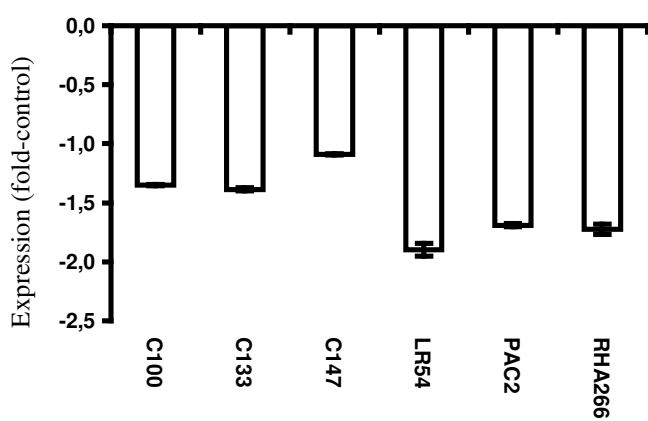
PSII 32 Kda Protein (before rehydration)

**n**

PSII 32 Kda Protein (after rehydration)

**o**

Gamma tocopherol (before rehydration)

**p**

Gamma tocopherol (after rehydration)

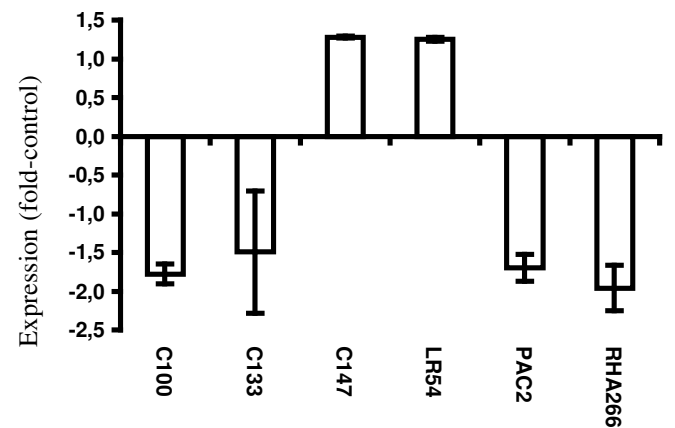
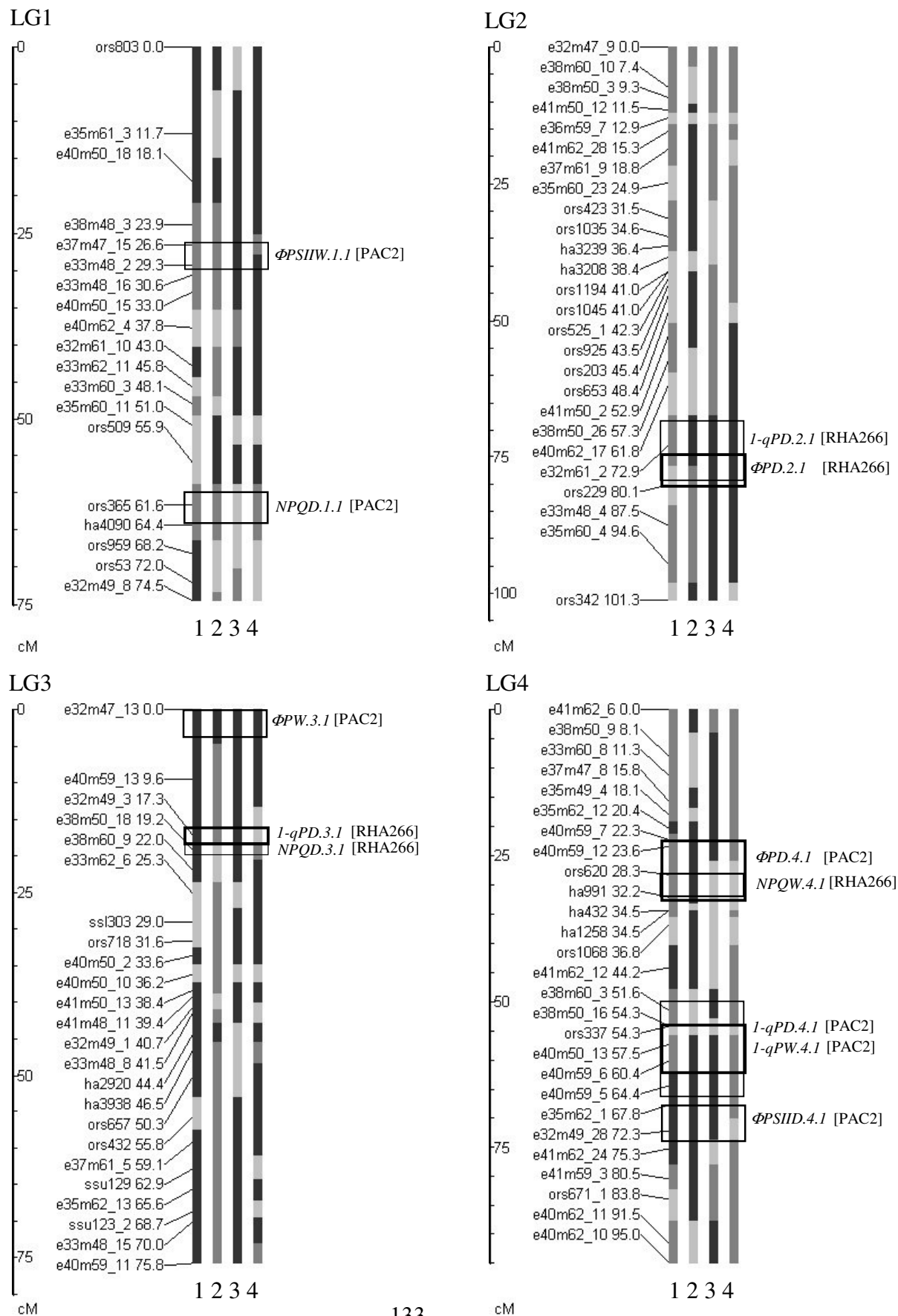
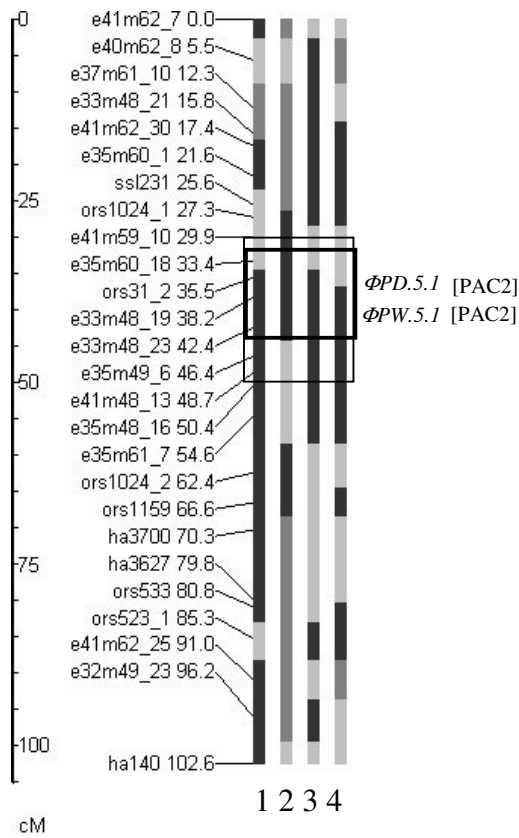


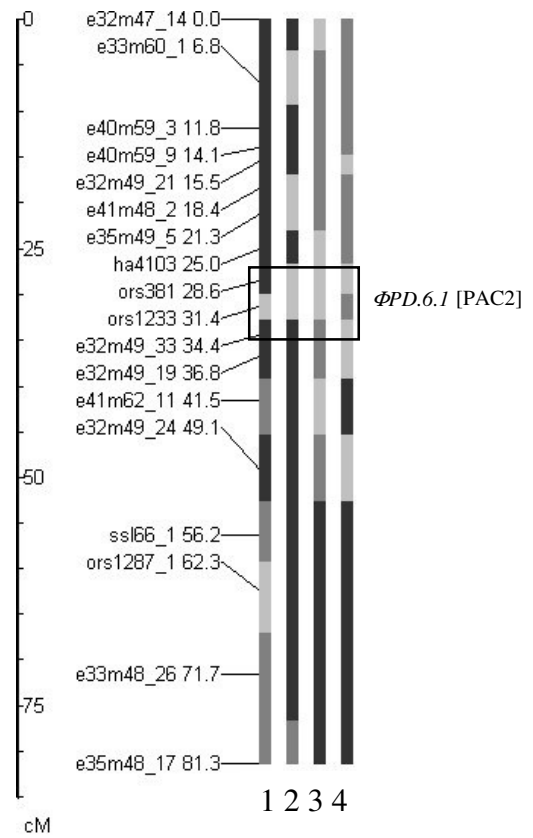
Fig. 3. Graphical genotyping to visualize the linkage groups (LG) and genomic regions of C100 (1), C133 (2), C147 (3) and LR54 (4) from PAC2 (black) and RHA266 (dark gray) and unknown genomic regions (light gray). The markers with their positions are presented in the left side and QTLs are presented in the right side of linkage groups. The QTLs were designated as the potential photochemical efficiency of PSII electron transport (ΦP), actual efficiency of PSII electron transport ($\Phi PSII$), non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and the proportion of closed PSII traps (1-qP) following water treatment (W, well-watered or D, water-stressed), linkage group and QTL number. [PAC2] and [RHA266] show that genomic region with positive alleles come from PAC2 or RHA266 for each QTL.



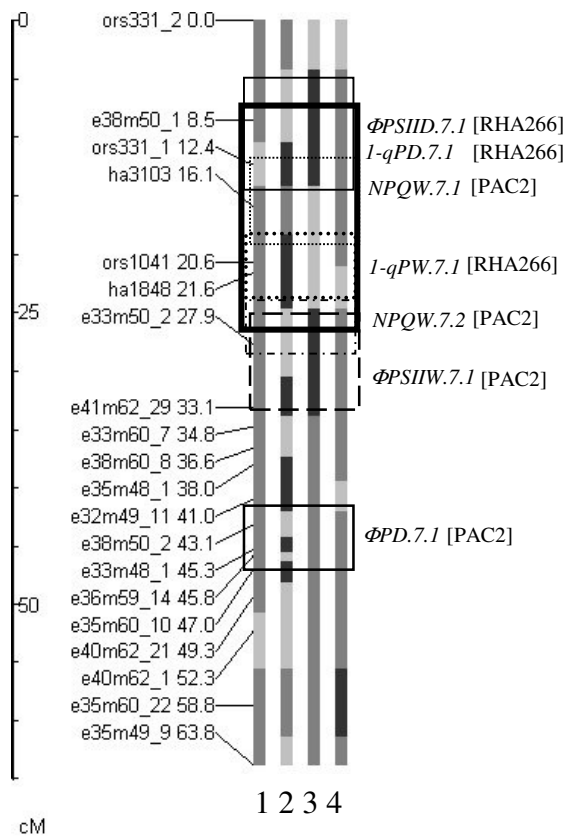
LG5



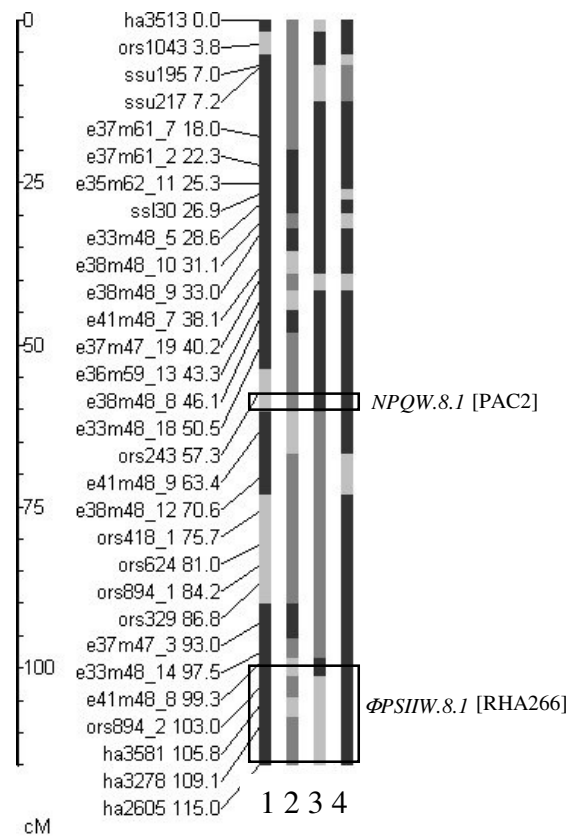
LG6



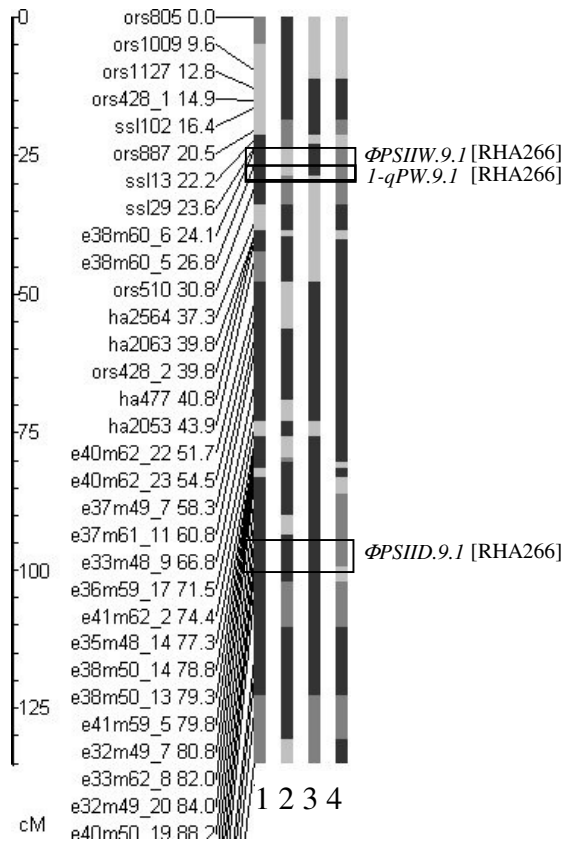
LG7



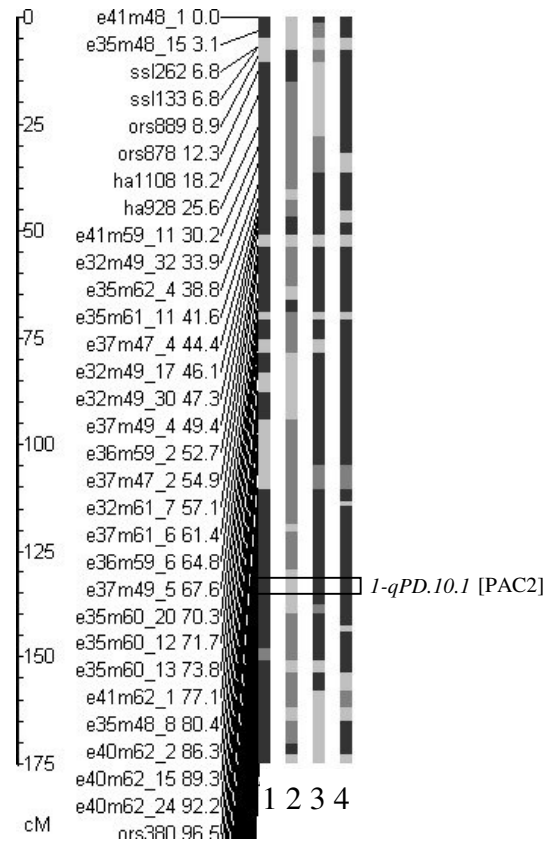
LG8



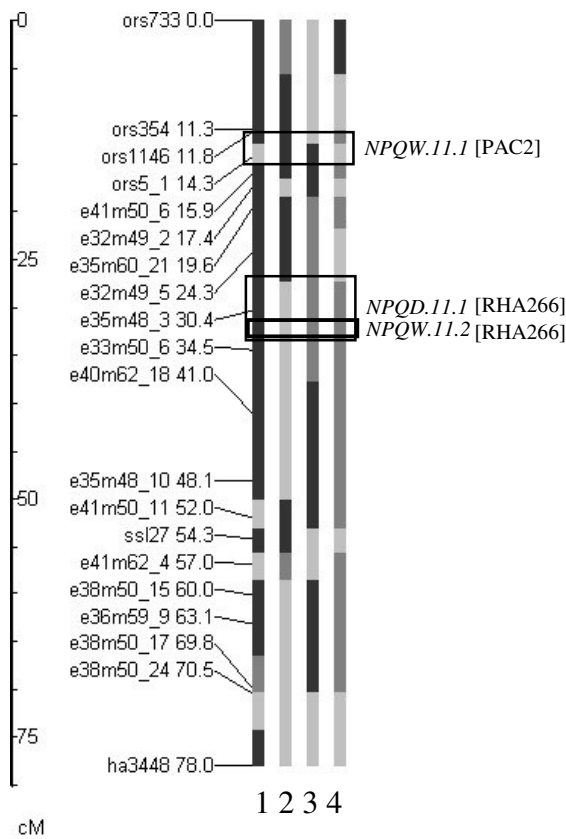
LG9



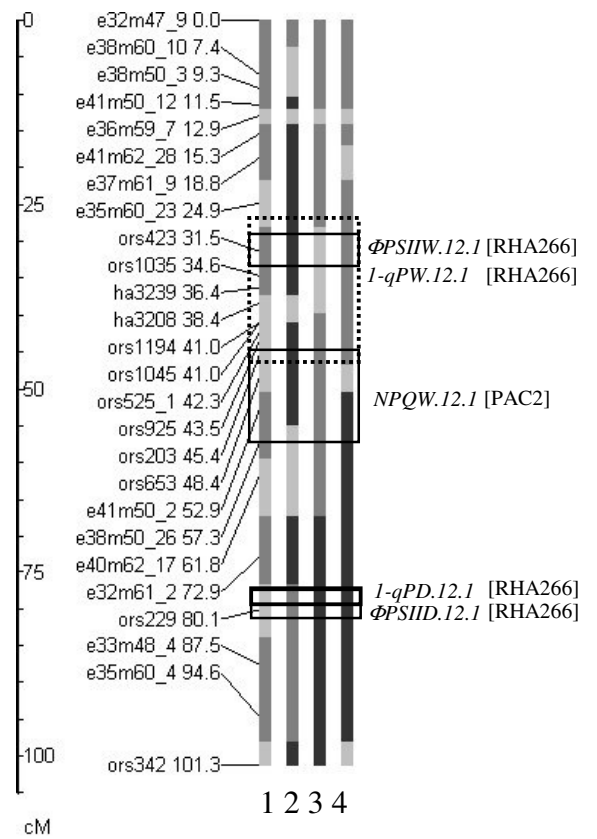
LG10



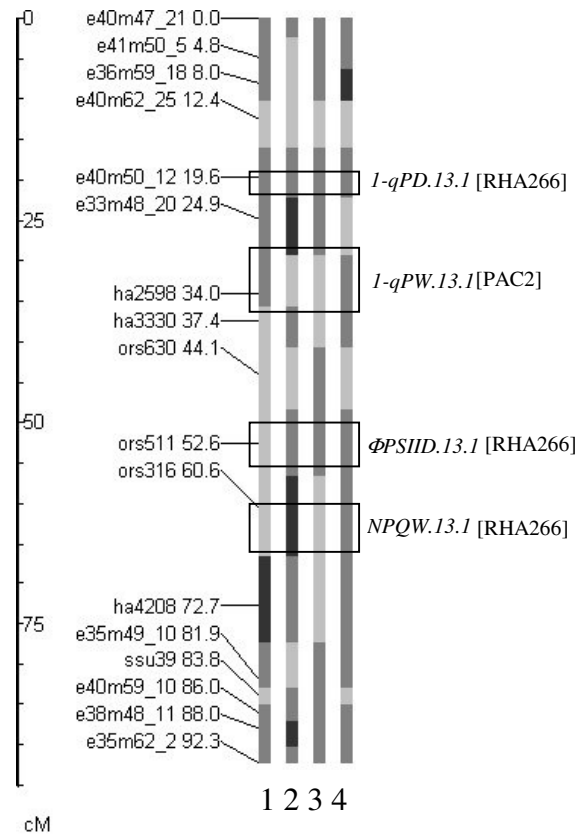
LG11



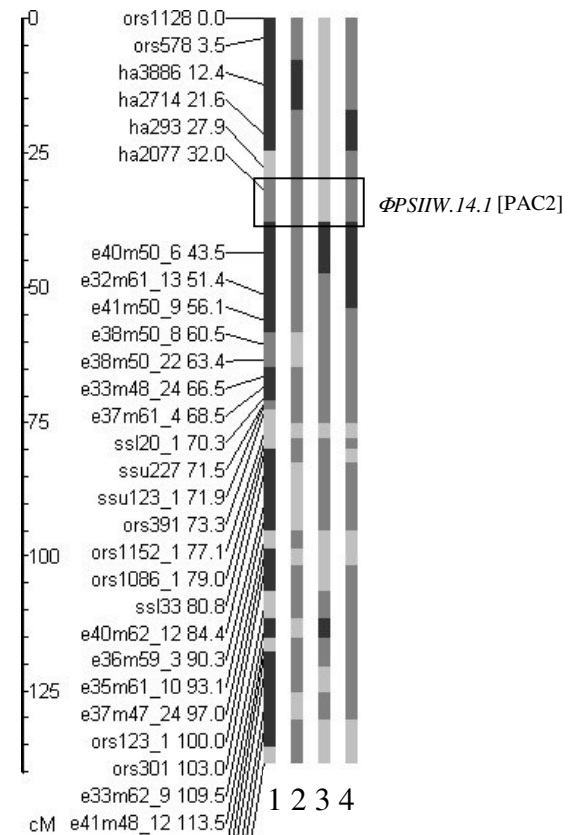
LG12



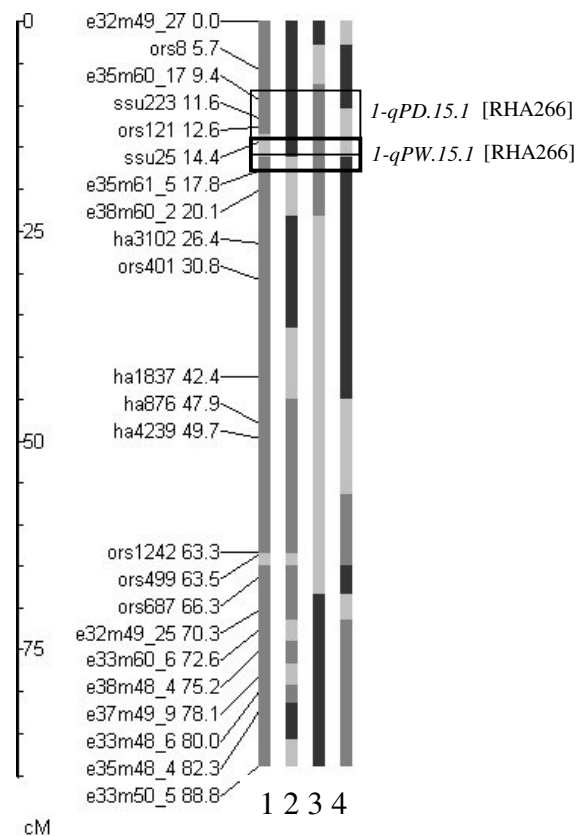
LG13



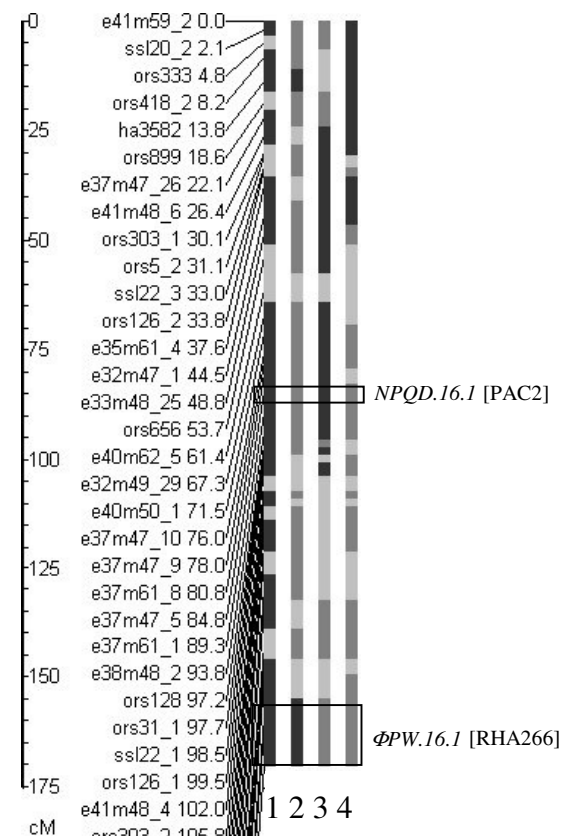
LG14



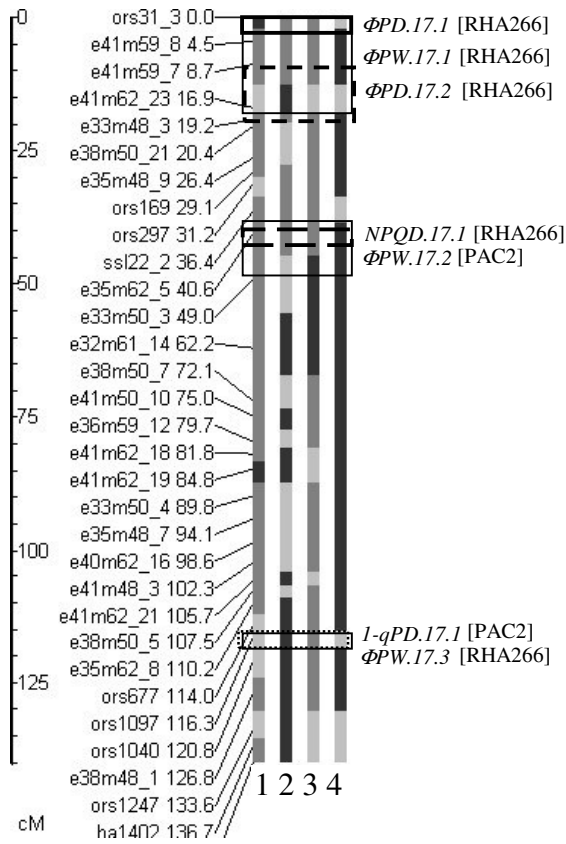
LG15



LG16



LG17



4.2. Synthèse des résultats et conclusion

4.2.1. Variation génétique pour des différents caractères physiologiques analysés

Nous avons observé un effet significatif du stress hydrique sur la variabilité génotypique pour les caractères physiologiques. Nous pouvons noter que les différences entre les génotypes sont plus importantes dans la condition stressée que dans la condition bien-irriguée. Burke (2001) et Srikanthbabu et al. (2002) ont également prouvé que la variabilité génétique pour la réponse au stress pourrait seulement être vue lors de l'exposition de plantes à un stress hydrique. Certaines LIRs ont maintenu leur teneur en eau relative (RWC) sous le stress hydrique, ce qui a été également démontré par Suprunova et al. (2004), suggérant une capacité forte pour la résistance à la sécheresse. La photosynthèse nette (P_n) des plantes réhydratées a différé sensiblement entre les deux parents, indiquant des capacités différentielles pour le rétablissement du stress hydrique. Ceci suggère que les lignées parentales portent différents gènes pour le rétablissement, et qui sont la base de phénomène de transgressions chez certain LIRs. Par contre, les deux parents n'ont pas différé de manière significative pour la photosynthèse nette avant réhydratation. Selon ces résultats, il est probable que les gènes responsables de la résistance à la sécheresse pourraient être différents de ceux responsables du rétablissement de l'effet de stress pendant la réhydratation (Article 1, Tableau 3).

La corrélation significative entre l'ajustement osmotique (AO) et le potentiel de turgescence (Ψ_t) dans notre étude a prouvé que les plantes soumises au stress hydrique peuvent maintenir la turgescence par l'ajustement osmotique, qui a pour conséquence un effet positif sur la photosynthèse dans la condition stressée. L'ajustement osmotique (AO) est important pour maintenir des activités photosynthétiques pendant la déshydratation (Conroy et al. 1988), par son rôle dans le maintien de la turgescence (Turner & Jones 1980 ; Maury et al. 2000; Ober et al. 2005). La corrélation entre la photosynthèse nette (P_n) et la conductance stomatique (g_s) était également fortement significative. La limitation stomatique est principalement impliquée dans la diminution de la photosynthèse (P_n) et de la concentration interne en CO_2 dans les espaces intercellulaires de la feuille (c_i) (Cornic 2000) (Article 1, Tableau 5).

L'analyse de variance effectuée sur 78 lignées recombinant (LIRs) révèle un effet significatif du traitement hydrique pour l'ensemble des paramètres de la fluorescence des chlorophylles étudiés excepté pour l'efficacité photochimique potentiel des PSII pour le transfert des électrons (ΦP). La différence entre les lignées recombinantes est hautement significative pour tout les caractères étudiés excepté la capacités d'utilisation de l'énergie lumineuse ($\Phi PSII$). Les réponses au traitement hydrique ont été affectées par l'interaction significative 'traitement d'eau \times génotype', pour le paramètre '1-qP' qui estime l'inactivation des PSII, suggérant des réponses différentes des génotypes au déficit hydrique (Article 2, Tableau 2).

On a observé de grandes différences entre les génotypes sélectionnés pour l'analyse de l'expression des gènes. La photosynthèse nette (P_n) des génotypes C100 et C133 n'est probablement pas limitée par des facteurs métaboliques étant donné que ces LIRs maintiennent la RWC sous condition stressée. Par conséquent, la concentration intercellulaire en CO_2 (c_i) a été diminuée en raison de la consommation du CO_2 par la photosynthèse sous le stress hydrique. Le génotype LR54, présente probablement une limitation de la photosynthèse par des facteurs métaboliques (limitation non-stomatique) consécutive à la diminution de RWC et associée à une augmentation de la concentration intercellulaire en CO_2 (c_i), comme l'ont précédemment décrit Lawlor & Cornic (2002) et Lawlor (2002) (Article 1, Tableau 6).

Le génotype C100 maintient les capacités d'utilisation de l'énergie lumineuse pour le transport des électrons ($\Phi PSII$) et semble donc peu affecté au niveau photochimique par le stress hydrique lors de déshydratation. Par contre LR54, C147 et leur parent 'RHA266' ont montré une augmentation forte des valeurs 1-qP. Les génotypes LR54 et C147 présentent les valeurs les plus élevées pour NPQ, et une diminution forte de $\Phi PSII$ dans la condition du déficit hydrique. Nous pouvons noter que les valeurs des paramètres de fluorescence des chlorophylles sont concordantes avec les valeurs des paramètres des échanges gazeux pour les lignées analysées (Article 2, Figure 1).

4.2.2. Analyses de l'expression des gènes par « quantitative real-time RT-PCR » et des QTLs

Le niveau d'expression de l'aquaporine est étroitement associé à RWC, au potentiel hydrique de feuilles (Ψ_w) et au potentiel osmotique (Ψ_s) (Article 1). LR54 a montré la plus grande

diminution du niveau de transcrite de l'aquaporine (100 fois). Ce génotype présente également les plus basses valeurs pour la teneur en eau relative (RWC), le potentiel hydrique de feuille (Ψ_w), le potentiel osmotique (Ψ_s) et la photosynthèse nette (Pn) avec des valeurs les plus élevées de concentration interne en CO_2 (C_i), probablement en raison des limitations chloroplastiques sous le stress hydrique. D'autres génotypes, qui ont présenté une valeur plus élevée pour: RWC (jusqu'à 79%), Ψ_w et Ψ_s sous contrainte hydrique, ont montré également un niveau d'expression du gène d'aquaporine plus élevé. D'autre part, quand RWC et Ψ_w ou Ψ_s sont diminués, l'expression du gène d'aquaporine est également diminué afin de conserver l'eau cellulaire. Smart et al. (2001) ont montré qu'une diminution d'expression du gène d'aquaporine cause une réduction de la perméabilité à l'eau de la membrane cellulaire et peut favoriser la conservation cellulaire de l'eau pendant des périodes de contraintes hydriques.

L'analyse des QTL a montré que pour des QTLs contrôlant RWC (*rwc.2.1*) et Ψ_s (*Opot.7.2*), sur les groupes de liaisons 2 et 7, les allèles favorables viennent du parent 'PAC-2'. Le génotypage « graphique » a révélé que pour les deux QTLs mentionnés, le génotype LR54 est le seul génotype qui porte une région génomique avec des allèles à effets négatifs provenant du parent 'RHA-266'. Ces régions génomiques (*'rwc.2.1'* et *'Opot.7.2'*) peuvent être associées aux différences d'abondance des transcrits d'aquaporine et également à l'état hydrique observé chez LR54 comparativement aux autres lignées. Les allèles négatifs de LR54 ont pu diminuer l'expression de gène d'aquaporin dans des conditions de faible RWC et Ψ_s . Cependant, LR54 porte des régions génomiques ayant des allèles avec des effets positifs pour tous les QTLs du potentiel de turgescence (Ψ_t) et de l'ajustement osmotique (AO), ce qui expliquerait pourquoi LR54 présente le niveau le plus élevé de Ψ_t et de AO comparé aux autres génotypes. Ces résultats suggèrent que deux mécanismes complémentaires peuvent être impliqués quand les plantes sont soumises aux déficits hydriques: l'un diminue l'expression de gène d'aquaporine pour conserver l'eau cellulaire, et l'autre augmente le potentiel de turgescence par l'intermédiaire de l'ajustement osmotique. Sarda et al. (1997) ont prouvé que les transcrits de l'aquaporine (*suntip7*) s'accumulent quand les stomates sont fermés.

Malgré une accumulation très élevée de déhydrines (jusqu'à 90-fois) sous contrainte hydrique, le niveau de transcription des déhydrine s n'est pas associé directement à l'état hydrique des plantes, et les LIRs avec des niveaux de RWC et Ψ_w comparables ont montré une grande différence d'accumulation de ces transcrits. Les génotypes C100 et C147, qui ont montré

l'accumulation de déhydrines la plus élevée (90-fois) et plus faible (5-fold) respectivement, ont présenté des l'états hydriques et des niveaux d'échanges gazeux équivalents sous condition stressée. Nos résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Cellier et al. (1998) dans lesquels les transcrits de déhydrines s'accumulent généralement aux niveaux élevés dans les lignées de tournesol soumises à une contrainte hydrique, mais les transcriptions ne se sont pas accumulées en fonction du potentiel de l'eau dans la feuille. Les résultats de l'analyse QTL et le « géotypage graphique » ont confirmé qu'il n'y a pas un rapport clair entre l'accumulation de déhydrines et les allèles positifs portés par les RILs pour les différents QTLs. Le géotype C147 qui présente la plus basse accumulation de transcrits pour les déhydrines, ne présente pas de différence allèlique pour les QTL des paramètres hydriques par rapport aux autres géotypes. Ce résultat s'expliquerait par le fait que les déhydrines sont impliquées dans la tolérance à la sécheresse au niveau de la protection structurale plutôt qu'au niveau des processus photosynthétiques ou de l'état hydrique (Ramanjulu & Bartels 2002).

Nous avons démontré que le niveau d'expression du gène « leafy cotyledon1-like protéine » est diminué fortement par la déshydratation et augmenté suite à la réhydratation; il peut donc être un gène candidat pour la tolérance à la sécheresse. Cependant, il n'est pas accumulé en fonction du statut de l'état hydrique; et les QTLs n'ont pas été associés à l'abondance de ce transcrit.

Dans notre étude, la diminution de la photosynthèse observée en réponse au déficit hydrique chez toutes les LIRs étudiées pourrait être partiellement due à la répression de transcription du gène de la fructose-1,6 bisphosphatase en condition de stress hydrique. Deux QTLs pour la photosynthèse ('*Pho.10.2*' et '*Pho.13.1*') ont été étroitement associés à la capacité de photosynthèse des quatre LIRs mais pas à l'abondance des transcrits de la fructose-1,6 bisphosphatase sous le stress hydrique. Ces deux QTLs expliquent de grandes différences observées entre LR54 et d'autres géotypes pour la Pn. Un autre QTL, qui peut contribuer à une capacité photosynthétique élevée, comme observé pour C133 sous la contrainte hydrique, est situé sur le groupe de liaison 14 (*Pho.14.1*). Le géotype C133 porte les allèles positifs de 'PAC-2' pour ce QTL. Bien que les quatre LIRs portent les différentes régions génomiques pour les trois QTLs mentionnés, elles présentent presque la même niveau d'expression de fructose-1,6 bisphosphatase. Par conséquent ces trois QTLs n'ont pas été associés au niveau de

transcrits pour ce gène, mais ont été associés à la variation phénotypique observée. Deux autres QTLs, pour lesquels chacun des quatre génotypes a reçu les allèles négatifs, sont situés sur le groupe de liaison 3 (*Pho.3.1*) et 10 (*Pho.10.1*). Les allèles augmentant des réponses phénotypiques pour ces deux QTLs viennent de 'RHA-266' mais chacune des quatre LIRs a reçu ces régions de QTL du parent 'PAC-2' ou d'un segment inconnu (C133). Ces QTLs pourraient être associés à la répression de la fructose-1,6 bisphosphatase étant donné que toutes les LIRs ont montré la même répression de la fructose-1,6 bisphosphatase et présentent les allèles négatifs pour ces QTLs. Pendant la réhydratation après stress hydrique, les LIRs qui ont montré un taux photosynthétique net (P_n) élevé, ont également montré un niveau de transcription de la fructose-1,6 bisphosphatase comparable aux plantes non-stressées. Ces résultats suggèrent que la répression de la fructose-1,6 bisphosphatase pourrait jouer un rôle dans la limitation non-stomatique de la photosynthèse sous le stress hydrique.

La comparaison générale de l'expression des gènes d'antioxydants (Article 2) a montré que le stress hydrique a changé le niveau de transcrits de presque tous les antioxydants avec une réponse différentielle chez différents génotypes. Les changements de l'expression de gènes d'antioxydants chez les génotypes soumis à un déficit hydrique suggèrent que le stress oxydatif est potentiellement un composant important du stress hydrique chez le tournesol.

Les niveaux de transcrits de la peroxydase (POD), la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion-s-transférase (GST) et de l'ascorbate peroxydase (APX) sont plus élevés chez tous les génotypes en réponse à la contrainte hydrique (Article 2, Figure 2). L'expression de la peroxydase semble être la plus affectée lors du déficit hydrique, puisqu'on observe une augmentation forte dans l'abondance de ces transcrits de 4 à 66.6 fois selon le génotype. Malgré de fortes augmentations de transcrits de la POD (jusqu'à 67) par le déficit hydrique, l'expression de la POD n'a pas été associée directement aux réponses phénotypiques à la sécheresse. Par exemple, LR54 a présenté les valeurs les plus élevées pour NPQ et 1-qP comparé aux autres génotypes, mais elle ne présente pas le plus haut niveau de l'expression de POD. De même, RHA266, qui a montré l'accumulation de transcrits la plus élevée, a présenté les valeurs de NPQ et de 1-qP près de celles observées pour C147 et LR54. En plus, le génotype C100, qui pourrait être considéré comme un génotype relativement tolérant (elle maintient Φ_{PSII} lors du déficit hydrique) a présenté un niveau de POD proche de LR54.

Le génotype C100 a montré également le plus haut niveau pour l'expression de la CAT et de la SOD et également pour les protéines PSI P700 et PSII 32 Kda comparativement aux autres génotypes. L'accumulation de transcripts la plus élevée pour la SOD (2.5 fois) et la CAT (4 fois) dans C100 peut être liée à la capacité élevée de détoxification de H₂O₂ par les deux enzymes agissant ensemble, ayant pour résultat une capacité élevée de tolérer le déficit hydrique. L'ensemble des résultats de la présente étude indiquent que les systèmes protecteurs (antioxydants et le gène des dehydrines) chez le génotype C100 sont efficaces et permettent le maintien des activités physiologiques pour l'assimilation du CO₂. Les allèles positifs et négatifs de QTLs, comme ceux de '*1-qPD.2.1*' et '*NPQD.11.1*' contrôlant 'le taux de réduction de QA' et 'la part d'énergie lumineuse dissipée de façon thermique', sont associés à une activité physiologique plus élevée et également à l'expression d'enzymes antioxydants en situation de contrainte hydrique. Après 36h de réhydratation, les valeurs d'expression de GST, d'APX, de PSI P700, de SOD, de CAT, de POD et de la protéine PSII 32kDa sont comparables aux niveaux des plantes non-stressées chez tous les génotypes, excepté pour C133 qui montre un comportement un peu différent par rapport aux autres génotypes (Article 2, Figure 1).

Nous pouvons conclure que les génotypes de tournesol de nos études, soumis à une sécheresse progressive durant la phase de préfloraison (comme souvent observé au champ), présentent une grande variation dans leurs réponses adaptatives à la sécheresse. Le stress hydrique n'a pas causé une répression à long terme de l'appareillage de photosynthèse (ΦP) ; mais il a réduit l'efficacité réelle du transport d'électron de PSII ($\Phi PSII$). Un certain nombre de LIRs ont montré une capacité élevée pour la dissipation d'énergie par l'intermédiaire de l'extinction non-photochimique (NPQ), mais une sur-excitation des centres de réaction des PSIIs (1-qP) a été également observée chez quelques LIRs. Les quatre LIRs et leur parents montrent une association entre (1) l'état hydrique des plantes et l'expression du gène d'aquaporine et (2) la photosynthèse et l'expression de gène du fructose-1,6 biphosphatase principalement après réhydratation. Les niveaux de transcription de l'aquaporine et de la fructose-1,6 biphosphatase sont associés à des QTLs ayant les allèles positifs ou négatifs contrôlant l'état hydrique et la photosynthèse. En revanche, l'expression des gènes de dehydrines et des « cotyledon1- like protéine » n'est pas corrélée directement avec l'état hydrique des plantes,

probablement dû à l'établissement lent de l'état de sécheresse, qui a permis différentes réponses adaptatives chez les génotypes dans notre étude. L'expression différentielle des antioxydants dans des conditions de sécheresse a accentué le rôle différent de ces gènes dans l'acclimatation du tournesol à la sécheresse.

CHAPITRE V : Analyse génétique de la résistance à la sécheresse chez les mutants du tournesol (*Helianthus annuus* L.)

5.1. 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 la variation génétique est bien établie et des mutants induits ont souvent été employés pour l'amélioration de caractères agronomiques.

Les rayons gamma ont été utilisés pour provoquer des mutations chez le riz (Takamure et al. 1993), le maïs (Novak et al., 1988) et le tournesol (Jambhulkar & Joshua, 1999).

Chez le tournesol, des rayons gamma ont été utilisés pour induire une variabilité génétique pour différents caractères tels que des modifications morphologiques (Nabipour et al. 2004), l'organogenèse (Al-Chaarani et al. 2004a), la résistance au *Phoma macdonaldii* (Abou Al Fadil et al. 2004) et la germination (Alejo-James et al. 2004). 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 & Rutger 1988 ; Jan. 1992). Par conséquent, des mutants induits peuvent être employés comme source de variabilité des caractères agronomiques ou physiologiques chez le tournesol.

Les génotypes sélectionnés sur la seule base des caractères phénotypiques peuvent ne pas donner les résultats escomptés 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'utilisation de cette technique nécessite la construction de cartes génétiques. D'ailleurs, l'identification de marqueurs liés aux caractères importants dans un groupe de génotypes par l'étude de l'association entre le marqueur et le caractère par l'analyse de la variance ou de régressions multiples offre un moyen alternatif. 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 'AFLP' associés aux caractères agronomiques dans 55 génotypes de blé ont été également identifiés par Roy et al. (2006).

Les objectifs de la présente étude sont d'évaluer la variabilité génétique des quelques caractères agronomiques et physiologiques chez une population de lignées mutants cultivée en condition contrôlée (serre) et condition naturelle (champ, sous abris) soumise à deux traitements hydriques, et d'identifier les marqueurs moléculaires associés à des caractères étudiés.

Ces résultats ont fait l'objet des deux articles suivants:

1) Poormohammad Kiani S, Maury P, Darvishzadeh R, Nouri L, Sarrafi A, Grieu P (2007) 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 (soumis)

2) Poormohammad Kiani S, Maury P, Darvishzadeh R, Nouri L, Gentzbittel L, Grieu P, Sarrafi A (2007) Genetic variation and identification of molecular markers associated with agronomical traits in gamma-irradiation induced mutants of sunflower under well-watered and water-stressed conditions (*Helianthus annuus* L.). Plant Breeding (manuscrit révisé).

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, P. Maury¹, R. Darvishzadeh², L. Nouri¹, 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 (soumis)

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 (*Oryza 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 vs 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.

Genetic variation and identification of molecular markers associated with agronomical traits in gamma-irradiation induced mutants of sunflower under well-watered and water-stressed conditions (*Helianthus annuus* L.)

S . Poormohammad Kiani^{1,2}, P. Maury¹, R . Darvishzadeh², L . Nouri¹, L . Gentzbittel², P. Grieu¹, A . Sarrafi²

¹UMR 1248 INRA-INPT/ENSAT, Agrosystèmes Cultivés et Herbagers (ARCHE), BP 52627, F-31326 Castanet Tolosan, France

²Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP), IFR 40, INP-ENSAT, 18 Chemin de Borde Rouge, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan, France

Plant Breeding (Revised manuscript)

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

Induced mutation is considered as a supplement to natural variability. The objectives of present study were to evaluate the variability induced by gamma-irradiation among a population of M6 mutant lines and to identify molecular markers associated with different agronomical traits using multiple regression analysis. M6 mutants and their original line were grown in the greenhouse and field under well-watered and water-stressed conditions. In both field and greenhouse, under well-watered and water-stressed conditions, a high genetic variation was observed among mutant lines and some mutant lines showed higher values for agronomical traits when compared with the original line. The results showed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for yield-related traits. Several AFLP markers were associated with different traits and some of them were specific for only one trait. Furthermore, the AFLP markers that consistently associated with agronomical traits under several growth conditions were identified, which could be used in marker-based breeding programmes.

Key words: *Helianthus annuus* L. - gamma irradiation - genetic variation - AFLP - water stress

Introduction

Induced mutation is considered as a supplement to natural variability. The use of ionizing radiation, such as X-rays, gamma rays, neutrons and chemical mutagens for inducing genetic variation is well established and induced mutants have been used to improve agronomic traits in many crops.

Gamma rays has been applied to induce genetic variation for morphological traits in sesame (Cagirgan 2006), for aluminum tolerance in wheat (Tulmann et al. 2001) and for inducing large-seeded mutant lines in the 'Georgia Brown' peanut cultivar (Branch 2002). Induced mutations play an important role in creating genotypes with traits such as enhanced uptake of specific metals, deeper rooting system, tolerance to drought and salinity, and resistance to diseases and pests as a major components of the environmentally sustainable agriculture (Ahloowalia et al. 2004). Morphological mutants in plants occasionally have higher agronomic values for some traits comparing with original genotype; and are used in crossing programmes (Kohet and Bird 2002). Induced mutants may have genes not previously identified at the mutational level, or may have novel alleles of previously described genes (Robles and Micol 2001). 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* (Abou 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. Furthermore, male sterility was also obtained in sunflower through induced mutation (Jan and Rutger 1988, Jan 1992). Therefore induced mutants could be used as a source of agronomical traits variation in sunflower; but to our knowledge no study has been done to evaluate genetic variation among induced mutants for agronomical traits in sunflower.

Plants selected on the basis of phenotypic traits alone may not always give the desired results as the phenotypic traits are highly influenced by environmental conditions. Utilization of molecular markers in selecting genotypes with desirable traits through marker-assisted selection has proved to be very effective in different species.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers have been proposed for marker-assisted selection in sunflower (Hongtrakul et al. 1997, Bert et al. 2004, Rachid Al-Chaarani et al. 2004b). However, the success of marker-assisted selection

largely depends on the extent of genetic linkage between markers and quantitative trait loci (QTL) (Virk et al. 1996). Mapping of QTLs is carried out with materials obtained from systematic breeding such as F2 populations, or recombinant inbred lines (RILs). Moreover, identification of markers associated with important traits in a group of genotypes (marker-trait association) through single-marker analysis of variance or multiple regression analysis offers an alternative mean, and has been adopted 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 recognized by Roy et al (2006). The objectives of present study were to evaluate the genetic variability of agronomical traits among a population of M6 mutant lines grown in greenhouse and field under two water treatments, and to identify molecular markers associated with different agronomical traits using multiple regression analysis.

Materials and Methods

Plant materials: The 'AS613' inbred line was developed in our laboratory from a cross between two genotypes (ENSAT-125 and ENSAT-704) through a single seed descent (SSD) programme. This line was selected for its high organogenesis response (Sarrafı et al. 2000). The 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 plants were produced. The M1 plants were self-pollinated and M2 to M6 generations were advanced by self-pollination through modified SSD method. In each segregating generation one to three plants per one line of each progeny were selected and self-pollinated to produce the next generation. Among a population of about 2000 M6 lines, 39 M6 mutants showing morphological differences compared with original line (AS613), were selected for this study.

Greenhouse experiment: The mutant lines and 'AS613' were grown 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 maintained at 25/18±2 °C (day/night) and relative humidity was about 65-85±5%. Supplementary light was provided to obtain 16h light period during experiment. 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 39 M6 mutant lines). The mutants and original line (AS613) were randomized within each treatment-block combination.

Water treatments in the greenhouse: Both well-watered and water-stressed plants were irrigated similarly to maintain soil water content close to field capacity from sowing to R4 (the stage when inflorescence begins to open, Schnither and miller 1981). Water stress was induced from R4 to harvest. Well-watered plants continued to receive sufficient water to maintain soil water content close to field capacity. Water-stressed plants were irrigated with a water volume of 50% of field capacity.

Field experiment: The mutant lines and the original line (AS613) were grown under a fully automated mobile rainout shelter. The experimental design was the same as explained for greenhouse conditions. Each plot 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 8 plants per plot with two rows as borders on all sides. Plots were extra seeded and the number of seedling per plot was reduced to eight at the two to four leaf stage. On the basis of soil test results, 80 kg N/ha was applied before sowing.

Water treatments in the field: All plants were watered until the immature bud elongates 0.5 to 2.0 cm above the nearest leaf on the stem (stage R2, Schnither and miller 1981). Water stress was imposed by withholding water from water-stressed plots at stage R2 until harvest, whereas well-watered plots were irrigated throughout the experiment.

Traits studied in the greenhouse and field conditions: Days from sowing to flowering (DSF), and from flowering to physiological maturity (DFM), plant height, head diameter (HD), yield per plant and 1000 grain weight (1000GW) were evaluated under both water treatments (well-watered and water-stressed treatments) in the greenhouse and field conditions. Leaf length (L) and width (W) of all green leaves were measured in both well-watered and water-stressed conditions at flowering stage. Then, maximum leaf area at flowering (LA) was calculated with the formula: $LA=0.7L \times W$ (Alza and Fernandez-Martinez 1997).

Genomic DNA extraction and AFLP genotyping: The genomic DNA of 'AS613' and M6 mutants were isolated from two-week old seedlings according to the method of extraction and purification presented by Fulton et al (1995). 17 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).

Statistical analysis: All studied traits data were analyzed using the SAS PROC GLM (SAS system). A mixed model with water treatment as fixed effect, and genotypes (mutants and AS613) as random effect, was used for evaluation of experimental data. Correlations between traits in each of the water treatments under greenhouse and field conditions were determined using SAS PROC CORR. The association between AFLP markers and the quantitative traits was estimated through stepwise multiple regression analysis, where each quantitative trait was considered as an dependent variable while the AFLP marker was treated as an independent variable (Virk et al. 1996, Vijayan et al. 2006). To select independent variables for the regression equation, *F*-values with 0.045 and 0.099 probability were used to enter and remove, respectively.

Results

Analysis of variance of the mutant lines and their original line (AS613) showed a highly significant mutant effect (M) for all the traits studied in both greenhouse and field conditions (Table 2). Water stress effect (W) was significant for days from flowering to physiological maturity (DFM), yield per plant and 1000 grain weight (1000GW) in both greenhouse and field conditions; whereas it was significant for plant height and maximum leaf area at flowering (LA) in field condition. ‘Mutant × water treatment’ interaction (I) was significant for DFM and plant height under greenhouse condition.

Regarding the range of mutant lines, a large variation for all studied traits was observed and some mutants presented higher values compared with the original line (Table 2).

Correlations between yield per plant with other yield-related traits in four possible combinations of growth conditions (greenhouse and field, under well-watered and water-stressed conditions) are presented in Table 3. Yield/plant is positively correlated with DFM, maximum leaf area (LA), head diameter (HD) and 1000 grain weight (1000GW) in both water treatments under greenhouse conditions. Similarly 1000GW is positively correlated with HD and DFM in all combinations of growth conditions. Yield/plant was positively correlated with LA and HD in both water treatments as well as with 1000GW in only water-stressed condition in the field (Table 3).

The number of polymorphic markers varied from eight to 27 for different primer combinations (Table 1). The results of marker identification for different traits under four possible combinations of growth conditions (greenhouse and field, under well-watered and water-stressed conditions) are summarized in Tables 4 and 5. Results showed that the number of markers associated with different traits ranged from two to eight depending on the trait and growth condition (greenhouse and field) as well as on the water treatment (well-watered and water-stressed). The phenotypic variance explained by each marker associated with the traits (R^2) ranged from 3.3% to 19.8%. Among the markers, some of them were identified for one or several traits in different conditions (Table 4, 5). As examples, the marker 'E33M47_6' was identified for days from flowering to physiological maturity (DFM) in all four possible growth conditions (field and greenhouse conditions with well-watered and water-stressed treatments). It was also associated with yield in both greenhouse and field under water-stressed conditions, and also with yield under well-watered conditions in greenhouse. Beside common markers for several traits, individual markers specific to each trait were also identified. For example, 'E33M49_8', 'E33M50_11' and 'E33M47_10' were associated respectively with LA, plant height and HD under water-stressed condition in greenhouse (Table 4). Similarly the markers 'E37M62_7' and 'E37M50_13' were associated with LA and DSF under well-watered conditions in the field (Table 5).

Discussion

The large genetic variation observed among mutant lines for the studied traits showed the efficiency of gamma-irradiation for inducing genetic variation in sunflower for yield-related traits (Table 2). The range of variation observed for agronomical traits confirmed the efficiency of gamma irradiation to produce mutant lines with higher performance than their original line (Table 2). Some mutants have advantages over 'AS613' for different traits in both water treatments. These mutant lines could be used in breeding programmes for water stress tolerance. Furthermore the mutants with contrasting responses to drought could be used as parental lines for constructing genetic maps used in genetic studies for drought tolerance.

Gamma-irradiation has been used for inducing resistant mutants to disease in wheat, sesame, rice and chickpea (Skorda 1977, Pathirana 1992, Zhang et al. 2003, Han et al. 2004, Ahloowalia et al. 2004) respectively. In sunflower, gamma-irradiation has

been used for inducing resistance to *Phoma macdonaldii* (Abou Al-Fadil et al. 2004). As far as we know, no study has been reported in literature to evaluate the genetic variation of sunflower mutant lines for agronomical traits under well-watered and water-stressed conditions.

In greenhouse conditions, yield is positively correlated with all traits except with days from sowing to flowering (DSF) in both well-watered and water-stressed conditions (Table 3). The data of field experiment showed the positive effect of LA, HD and 1000GW on yield, the latter being positively correlated with yield only under water-stressed conditions (Table 3). Razi and Assad (1999) reported that HD is the best criterion for increasing seed yield under well-watered and water-stressed conditions in sunflower, which is in agreement with our results. Among all traits, LA and HD are correlated with yield in field and greenhouse under both water treatments (Table 3). Simililar to our results, Alza and Fernandez-Martinez (1997) and Rachid Al-Chaarani et al (2004b) reported that, 1000 grain weight and head diameter (HD) are positively correlated with yield in sunflower.

The results of marker identification show that some AFLP markers are associated with several traits and some others are specific for only one trait or a given water treatment (Table 4, 5). The phenotypic variance explained by each marker associated with the traits (R^2) ranged from 3.3% to 19.8%, which is in agreement with QTLs effects identified for agronomic traits (Rachid-Al-Chaarani et al. 2004b, Bert et al. 2003). Multiple regression analysis has been successfully used to identify molecular markers associated with morphological and yield traits in many crops. Virk et al (1996) analysed the association between phenotypic characters of rice and specific RAPD markers. For example, for leaf length in rice, they identified 16 markers out of a total of 63 markers generated. Vijayan et al (2006) identified ISSR markers associated with yield traits in mulberry. In sunflower, several QTLs controlling different agronomical traits such as days from sowing to flowering, plant height, stem diameter, head diameter, yield and 1000 grain weight have been identified using AFLP/SSR map (Al-Chaarani et al. 2004b). To our knowledge, the association concerning AFLP markers and agronomical traits in sunflower mutants in water-stressed conditions has not been reported in literature.

In the greenhouse conditions, six and five markers were identified for yield per plant under well-watered and water-stressed conditions respectively (Table 4), whereas in the field conditions, five and seven markers were identified for yield under the same water treatments respectively (Table 5). Among 23 markers for yield under four possible growth conditions, 12 were identified in more than one environment. The markers 'E33M47_6' and 'E33M50_16' were associated with yield in three conditions out of four (Tables 4, 5). Similarly 'E33M49_1', 'E33M50_1', 'E38M62_8' and 'E31M50_12' were identified under two out of four conditions. The most important markers for yield could be 'E33M47_6' and 'E33M50_16'. The former (E33M47_6) was also associated with DFM, HD and LA in different conditions and the latter was detected for plant height and LA in different conditions. These examples of markers identified for several traits showed the genetic of trait association and confirm correlation among agronomical traits and yield. However out of 23 markers identified for yield under four conditions, five of them ('E31M48_5', 'E33M49_11', 'E37M50_15', 'E37M62_5' and 'E40M59_5') were specifically associated with yield.

Progress in increasing yield and stability under water-limited conditions through a direct selection has been hampered by the low heritability of yield, particularly under drought (Blum 1988, Ceccarelli and Grando 1996). As an alternative to a direct selection for yield under drought conditions, agro-physiological traits correlated with yield have been targeted in selection programmes (Blum 1988, Chimenti et al. 2002). Identification of AFLP markers associated with yield and its correlated traits would help to select genotypes with higher values of agronomical traits for increasing yield. If a marker is always associated with an agronomical trait, which is correlated with yield under any environment, it could be used in marker-based breeding programmes. Therefore 'E33M47_6' and 'E33M50_16' markers, which are detected for yield and several related traits; and stable across different conditions, could be used in selection programmes.

References

About Al Fadil , T., G. Dechamp-Guillaume, S. Poormohammad Kiani, and A. Sarrafi, 2004: Genetic variability and heritability for resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) J. Genet. Breed. **58**, 323-328.

- Ahloowalia, B.S., M. Maluszynski, and K. Nichterlein, 2004: Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* **135**, 187-204.
- Al-Charrani, G., L. Gentsbittel, G. Barrault, S. Lenoble, and A. Sarrafi, 2004a: The effect of gamma rays and genotypes on sunflower organogenesis traits. *J.Genet. Breed.* **58**, 73.
- Al-Chaarani, G., L. Gentsbittel, X. Huang, and A. Sarrafi, 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., M.F. Jardinaud, P. Maury, J. Aliber, L. Gentsbittel, A. Sarrafi, P. Grieu, and M. Petitprez, 2004: Genetic variation for germination and physiological traits in sunflower mutants induced by gamma rays. *J.Genet. Breed.* **58**, 285-294.
- 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.
- 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.
- Bert, P. F., G. Dechamp-Guillaume, F. Serre, I. Jouan, D.Tourvielle de Labrouhe, P. Nicolas and F. Vear, 2004: Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 865-874.
- Blum, A., 1988: *Plant Breeding For Stress Environment*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Branch, Z.D., 2002: Variability among advanced gamma-irradiation induced large-seeded mutant breeding lines in the 'Georgia Brown' peanut cultivar. *Plant Breed.* **121**, 275-277.
- Cagirgan, M.I., 2006: Selection and morphological characterization of induced determinate mutants in semase, *Field Crops Res.* **96**, 19-24

- Ceccarelli, S., and S. Grando 1996: Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regulation* **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.
- Fulton, T.M., J. Chunwongse, and S.D. Tanksley, 1995: Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Report.* **13**, 207–209.
- Han, C. U., C. H. Lee, K. S. Jang, G. J. Choi, H. K. Lim, J. C. Kim, S. N. Ahn, J. E. Choi, J. S. Cha, H. T. Kim, K. Y. Cho, and S. W. Lee, 2004: Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Molecules and Cells* **17**, 462-468
- Hongtrakul, V., G. M. Huestis, and S. J. Knapp, 1997: Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: Genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 400–407
- 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 J.N. Rutger, 1988: Mitomycin C-and streptomycin-induced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci.* **28**, 792–795.
- Kohet, R. J., and L. S. Bird, 2002: Inheritance and linkage analysis of the yellow Pulvinus mutant of cotton. *J. Cotton Sci.* **6**, 115-118.
- Nabipour, A., B. Yazdi-Samadi, and A. Sarrafi, 2004: Genetic control of some morphological mutants in sunflower. *J. Genet. Breed.* **58**, 157-162.
- Pathirana, R., 1992: Gamma ray-induced field tolerance to *Phytophthora* blight in sesame. *Plant Breeding* **108**, 314-319
- Razi, H., and M. T. Assad, 1999: Comparison of selection criteria in normal and limited irrigation in sunflower. *Euphytica* **105**, 83-90.
- Robles. P., and J.L. Micol, 2001: Isolation and characterization of fast-neutron induced mutants with abnormal leaf morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Dev. Biol.* **45**, 59-60.
- Roy, J.K., R. Bandopadhyay, S. Rustgi, H.S Balyan, and P.K. Gupta, 2006: Association analysis of ergonomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr. Sci.* **90**, 683-689.

- Sarrafi, A., H. Kayyal, G. Rachid Al-Chaarani, F. Cantin, A.S. Chaline and A.S. Durielle, 2000 : Inheritance of organogenesis parameters in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. Breed* **54**, 227-231.
- Schneiter, A.A., and J.F. Miller, 1981: Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* **21**, 901-903.
- Skorda, EA., 1977: Stem and stripe rust resistance in wheat induced by gamma rays and thermal neutrons. In: *Induced mutation against plant disease*, pp. 385-392. IAEA, Vienna.
- Tulmann. Neto. A., C.E. de Oliveira Camargo, J. Lopes de Castro, and A.W.P. Ferreira Filho, 2001: Evaluation of 'Anahuac' wheat lines for aluminum tolerance. *Euphytica* **120**, 339-343.
- Vijayan. K., P. P. Srivatsava, C.V. Nair, A.K. Awasthi, A. Tikader, B. Sreenivasa, and S.R. Urs, 2006: Molecular characterization and identification of markers associated with yield traits in mulberry using ISSR markers. *Plant Breed.* **125**, 298-301.
- Virk, P.S., B.V. Ford-Lloyd, M.T. Jackson, H.S. Pooni, T.P. Clemeno, and H.J. Newbury, 1996: Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* **76**, 296-304.
- Zhang, M.X., J. L. Xu, R. T. Luo, D. Shi, and Z. K. Li, 2003: Genetic analysis and breeding use of blast resistance in a japonica rice mutant R917. *Euphytica* **130**, 71-76.

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

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: Characteristics of sunflower M6 mutants and original line (AS613) in greenhouse and field under well-watered and water-stressed conditions.

Condition	Trait	Well-watered				Water-stressed				Effects ^a
		AS613	Mutants			AS613	Mutants			
			Mean	Max	Min		Mean	Max	Min	
Greenhouse	DSF	57.0	56.6	60.3	51.6	60.6	57.2	62.0	52.0	W ^N , M ^{***} , I ^N
	DFM	75.6	62.1	83.7	31.7	72.0	57.9	77.3	33.0	W ^{***} , M ^{***} , I [*]
	LA (cm ²)	2863	2653	3819	1228	2727	2591	3572	1168	W ^N , M ^{***} , I ^N
	Height (cm)	155.6	145.7	172.0	95.6	153.7	145.7	165.7	97.3	W ^N , M ^{***} , I [*]
	HD (cm)	10.1	9.2	11.3	3.7	9.6	8.8	11.0	3.0	W ^N , M ^N , I ^N
	Yield per plant (g)	13.1	12.1	20.6	4.5	10.7	8.5	16.6	2.5	W ^{**} , M ^{***} , I ^N
	1000GW (g)	38.4	39.9	55.6	21.2	34.6	25.4	45.5	18.4	W [*] , M ^{***} , I ^N
Field	DSF	71.3	73.5	80.3	70.3	70.3	72.3	78.0	69.0	W ^N , M ^{***} , I ^N
	DFM	69.0	67.0	72.7	56.7	56.7	54.5	58.3	49.0	W ^{***} , M ^{***} , I ^N
	LA (cm ²)	2845	2276	3834	992.3	2770	1941	3204	819.6	W [*] , M ^{***} , I ^N
	Height (cm)	124.3	113.0	126.7	93.0	119.0	105.4	121.3	84.0	W [*] , M ^{***} , I ^N
	HD (cm)	13.5	12.0	14.2	8.2	12.8	12.7	15.0	9.5	W ^N , M ^{***} , I ^N
	Yield per plant (g)	26.3	25.8	41.1	9.0	21.5	17.9	32.5	5.0	W ^{**} , M ^{***} , I ^N
	1000GW (g)	48.0	51.2	69.4	26.5	23.0	45.4	56.8	43.2	W ^{**} , M ^{***} , I ^N

AS613, original line.

DSF, days from sowing to flowering.

DFM, days from flowering to physiological maturity.

LA, maximum leaf area at flowering (cm²).

HD, head diameter (cm).

1000GW, 1000 grain weight (g).

^a W, M and I: water treatment, mutants and water treatment × mutant interaction effects.

*, **, *** and NS: significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels and non significant.

Table 3: Simple correlation coefficients between different agronomical traits for sunflower M6 mutant lines in well-watered and water-stressed conditions grown in greenhouse and field.

		Greenhouse conditions					Field conditions						
		DSF	DFM	LA	Height	HD	Yield/plant	DSF	DFM	LA	Height	HD	Yield/plant
Well-watered	DFM	-0.10NS						-0.53***					
	LA (cm ²)	0.01NS	0.09NS					-0.08NS	0.12NS				
	Height (cm)	0.25**	0.60***	0.17*				-0.10NS	0.13NS	0.30***			
	HD (cm)	-0.04NS	0.60***	0.48***	0.54***			-0.22*	0.09NS	0.09NS	0.27**		
	Yield/plant (g)	-0.14NS	0.19*	0.52***	0.17*	0.45***		-0.06NS	0.07NS	0.25**	0.00NS	0.20*	
	1000GW (g)	-0.09NS	0.20*	0.08NS	0.19*	0.30***	0.23*	-0.38***	0.20*	0.04NS	0.04NS	0.19*	0.11NS
Water-stressed	DFM	-0.08NS						-0.85***					
	LA (cm ²)	0.02NS	0.16NS					-0.02NS	-0.03NS				
	Height (cm)	0.20*	0.56***	0.33***				0.23*	0.13NS	0.43***			
	HD (cm)	0.20*	0.58***	0.38***	0.65***			-0.11NS	0.09NS	-0.03NS	0.06NS		
	Yield/plant (g)	-0.01NS	0.28***	0.34***	0.32***	0.41***		-0.12NS	0.15NS	0.20*	0.16NS	0.21*	
	1000GW (g)	-0.14NS	0.31***	0.11NS	0.39***	0.34***	0.32***	-0.40***	0.32***	0.06NS	0.02NS	0.38***	0.20*

DSF, days from sowing to flowering.

DFM, days from flowering to physiological maturity.

LA, maximum leaf area at flowering (cm²).

Height, plant height (cm).

HD, head diameter (cm).

Yield/plant, yield per plant (g).

1000GW, 1000 grain weight (g).

*, **, *** and NS: significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels and non significant.

Table 4: Markers associated with agronomical traits for sunflower M6 mutant lines under well-watered and water-stressed conditions grown in greenhouse.

Traits	Well-watered			Water-stressed		
	Markers ^a	R ²	P-value	Markers	R ²	P-value
DSF	E33M61_3	0.093	0.0007	E33M50_17	0.125	<0.0001
	E33M59_6	0.076	0.0014	E33M50_7	0.080	0.0008
	E33M47_2	0.070	0.0006			
	E37M50_13	0.071	0.0007			
DFM	E33M59_4	0.220	<0.0001	E33M59_4	0.171	<0.0001
	E33M62_1	0.194	<0.0001	E33M47_6	0.105	<0.0001
	E37M62_1	0.090	<0.0001	E33M62_8	0.109	<0.0001
	E31M50_4	0.061	<0.0001	E37M50_9	0.146	<0.0001
	E33M47_1	0.052	0.0001	E33M50_8	0.061	<0.0001
	E31M50_8	0.035	0.0010	E37M50_20	0.049	0.0001
	E33M49_4	0.035	0.0005			
	E33M47_6	0.037	0.0002			
LA	E33M49_13	0.0933	0.0007	E31M47_3	0.1021	0.0004
	E31M50_12	0.0818	0.0009	E37M48_2	0.0867	0.0006
	E40M50_7	0.0666	0.0018	E33M49_8	0.0608	0.0027
	E33M48_5	0.0855	<.0001	E33M47_3	0.0539	0.0035
	E38M62_7	0.0673	0.0002	E33M48_5	0.0471	0.0048
				E33M50_16	0.0402	0.0070
				E33M47_6	0.0401	0.0058
Height	E33M60_10	0.1256	<.0001	E33M60_3	0.1254	<.0001
	E33M59_4	0.1164	<.0001	E33M49_13	0.0995	0.0002
	E37M62_1	0.1111	<.0001	E31M50_8	0.1058	<.0001
	E33M50_16	0.0786	0.0001	E33M60_10	0.0855	<.0001
	E33M49_1	0.0673	0.0002	E33M50_11	0.0576	0.0006
	E33M47_2	0.0441	0.0013	E38M62_5	0.0472	0.0012
	E33M49_13	0.0453	0.0006	E33M59_15	0.0316	0.0058
HD	E31M50_8	0.163	<.0001	E31M50_8	0.178	<.0001
	E37M62_9	0.126	<.0001	E37M50_26	0.132	<.0001
	E33M62_1	0.080	0.0020	E33M47_10	0.070	0.0004
	E37M50_26	0.079	<.0001	E33M60_11	0.078	<.0001
	E33M60_11	0.049	0.0012			
	E31M48_6	0.047	0.0009			
	E33M60_9	0.039	0.0017			
Yield/plant	E33M50_16	0.135	<.0001	E33M50_16	0.197	<.0001
	E37M50_11	0.090	0.0004	E33M47_6	0.096	0.0001
	E37M50_15	0.072	0.0008	E33M50_1	0.069	0.0005
	E33M49_1	0.060	0.0014	E40M59_5	0.044	0.0040
	E33M47_1	0.065	0.0005	E37M62_5	0.054	0.0010
	E37M50_4	0.073	<.0001			
1000GW	E37M50_10	0.084	0.0013	E37M50_4	0.104	0.0001
	E33M60_4	0.058	0.0058	E33M47_6	0.072	0.0018
	E40M50_5	0.078	0.0090	E33M59_5	0.067	0.0016
	E40M50_8	0.052	0.0050	E31M50_8	0.066	0.0012
				E33M61_6	0.053	0.0025
				E33M49_15	0.044	0.0047
				E33M59_12	0.041	0.0044

^a, markers common across water treatments are presented as *bold-face*

Table 5: Markers associated with agronomical traits for sunflower M6 mutant lines under well-watered and water-stressed conditions grown in field.

Traits	Well-watered			Water-stressed		
	Markers ^a	R ²	P-value	Markers	R ²	P-value
DSF	E33M61_7	0.1759	<.0001	E31M50_6	0.1324	0.0003
	E31M50_6	0.1207	0.0001	E33M60_5	0.1064	0.0005
	E33M59_6	0.0970	0.0002	E31M50_8	0.0582	0.0070
	E33M60_7	0.0949	<.0001	E33M59_6	0.0545	0.0069
	E33M60_4	0.0881	<.0001	E37M48_2	0.0659	0.0020
	E33M59_14	0.0499	0.0009			
	E37M50_14	0.0351	0.0033			
	E37M62_4	0.0350	0.0021			
DFM	E33M47_6	0.1111	0.0009	E33M60_5	0.1080	0.0011
	E37M62_1	0.0916	0.0018	E40M50_3	0.0801	0.0032
				E33M47_6	0.0767	0.0026
				E31M50_6	0.0633	0.0040
LA	E33M48_6	0.1984	<.0001	E33M50_16	0.1023	0.0015
	E38M62_8	0.0695	0.0038	E38M62_4	0.0799	0.0033
	E37M62_7	0.0565	0.0067	E38M62_8	0.0657	0.0059
	E33M48_5	0.0633	0.0042	E33M48_5	0.0633	0.0040
Height	E33M60_3	0.1262	0.0004	E33M59_15	0.0924	0.0026
	E33M50_1	0.0753	0.0040	E33M50_16	0.0628	0.0100
				E33M60_3	0.0633	0.0040
HD	E37M62_9	0.1264	0.0004	E31M50_8	0.1337	0.0002
	E33M47_6	0.0944	0.0011	E37M62_9	0.0963	0.0010
	E37M50_24	0.0738	0.0025	E37M50_10	0.0995	0.0004
	E33M59_4	0.0574	0.0056	E38M62_8	0.0644	0.0065
	E40M50_7	0.0598	0.0032			
	E31M48_6	0.0439	0.0088			
Yield/plant	E31M50_12	0.1157	0.0007	E38M62_8	0.1353	0.0002
	E38M62_8	0.0928	0.0014	E33M50_1	0.0744	0.0039
	E37M62_1	0.1064	0.0003	E31M50_12	0.0862	0.0012
	E33M47_6	0.0604	0.0038	E33M50_16	0.0725	0.0017
	E33M49_1	0.0477	0.0077	E33M47_6	0.0475	0.0082
				E33M49_15	0.0439	0.0086
1000GW	E40M50_3	0.1797	<.0001	E40M50_3	0.1009	0.0016
	E38M62_8	0.0879	0.0018	E31M50_6	0.0805	0.0032
				E33M49_1	0.0854	0.0015
				E33M50_1	0.0540	0.0085
				E31M50_8	0.0432	0.0176

^a, markers common across water treatments are presented as *bold-face*

5.2. Synthèse des résultats et conclusion

5.2.1. Variabilité génétique des caractères physiologiques et agronomiques

L'analyse de variance effectuée chez 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 par un génotype donné par rapport à d'autres génotypes change entre les traitements hydriques. Le stress hydrique a également causé l'accumulation d'osmolytes (ajustement osmotique) dans les cellules des lignées mutantes (Article 1, Tableau 2).

On a observé une variation génétique significative entre les mutants pour tous les caractères de l'état hydrique étudié. Le teneur en eau relative (RWC) varie de 82.1 à 92.8% en condition 'irriguée' et de 61.8 à 82.5% en condition 'contrainte hydrique'. Le potentiel osmotique à pleine turgescence (Ψ_{sFT}) varie de -1.04 à -0.74 MPa chez les mutants 'irrigués' tandis qu'il varie de -1.49 à -0.92 MPa en condition 'contrainte hydrique'. La variabilité d'ajustement osmotique s'étend de 0.00 à 0.61 Mpa (Article 1, Tableau 3).

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 associées, donc pour la tolérance à la sécheresse. Parmi les mutants étudiés, certains ont des avantages par rapport au 'AS613'. Par exemple, trois mutants (M6-286-1, M6-575-1 et M6-862-1NI) ont montré une capacité plus élevée de l'ajustement osmotique en comparaison avec le '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. Puisque 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 (Chimenti et al. 2002). Nous pouvons noter que la lignée `M6-286-1' pourrait être le meilleur mutant pour la tolérance à la sécheresse (Article 1, Tableau 3).

L'effet du stress hydrique était également significatif pour le nombre de jours de la floraison à la maturité physiologique (DFM), du rendement par plante et du poids de 1000 grain (1000GW) en conditions de serre et de champ. Il était significatif pour la hauteur de la plante et la surface foliaire à la floraison (LA) au champ (Article 2, Tableau 2).

Concernant l'ensemble des mutants, on a observé une grande variation pour tous les caractères agronomiques étudiés ; et quelques mutants ont présenté des valeurs plus élevées comparées à la lignée originelle (AS613). (Article 2, Tableau 2).

5.2.2. Identification de marqueurs individuels associés aux caractères étudiés

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 conditions (serre et champ) ainsi que 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 donné. Par exemple, les marqueurs `E37M50_10` et `E33M49_6` ont été identifiés pour la teneur en eau relative (RWC) dans les deux traitements hydriques. Parmi sept marqueurs détectés pour l'ajustement osmotique, cinq (`E38M62_2`, `E38M62_3`, `E38M62_4`, `E33M47_7` et `E33M47_12`) sont communs au potentiel osmotique à plein turgescence (Ψ_{sFT}) (Article 1, Tableau 4).

En ce qui concerne les caractères agronomiques les marqueurs `E33M47_6` et `E33M50_16` ont été associés au rendement par plante dans trois conditions sur quatre. Le marqueur `E33M47_6` est également associé à DFM, à HD et à LA dans différentes conditions et le `E33M50_16` est détecté pour la hauteur de la plante et la LA dans différentes conditions. Ces exemples de marqueurs qui sont en commun pour plusieurs caractères confirment la corrélation entre ces caractères agronomiques(Article 2, Tableau 4 et 5).

L'identification des marqueurs AFLP liés au rendement et aux caractères associés au

rendement aiderait à choisir des génotypes avec des valeurs plus élevées pour le rendement et ses composantes par sélection assistée par marqueur (SAM). Si un marqueur est toujours associé à un caractère agronomique sous n'importe quel environnement, il pourrait être employé dans des programmes de sélection basée sur marqueur. Par conséquent, les marqueurs 'E33M50_16' et 'E33M47_6', qui sont détectés pour la productivité et plusieurs autres caractères reliés à la productivité; qui sont stables dans différentes conditions, peuvent être employés dans des programmes de sélection.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1. Développement de la carte génétique

En utilisant une population de lignées recombinantes issues du croisement entre ‘PAC-2’ et ‘RHA-266’, une carte génétique du tournesol a été construite dans notre laboratoire par Flores Berrios et al. (2000b). Par la suite, cette carte génétique a été complétée avec d’autres marqueurs (Rachid Al-Chaarani et al. 2004). Nous avons amélioré cette carte et établi une nouvelle carte génétique basée sur 191 SSRs et 304 AFLPs. Pour cela, nous avons analysé 1173 marqueurs SSR développés par différents laboratoires aux Etats Unis (ORS), en France (SSU et SSL) et en Argentine (HA). Cette nouvelle carte a une longueur de 1824.7 cM et une densité d’un marqueur pour 3.7 cM. Les groupes de liaisons ont été nommés en comparant les positions des SSRs communs entre notre carte et la carte génétique référence du tournesol construite par Tang et al. (2002). Les marqueurs, distribués sur tous les groupes de liaisons, permettent un référencement croisé complet avec d’autres cartes construites à partir de marqueurs SSR/INDELs et SSR/SNP (Yu et al. 2003 ; Lai et al. 2005). L’incorporation de 157 nouveaux SSR dans notre carte a permis d’augmenter la précision de détection de QTLs pour les différents caractères analysés dans la présente étude. Par ailleurs, cette nouvelle carte a l’avantage de présenter un nombre de groupes de liaisons (17) égal au nombre de chromosomes (17) du tournesol, ce qui n’était pas le cas pour la carte initiale de notre laboratoire. Cette nouvelle carte génétique fournit un outil génétique de base important pour l’analyse des caractères quantitatifs et qualitatifs chez *Helianthus annuus*, en particulier puisqu’elle permet de comparer les positions de QTLs identifiés chez le tournesol par différentes équipes de recherche (Annexe 1).

6.2. Variabilité génétique des caractères de tolérance à la sécheresse

L’analyse de l’effet du déficit hydrique sur l’état hydrique des plantes montre qu’il existe une grande variabilité génotypique concernant la capacité des plantes à maintenir leurs états hydriques chez les lignées recombinantes. Cependant, la réponse au stress hydrique est largement affecté par l’interaction significative ‘traitement hydrique × génotype’, suggérant que la réponse au stress hydrique diffère selon les génotypes.

Le potentiel hydrique (Ψ_w), le potentiel osmotique (Ψ_s), le potentiel de turgescence (Ψ_t) et la teneur en eau relative (RWC) diminuent chez les RILs en réponse à la contrainte hydrique.

Cependant, certaines LIRs ont une aptitude plus élevée à maintenir leur état hydrique (teneur en eau) lors du stress hydrique et présentent des capacités d'AO largement différentes.

Nos résultats confirment l'aptitude du tournesol à l'ajustement osmotique avec des valeurs moyennes de 0.20 MPa en serre et 0.10 MPa au champ, comparativement aux autres espèces comme le sorgho (0.46-0.63 MPa) (Fekade et al. 1992) et le maïs (0.08-0.043MPa) (Premachandra et al. 1992). De nombreuses études ont montré l'aptitude du tournesol à l'ajustement osmotique au cours de la chute du potentiel hydrique foliaire (Jones & Turner 1980, Maury et al. 1996, Chimenti et al. 2002). Jones et al. (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 l'AO chez cette espèce. La corrélation significative entre l'ajustement osmotique (AO) et le potentiel de turgescence (Ψ_t) dans notre étude montre que l'aptitude des géotypes à maintenir la turgescence est liée à leur capacité d'ajustement osmotique. L'AO est considéré comme un mécanisme adaptatif important pour maintenir l'activité photosynthétique pendant la déshydratation (Conroy et al. 1988), par son rôle positif dans le maintien de la turgescence (Turner & Jones 1980; Maury et al. 2000; Ober et al. 2005). 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.

L'analyse de l'effet du stress hydrique sur la photosynthèse et les paramètres associés montre qu'il existe une variabilité génotypique au niveau de la capacité des géotypes à maintenir une assimilation nette de CO_2 sous contrainte hydrique. Les analyses de variance ont montré également un effet fortement significatif du géotype pour la conductance stomatique (g_s), la transpiration (Tr) et la concentration interne en CO_2 au niveau foliaire (c_i).

La corrélation entre la photosynthèse nette (P_n) et la conductance stomatique (g_s) est fortement significative suggérant que la fermeture stomatique peut être associée à la diminution de l'activité photosynthétique chez le tournesol lors d'un déficit hydrique. La diminution de conductance stomatique conduit à diminuer la photosynthèse (P_n) et la concentration interne en CO_2 (c_i) (Cornic 2000). La réponse stomatique à la déshydratation foliaire apparaît dépendante du géotype, mais est également influencée un pré-conditionnement à la sécheresse (Maury et al. 2000). Les résultats confirment bien le rôle de l'ajustement osmotique dans le maintien de l'ouverture stomatique et donc, dans la capacité

de la plante à conserver une activité photosynthétique sous contrainte hydrique.

Une forte ségrégation transgressive a été observée pour les paramètres d'état hydrique des LIRs. La ségrégation transgressive serait le résultat de l'accumulation d'allèles positifs venant des deux lignées parentales. Ce phénomène pourrait être dû à la nature polygénique des caractères physiologique et agronomiques.

Une condition majeure pour la réussite d'un programme de sélection tient à l'étude et à la prise en compte de la variabilité génétique des caractères d'adaptation. En effet, au démarrage d'un programme, un bilan précis du matériel génétique doit être réalisé de manière à fournir aux autres disciplines (physiologie ou biologie moléculaire par exemple) le matériel végétal et à montrer la variabilité permettant de comprendre les stratégies d'adaptation mises en œuvre par les plantes. La population des lignées recombinantes présente une grande variabilité génétique qui nous a permis de réaliser nos travaux pluridisciplinaires.

6.3. Analyse des QTLs de tolérance du tournesol à la sécheresse et co-localisation avec les caractères agronomiques

Une forte variabilité génétique observée pour les caractères physiologiques impliqués dans l'adaptation au stress hydrique nous a conduit à identifier les régions génomiques impliquées dans cette variabilité génétique, ce qui n'avait pas été fait auparavant à notre connaissance chez le tournesol. En effet, l'amélioration de la tolérance à la sécheresse nécessite l'identification et le transfert des caractères physiologiques responsables de la tolérance à la sécheresse aux cultivars productifs. Face aux difficultés d'utilisation de « critères physiologiques de prédiction de la valeur d'un génotype » en sélection, le développement des outils de marquage moléculaire est susceptible d'apporter d'importants éléments de réponse ; l'idée de base étant de rechercher des relations entre la présence de marqueurs et les mécanismes physiologiques liés à la tolérance. Les outils moléculaires facilitent l'identification des zones génomiques (QTLs) contrôlant les caractères liés à la tolérance à la sécheresse en utilisant la cartographie QTL (quantitative trait loci).

Nous avons identifié des QTLs associés aux caractères d'état hydrique des plantes et à l'ajustement osmotique. Pour l'ensemble des paramètres étudiés le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par chaque QTL se situe entre 6% et 29%. La majorité des QTLs

identifiés pour les caractères étudiés sont spécifiques aux conditions de traitements hydriques, mais un nombre limité de QTLs sont communs aux deux conditions de traitements hydriques. Les QTLs communs aux différentes conditions (QTLs constitutifs) contrôlent l'expression d'un caractère (agronomique ou physiologique) sans être influencés par le traitement hydrique, à l'opposé des QTLs adaptatifs qui interviennent sur les caractères dans un traitement hydrique donné. Par exemple, un QTL pour Ψ_t (groupe de liaison 4) et deux pour Ψ_{sFT} (groupes de liaisons 1 et 16) et RWC (groupes de liaisons 5 et 17) sont communs aux deux traitements hydriques (bien irrigué et non irrigué). La variance phénotypique (R^2) expliquée par un QTL commun s'avère cependant différente selon les traitements hydriques. L'existence de QTLs spécifiques, et d'effets différentiels des QTLs dans les deux traitements hydriques peuvent expliquer les interactions 'génotype x traitement hydrique' significatives (Beavis & Kim 1996).

Un intérêt majeur de l'identification des QTLs est d'analyser les associations entre les différents caractères notamment en conditions de stress hydrique (Tuberosa et al. 2002). Nous pouvons noter des co-localisations de QTLs contrôlant des caractères d'état hydrique des plantes (comme l'ajustement osmotique) et des caractères agronomiques. Cette co-localisation des QTLs indique l'existence d'une certaine base génétique commune pour les caractères physiologiques et agronomiques de réponse au déficit hydrique. Un tel résultat pourrait s'expliquer par des effets pléiotropiques des gènes (QTLs) ou par des locus étroitement liés.

La région chromosomique la plus importante pour l'ajustement osmotique est située sur le groupe de liaison 5 où un QTL pour l'AO (*OA.5.2*) est co-localisé avec d'autres QTLs d'état hydrique. Ce QTL majeur, liée à un marqueur SSR (*ORS523-1*), semble être très important dans la tolérance au stress hydrique, car il est également impliqué dans le contrôle de différents paramètres d'état hydrique de la plante (Ψ_{sFT} , de Ψ_w et de RWC) sous contrainte hydrique. Ce QTL explique 29% de la variance phénotypique pour l'AO et également 10%, 8% et 18% de la variance phénotypique pour Ψ_w , RWC et Ψ_{sFT} sous contrainte hydrique, respectivement. Ce QTL adaptatif est également impliqué dans l'expression de certains caractères agronomiques.

Les QTLs ont été identifiés pour plusieurs composantes de la tolérance à la sécheresse dans notre étude. Les effets de ces caractères sur la productivité des plantes soumises à la sécheresse ont été établis grâce à la co-localisation des QTLs. En comparant la coïncidence de

QTLs pour des caractères spécifiques de la tolérance à la sécheresse et des QTLs pour la productivité des plantes sous contrainte hydrique, il est possible d'examiner l'importance d'une réponse constitutive ou adaptative particulière à la sécheresse pour l'amélioration du rendement (Lebreton et al. 1995). Selon plusieurs chercheurs, la co-localisation des QTLs de tolérance à la sécheresse et de la productivité, aide à mieux comprendre la base génétique de la tolérance à la sécheresse, et éventuellement à développer plus rapidement des cultivars tolérants à la sécheresse (Gomez et al. 2006 ; Lanceras et al. 2004). En plus, l'identification de QTLs influençant plusieurs caractères simultanément pourrait augmenter l'efficacité de la sélection assistée par marqueurs (SAM) et ainsi augmenter le progrès génétique (Upadyayula et al. 2006). Pour répondre à cet objectif nous avons comparé les positions des QTLs de tolérance à la sécheresse avec celles des QTLs de caractères agronomiques.

6.4. Co-localisations des QTL adaptatifs et des QTLs de caractères agronomiques

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 position, sur le groupe de liaison 5, que les 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*'). Cette région, qui est liée à un marqueur de SSR (*ORS523-1*), semble être très importante pour la tolérance au stress hydrique et également pour la productivité. La co-localisation de QTLs associés aux caractères adaptatifs (la teneur en eau relative et l'ajustement osmotique) et de QTLs associés aux caractères agronomiques (architecture des plantes et rendement par plante) sur le groupe de liaison 5 pourrait être due à l'existence d'un lien physiologique entre la tolérance au stress hydrique et la productivité. On observe également ce phénomène sur d'autres groupes de liaisons, notamment sur les groupes de liaisons 16 et 7. Ce dernier montre une co-localisation entre le potentiel de turgescence (Ψ_t) et les paramètres de croissance et de développement. 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 différents QTLs associés aux caractères physiologiques impliqués dans la tolérance à la sécheresse. Ils sont situés sur les groupes de liaisons 5, 12 et 16. Les résultats de cette partie montrent que des régions génomiques peuvent être associées à la fois à la tolérance à la sécheresse et aux traits agronomiques de productivité.

Nous avons étudié la base génétique de l'association entre différents caractères par l'analyse de co-localisation de 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 chez le tournesol. L'identification des régions génomiques liées aux traits de l'état hydrique et à l'ajustement osmotique et également aux traits agronomiques chez les lignées soumises à une contrainte hydrique, sera utile au développement de programmes de sélection pour la tolérance du tournesol à la sécheresse.

6.5. QTLs associés à l'indice de la tolérance et leur co-localisation avec ceux associés aux caractères adaptatifs

Un indice de la tolérance à la sécheresse a été calculé à partir des valeurs du rendement par plante pour le traitement hydrique 'irriguée' et 'non irriguée' dans les conditions de la serre et du champ (rendement dans la condition 'non irriguée'/rendement dans la condition irriguée). Nous avons comparé la position des QTLs associés à l'indice de la tolérance au stress hydrique avec ceux associés aux paramètres d'adaptation. Les résultats montrent que sept QTLs associés à l'indice de la tolérance se trouvent dans la même position que certains QTLs associés aux caractères adaptatifs sur les groupes de liaisons 1, 7, 10, 13, 14, 16 et 17. Deux QTLs contrôlant l'indice de la tolérance à la sécheresse dans les conditions de la serre et du champ (*GYTI-F1* et *GYTI-G1*) sont co-localisés avec celui de l'ajustement osmotique au champ (*OA.F.1.1*) et avec les QTLs contrôlant le potentiel de turgescence et le potentiel hydrique foliaire, sur le groupe de liaison 1. Un autre QTL contrôlant l'indice de la tolérance à la sécheresse au champ (*GYTI-F13*) est co-localisé avec celui de l'ajustement osmotique en serre (*OA.13.1*) sur le groupe de liaison 13. Nos résultats montrent que la capacité de la plante à maintenir la turgescence et l'ajustement osmotique en réponse à la contrainte hydrique et la tolérance à la sécheresse en terme de rendement peut avoir une base génétique commune. Cette base génétique commune montre l'importance des réponses adaptatives à la sécheresse pour l'amélioration du rendement chez le tournesol.

6.6. Variabilité génétique des réponses physiologiques à la sécheresse par analyse de l'expression des gènes.

L'analyse de l'expression des gènes a largement contribué à la connaissance des mécanismes impliqués dans la tolérance à la sécheresse. Par exemple, une étude de l'expression des gènes par microarray employant 1300 ADNc chez *d'Arabidopsis* a démontré que 44 gènes sont induits en réponse à la déshydratation (Seki et al. 2001). Cependant, chaque gène induit n'a pas nécessairement un rôle dans l'adaptation; certains pourraient être induits en raison des dommages provoqués par le stress (Zhu 2000). Il s'avère donc nécessaire d'identifier : si les gènes induits par le stress ont un rôle effectif dans l'acquisition de la tolérance, ou bien s'ils marquent un état de stress. Comment relier ces gènes aux mécanismes et critères physiologiques préalablement définis, et comment les utiliser dans un schéma de sélection ?

Pour répondre partiellement à ces deux questions, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'expression de gènes impliqués, d'une part dans la tolérance à la contrainte hydrique, et d'autre part dans les processus limitant les dommages oxydatifs, pour quatre génotypes ayant un comportement contrasté en situation de contrainte hydrique. L'expression des gènes étudiés a été mise en relation avec les caractères physiologiques mesurés concernant l'état hydrique, la photosynthèse et la photochimie impliquées dans les processus d'assimilation du carbone pour la croissance.

Nous pouvons noter que le niveau d'expression des certains gènes, plus particulièrement de l'aquaporine, est corrélé aux différences de comportements physiologiques des génotypes sous contrainte hydrique. Ce gène aurait un rôle effectif dans l'acquisition de la tolérance au déficit hydrique. Par exemple, l'expression du gène de l'aquaporine (protéine responsable du flux d'eau à travers les membranes cellulaires) est associée à la teneur en eau relative (RWC), aux potentiels hydrique et osmotique des feuilles (Ψ_w , Ψ_s). Nous avons démontré également qu'une diminution de RWC, Ψ_w et Ψ_s conduit à une diminution de l'expression du gène d'aquaporine. Pour les processus photochimiques, ce sont principalement les niveaux d'expression des gènes codant pour la superoxide dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la peroxidase (POD) qui différencient les génotypes soumis à la sécheresse, cependant la superoxide dismutase (SOD) et la catalase (CAT) pourraient avoir un rôle effectif dans l'acquisition de la tolérance au déficit hydrique. Par contre, la peroxidase (POD) et la

déhydrine semblent être simplement des marqueurs d'état de stress, étant donné que les fortes augmentations de transcrits de la POD (jusqu'à 67) et de la déhydrine en réponse au déficit hydrique, ne sont pas associées directement aux différences génotypiques de tolérance à la sécheresse.

Ces résultats préliminaires, les premiers obtenus chez le tournesol, ont permis une mise en relation des traits physiologiques relatifs à la tolérance à la sécheresse avec l'expression de gènes impliqués dans la tolérance à la sécheresse. Ils permettent donc d'envisager une utilisation des gènes étudiés comme marqueurs moléculaires de la tolérance au déficit hydrique chez le tournesol.

Perspectives

Ce travail pourrait être développé pour 1) mieux comprendre les différences génétiques de tolérance à la sécheresse chez le tournesol, 2) aider au développement de modèles de cultures à paramètres génétiques, et d'outils pour l'aide à la sélection de génotypes d'intérêt.

Compréhension des différences génotypique pour la tolérance à la sécheresse

Afin de vérifier la stabilité des zones du génome impliquées dans l'expression des caractères liés à l'adaptation à la sécheresse, il serait nécessaire de réaliser des expérimentations complémentaires dans différents environnements pédoclimatiques et dans d'autres fonds génétiques, ce qui permettrait de valider les QTLs constitutifs et les QTLs spécifiques aux environnements. Le croisement entre des RILs, présentant des comportements contrastés en situation sèche et un polymorphisme pour des QTLs intéressants, permettrait par la recombinaison génétique, d'identifier les marqueurs étroitement liés aux QTLs d'intérêt.

La carte génétique du croisement PAC2 x RHA266 qui contient désormais 191 SSR et 304 AFLP peut être exploitée dans une vision fonctionnelle et appliquée. A l'issue de la phase actuelle de cartographie SSR, que nous avons réalisée, des efforts devront être redéployés dans la recherche de polymorphismes SNP et SSCP pour des gènes candidats, et dans le marquage des zones du génome que nous avons identifiées pour l'expression de la tolérance au stress hydrique. La technique SSCP peut être utilisé pour cartographier des EST qui sont disponible au laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes. La première direction peut avoir comme objectif la préparation d'un ensemble de gènes que l'on peut

cartographier. Cette stratégie consiste à cartographier des séquences d'ADNc (pour exemple la séquence codant pour l'aquaporines) caractérisées comme susceptibles d'intervenir dans mécanismes physiologiques de la tolérance a la sécheresse. Ces séquences peuvent rendre compte de l'effet de certain QTLs et être utilisées, après validation, comme marqueur de la tolérance. Le deuxième objectif peut être la mise en place d'une stratégie de cartographie fine et la réalisation de contig de BAC au voisinage des QTLs d'adaptation, ce qui permettrait d'envisager le clonage positionnel. Des banques génomiques en vecteur BAC ont été construites, dont deux qui représentent l'équivalent de 5 fois le génome du tournesol (Gentzbittel et al. 2002 ; Bouzidi et al. 2006). Ces banques peuvent être utilisées pour réaliser une carte physique complète, par « *fingerprinting* » 158 000 BAC disponible au laboratoire BAP (Gentzbittel et al. 2002), et ces BAC peuvent être ancrés sur la carte génétique par cartographie des EST ou SSR. Cette carte physique va constituer un utile de première importance pour le clonage positionnel de gènes et pour la génomique comparatives des *Compositae*.

L'identification de gènes candidats pour les caractères d'adaptation étudiés, leur co-localisation avec les QTLs et enfin, leur validation à partir d'études d'association en populations naturelles fourniront des outils de grand intérêt pour l'étude de la diversité adaptative intra et interspécifique chez le tournesol.

Analyser l'expression d'un plus grand nombre de gènes à l'aide de technique microarray peut aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse au stress hydrique. Cette technique peut être déployée selon deux objectifs : 1- Analyser l'expression de gènes en utilisant les génotypes contrastés et corrélér le niveau d'expression des gènes avec la réponse physiologique. 2- Analyser l'expression des gènes sur toutes les lignées recombinantes (RILs) issues du croisement 'PAC-2' x 'RHA-266' pour identifier les QTL contrôlant l'expression de gène (eQTL). Cette dernière approche permettrait de localiser les QTLs impliqués dans l'expression différentielle globale des gènes et, par conséquent, d'associer la variation phénotypique avec la variation transcriptomique. L'analyse du transcriptome par puce à ADN peut fournir des informations quantitatives sur plusieurs dizaines de milliers de gènes simultanément (Alizadeh et al. 2000). L'expression de chaque gène peut ainsi être déterminée, en termes d'abondance des transcrits et être mise en relation avec des changements physiologiques. Une puce à ADN à été réalisée pour le tournesol par la Génopôle Midi-

Pyénées, qui peut donner l'opportunité de quantifier les variations du niveau d'expression des gènes, induit en condition de contrainte hydrique. Au total de 800 produits PCR de séquences de tournesol impliquées dans différentes voies du métabolisme de base et dans le signal de transduction a été déposé sur membrane de nylon à raison de deux dépôts pour chaque produit PCR.

Application à la sélection de géotypes d'intérêts

Nos résultats démontrent que certains marqueurs microsatellites comme (ORS523_1, ORS331_1 et HA3103) sont les plus importants pour à la fois les caractères d'adaptations à la sécheresse (états hydriques et ajustement osmotique) et également pour la croissance et la productivité. Le marqueur ORS391 est lié au rendement par plante dans trois conditions de traitements hydriques. L'ensemble des marqueurs SSR identifiés, pourrait être testé plus précisément pour envisager leur utilisation éventuelle dans un programme de sélection assistée par marqueurs (SAM) pour combiner la tolérance à la sécheresse et la productivité dans le même background génétique.

Nous avons décomposé les caractères quantitatifs en composantes mendéliennes (QTLs) permettant de 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 (Lande & Thompson 1990 ; Ribaut & Ragot 2007). Cependant, la sélection assistée par marqueurs reste encore très controversée (Dudley 1993 ; Strauss et al. 1992): la stabilité de l'expression des 'QTL' selon le milieu (Ribaut & Ragot 2007 ; Beavis et al. 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 & Stettler 1995) sont autant d'aspects qui pourraient ralentir l'utilisation des marqueurs en sélection. Cependant, à long terme, la localisation précise des gènes qui affectent les caractères quantitatifs comme celles associées à la tolérance à la sécheresse devrait nous permettre de caractériser et utiliser ces gènes dans des programmes de sélection du tournesol.

Nous suggérons également que la base de données issue de nos expérimentations soit utilisée pour valider le modèle de culture 'Tournesol' à paramètres génétiques (développé actuellement dans notre UMR). Enfin, la combinaison de la génétique quantitative (QTL) et

de tels modèles de cultures devrait permettre de prévoir quels allèles seraient favorables pour des scénarios de sécheresse variés (Reymond et al. 2003 ; Hammer et al. 2005 ; Tardieu & Zivy 2006, ESCo '*sécheresse et agriculture*').

Références

- Abou Al Fadil, 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.
- Adams WW, Demming-Adams B (1995) The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. Plant Cell Environ 18 (1995) 117-127.
- Ahloowalia BS, Maluszynski M, Nichterlein K (2004) Global impact of mutation-derived varieties. Euphytica 135: 187-204.
- Alamillo JM, Bartels D (2001) Effects of desiccation on photosynthesis pigments and the ELIP-like dsp22 protein complexes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. Plant Science 160: 1161–1170.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossons IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, et al. (2000) Distinct type of diffuse large B-Cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 403: 503-511.
- 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 GR, 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.
- Al-Chaarani GR, Gentzbittel L, Wedzony M, Sarrafi A (2005) Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Sci 169 : 221–227.
- Al-Chaarani GR, Roustae A, Gentzbittel L, Mokrani L, Barrault G, Dechamp-Guillaume G, 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
- Alejo-James A, Jardinaud MF, Maury P, Alibert 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: 285-294.
- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol. 107: 1049-1054.
- Almeida JAS (1992) Controle da iniciação floral em *Helianthus annuus* L. (Girassol). Thèse. Universidade Estadual de Campinas, Brasil 131p.
- Almeida JAS, Pereira MFDA (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 JO, 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.
- Amodeo G, Dorr R, Vallejo A, Stuka M, Parisi M (1999) Radial and axial water transport in the sugar beet storage root. J Exp Bot 50: 509–516.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol Biol Rep 9: 208–219.

- Asada K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue, in: C. H. Foyer, P. M. Mullineaux (Eds), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 77-104.
- Asada K (2003) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639.
- Baek KH, Skinner DZ (2003) Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci* 165: 1221-1227.
- Bajaj S, Targolli J, Liu LF, Ho THD, Wu R (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Mol Breed* 5: 493-503.
- Baker J, Steele C, Dure L (1988) Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11: 277–291.
- Baker NR (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiol Plant* 81: 563–570.
- Baker RN, Rosenqvist E (2004) Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 403: 1607-1621.
- Basten CJ, Weir BS, Zeng ZB (2002) QTL cartographer version 1.16: program in statistical genetics. Department of statistics, North Carolina State University.
- Beavis WD, Grant D (1991) A linkage map based on information from F2 populations of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 88: 636-644
- Beavis WD (1994) The power and deceit of QTL experiment: lessons from comparative studies. In: proceeding of the 49th annual corn and sorghum industry research conference, Chicago, 1994, pp. 250–266.
- Beavis WD, 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*. CRC Press. Boca Raton, 1996, pp. 123–149.
- Bedov S (1985) A study of combining ability for oil and protein contents in seed of different sunflower inbreds. In *Proc. 10th Int. Sunflower Conf. Mar del Plata, Argentina. 10-13 Mar. 1985. Int. Sunflower assoc. Paris, France.* p 675-682
- Ben GY, Osmond CB, Sharkey TD (1987) Comparison of photosynthetic responses of *Xanthium strumarium* and *Helianthus annuus* to chronic and acute water stress in sun and shade. *Plant Physiol.* 84: 476-482.
- Ben-Chaim A, Grube RC, Lapido M, Jahn M, Paran I (2001) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *capsicum annuum*. *Theor Appl Genet* 102 (8): 1213-1220
- Berry ST, Leon AJ, Hanfrey CC, Challis P, Burkholz A, Barnes SR, Rufener GK, Lee M and Caligari PDS (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, Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I, Tourvielle de Labrouhe D, Nicolas P Vear F (2004) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theor Appl Genet* 109: 865-874.
- Bert P F, Jouan I, Tourvielle de Labrouhe D, Serre F, Philippon J, Nicolas P, Vear F (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.

- Bianchi G, Gamba A, Murelli C, Salamini F, Bartels D (1991) Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J* 1: 355–359.
- Bilger W, Bjorkman O (1991) Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* 184: 476–482.
- Blanchet R (1994) Ecophysiologie et élaboration du rendement du tournesol. Principaux caractères. Combe L, Picard D. Un point sur. Elaboration du rendement des principales cultures annuelles. Paris, INRA, 87-99
- Blum A (1988) *Plant Breeding For Stress Environment*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Blum A (1989) Osmotic adjustment and growth in barley genotypes under drought stress. *Crop Sci.* 29: 230–233.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099–1111.
- Boominathan P, Shukla R, Kumar A, Manna D, Negi D, Verma PK, Debasis C (2004) Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiol* 135: 1608-1620.
- Bouzeidi MF, Franchel J, Tao Q, Stormo K, Mraz A, Nicolas P, Mouzeyar S (2006) A sunflower BAC library for PCR screening and physical mapping of targeted genomic regions. *Theor Appl Genet* 113: 81-89.
- Boyer JS (1968) Relationships of water potential to growth of leaves. *Plant physiol* 43: 1056–1062.
- Bradshaw HD, Stettler RF (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 ZD (2006) Variability among advanced gamma-irradiation induced large-seeded mutant breeding lines in the ‘Georgia Brown’ peanut cultivar. *Plant Breed* 121: 275-277.
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2: 48–54.
- Bray EA (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Ann Bot* 89 Spec No: 803–811
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55: 2331–2341
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones), pp. 1158–1203. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC (2002) Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J Exp Bot* 53: 13–25.
- Burke JJ (2001) Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. *Physiol Plant* 112: 167-170.
- Cagirgan MI (2006) Selection and morphological characterization of induced determinate mutants in semase. *Field Crops Res* 96: 19-24.
- Carpenter JF, Crowe LM, Arakawa T (1990) Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J Dair Sc* 73: 3627– 3636.
- 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, Grando S (1996) Drought as a challenge for the plant breeder. *Plant Growth Regulation* 20: 149-155.
- Cellier F, Conejero G, Breitler JC, Casse F (1998) Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower Accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance.

- Plant Physiol 116: 319–328.
- Chandler PM, Robertson M (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 113–141.
- Charcosset A, Causse M, 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, 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.
- Chimenti C A, Pearson J, Hal AJ (2002) Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res* 75: 235–246.
- Clarke JM, McCaig T (1982) Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci.* 22: 503–506.
- Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant* 97: 795– 803.
- Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100: 291– 296.
- Close TJ, Fenton RD, Moonan F (1993) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol Biol* 23: 279–286.
- Connor DJ, Hall AJ (1997) Sunflower physiology. In: Schneiter AA (ed.) *Sunflower technology and production*, Academic 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
- Conory JP, Virgona JM, Smillie RM, Barlow EW (1988) Influence of drought acclimation and CO₂ enrichment on osmotic adjustment and chlorophyll a fluorescence of sunflower during drought. *Plant Physiol* 86: 1108-1115.
- Cornic G (1994) Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis In: Baker N, Bowyer JS (eds) *Photoinhibition of photosynthesis* BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci* 5: 187-188.
- Cornic G, Briantais JM (1991) Partitioning of photosynthetic carbon flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentration and during drought stress. *Planta* 183: 178-184.
- Cosgrove DJ (1993) Water uptake by growing cells: An assesment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *Int J Plant Sci* 154: 10–20.
- Cresti M, Blackmore S, Went JL (1992) *Atlas of sexual reproduction in flowering plants*. Berlin, Springer-Verlag
- Critchley C, Russel AW (1994) Photoinhibition of photosynthesis in vivo: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiol Plant* 92: 188–196.
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 55-76.
- Davis WJ, Tardieu F, Trejo CL (1994) How do chemical signals works in plants that grow in drying soil? *Plant Physiol* 104: 309–314.

- De Boer SH, Ward LJ, Li X, Chittaranjan S (1995) Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of Blotto. *Nuc Acids Researsh* 23: 2567-2568.
- Dejardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochemical J* 344: 503–509.
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599–626.
- Dudley JW (1993) Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci* 33: 660-668
- Dure III L, Crouch M, Harada J, Ho T-HD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Bio* 12: 475–486.
- El-Hity MA (1992) Genetical analysis of some agronomic characters in sunflower (*Helianthus annuus* L). In: Proc 13th Sunflower Int Conf, Pisa, Italy, pp1118-1128
- Fambrini M, Durante C, Cionini G, Geri C, Giorgetti L, Michelotti V, Salvini M, Pugliesi C (2006) Characterization of *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* gene in *Helianthus annuus* and its relationship with zygotic and somatic embryogenesis. *Dev Genes Evol* 216: 253-264.
- Fekade S, Krieg AR (1992) Osmotic adjustment in sorghum: 1. Mechanisms of diurnal osmotic potential changes. *J Exp Bot.* 99: 577-582.
- Fick GN (1978) Sunflower breeding and genetics. In: Carter JF (ed) Sunflower science and technology. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 279-327
- Fick GN, and Miller JF (1997) The genetics of sunflower. In: Shneither AA (ed) Sunflower technology and production. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin. Pp 441-495
- Flagella Z, Rotunno T, Tarantino E, Di Caterina R, De Caro A (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.
- 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.
- Flexas J, Medrano H (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plant: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89: 183-189.
- Flores Berrios E, Gentzbittel L, Kayyal H, Alibert G, Sarrafi A (2000) AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 101: 1299–1306.
- Flower DJ, Ludlow MM (1986) Contribution of osmotic adjustment to the dehydration tolerance of water-stressed pigeonpea (*Cajanus cajan* L millsp) leaves. *Plant Cell Env* 9: 33–40.
- Foolad MR, Zhang LP, Subbiah P (2003) Genetic of drought tolerance during seed germination in tomato, inheritance and QTL mapping. *Genome* 46: 536–545.
- Fracheboud Y, Leipner J (2003) The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature and drought stress. In: DeLL JR, Tiovonen PMA eds, Practical applications of chlorophyll fluorescence in plant biology. Boston: Klower Academic Publishers, 2003, pp 125-150.

- Frova C, Krajewski P, Di Fronzo N, Villa M, Sari-Gorla M (1999) Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components. *Theor Appl Genet* 99: 280–288.
- 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
- Gachon L (1972) Les besoins en éléments nutritifs du tournesol. Proceeding of the 5th International Sunflower Conference. Clermont Ferrand, France, p 63-72.
- Geigenberger P, Reimholz R, Deiting U, Sonnewald U, Stitt M (1999) Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. *Plant J* 19: 119–129.
- Gentzbittel L, Abbot A, Galaud JP, Georgi L, Fabre F, Liboz T, Alibert G (2002) A bacterial artificial chromosome (BAC) library for sunflower, and identification of clones containing genes for putative transmembrane receptors. *Theor Appl Genet* 266: 979-987.
- Gentzbittel L, Mouzeyar S, Badaoui S, Mestries F, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P (1998) Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor Appl Genet* 96: 519–525.
- Gentzbittel L, Vear F, Zhang Y-X, Bervillé A, Nicolas P (1995) Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 90: 1079–1086.
- Gimenez C, Mitchell VJ, Lawlor DW (1992) Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiol* 98: 516–524.
- Giordani T, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Vitagliano C, Cavallini (1999) Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Plant Mol Biol* 39: 739-748
- Godde D (1999) Adaptations of the photosynthetic apparatus to stress conditions. In *Plant Responses to Environmental Stresses* (ed. H.R. Lerner), pp. 449–474. Marcel Dekker, New York.
- Godoy JA, Pardo JM, Pintor-Toro JA (1990) A tomato cDNA clone inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Mol Biol* 15: 695–705.
- Gomez SM, Kumar SS, Jeyaprakash P, Suresh R, Biji KR, Boopathi MM, Price AH, Babu C (2006) Mapping QTLs linked to physio-morphological traits and production traits under drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) in the target environment. *A J Bioch Biotech* 4: 161-169.
- Graan T, Boyer JS (1990) Very high CO₂ partially restores photosynthesis in sunflower at low water potentials. *Planta* 181: 378–384.
- Guo FX, Zhang MX, Chen Y, Zhang WH, Xu SJ, Wang JH, An LZ (2006) Relation of several antioxidant enzymes to rapid freezing resistance in suspension cultured cells from alpine *Chorispora bungeana*. *Cryobiology* 52 : 241-250.
- Gupta KK, Khanna KR (1982) Gene action and heterosis for oil yield and component characters in sunflower. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding* 42: 265-271
- Gupta SA, Berkowitz GA (1987) Osmotic adjustment, symplast volume, and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. *Plant Physiol* 87: 1040–1047.

- Haanstra JPW, Wye C, Verbakel H, Meijer-Dekens F, Van den Berg P, Odinet P, van Heusden AW, 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
- Hall A J, Whitfield D H, Connor DJ (1990) Contribution of pre-anthesis assimilates to grain filling in irrigated and water-stressed sunflower crops. II . Estimates from a carbon budget. *Field Crops Res* 24: 273–294.
- Hammer G, Chapman S, van Oosterom E, Podlich D (2005). Trait physiology and crop modelling as a framework to link phenotypic complexity to underlying genetic systems. *AJAR* 56: 947-960
- Han C U, Lee C H, Jang K S, Choi G J, Lim H K, Kim J C, Ahn S N, Choi J E, Cha J S, Kim H T, Cho KY, Lee S W (2004) Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Molecules and Cells* 17: 462-468
- Harris MJ, Outlaw JWH (1991) Rapid adjustment of guard-cell abscisic acid levels to current leaf water status. *Plant Physiol* 95: 171–173
- Hervé D, Fabre F, Flores Berrios E, Leroux N, Al charani Gh, Planchon C, Sarrafi A, Gentzbittel 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
- Hewezi T, Petitprez M, Gentzbittel L (2006) Primary metabolic pathways and signal transduction in sunflower (*Helianthus annuus* L.): comparison of transcriptional profiling in leaves and immature embryos using cDNA microarray. *Planta* 223: 948-964
- Holmberg N, Bulow L (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci* 3: 61-66
- Holmstrom K, Mantyla E, Welin B, Mandal A, Palva ET, Tunnela OE, Londesborough J (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683–684.
- Hongtrakul V, Huestis G M, Knapp S J (1997) Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: Genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor Appl Genet* 95: 400–407
- Hongtrakul V, Slabaugh MB, Knapp SJ (1998) DFLP, SSCP, and SSR markers for Δ^9 -stearoyl-acyl-carrier protein desaturase strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. *Mol Breed* 4: 195–203.
- Hugo A, DaMatta Fabio Pinheiro M, Chaves Agnaldo RM, Fontes Elizabeth PB, Loureiro Marcelo E (2004) Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clone of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. *Plant Sci* 167 1307-1314.
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377–403
- Ingram J, Chandler J, Gallagher L, Salamini F, Bartels D (1997) Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Physiol* 115: 113–121.
- Ivanov P, Petakov D, Nikolova V, Petchec E (1988) Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. pp. 463–465. In: Proc. 12th Int. Sunflower Association, Toowoomba, Australia.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmor SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998) Arabidopsis CBF1 over-expression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104–106.
- Jamaux I, Steinmetz A, Belhasen E (1997) Looking for molecular and physiological markers for osmotic adjustment

- in sunflower. *New Phytol* 137: 117-127.
- Jan CC (1992) Inheritance and allelism of mitomycin C- and streptomycin-induced recessive genes for male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* 32, 317–319.
- Jan CC, Rutger JN (1988) Mitomycin C-and streptomycin-induced male sterility in cultivated sunflower. *Crop Sci* 28: 792–795.
- Jan CC, Vick BA, Miller JF, Kahler AL, and Butler ET (1998) Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 96: 15-22
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS , Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 54: 713–725
- Javot H , Maurel C (2002) The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot* 90: 301–313.
- 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 MM Rawson HM (1979) Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. *Physiol Plant* 45: 103–111.
- Jones MM, Turner NC (1980) Osmotic adjustment in expanding and fully expanded leaves of sunflower in response to water deficits. *Aus J Plant Physiol* 7: 181–192.
- Jones HG (1992) *Plant and Microclimates* (Ed): A quantitative approach to environmental plant physiology, Cambridge University Press, London.
- 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.
- Joshi CP, Kluveva NY, Morrow KJ, Nguyen HT (1997) Expression of a unique plastid localized heat shock protein is genetically linked to acquired thermotolerance in wheat. *Theor Appl Genet* 95: 834-841.
- Jung S (2004) Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Sci.* 166: 459-466.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech* 17: 287–291.
- Katsuhara M, Otsuka T, Ezaki B (2005) Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathion S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 169: 369-373.
- Kleines M, Elster RC, Rodrigo MJ, Blervacq AS, Salamini F, Bartels D (1999) Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose synthase genes from the *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* 209: 13–24.
- Kohet RJ, Bird L S (2002) Inheritance and linkage analysis of the yellow Pulvinus mutant of cotton. *J Cotton Sci* 6: 115-118.
- Kosambi DD (1944) The estimation of a map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12 172–175.1
- Kramer PJ (1988) Changing concepts regarding plant water relations. *Plant Cell Environ* 11: 565–568.
- Krishnan M, Nguyen HT, Burke JJ (1989) Heat shock protein synthesis and thermotolerance in wheat. *Plant Physiol* 90: 140-145
- Lai Z, Livingstone K, Zou Y, Church SA, Knapp SJ, Andrews J, Rieseberg LH (2005) Identification and mapping of

- SNPs from ESTs in sunflower. *Theor Appl Genet* 1118: 1532–1544.
- Lande R, Thompson R (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124: 743-756
- Lanceras JC, Pantuwan G, Boonrat J, Toojinda T (2004) Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiol* 135: 384-399.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER, an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.
- Langar K, Lorieux M, Desmarais E, Griveau Y, Gentzbittel L, Bervillé A (2003) Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred line. *Theor Appl Genet* 106: 1068–1074.
- Lawlor DW (1995) The effects of water deficit on photosynthesis In: Smirnoff N(ed) *Environment and Plant Metabolism Flexibility and Acclimation*. BIOS Scientific publishers, Oxford.
- Lawlor DW (2002) Limitation of photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. *Ann Bot* 89: 871-885
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficit in higher plants. *Plant Cell Env* 25: 275-294.
- Lebreton C, Lazic-Jancic V, Steed A, Pekic S, Quarrie SA (1995) Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationship between traits. *J Exp Bot* 46: 853-865
- Leon AJ, Andrade FH, Lee M (2003) Genetic analysis of seed oil percentage across generations and environments in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Crop Sci* 43: 135-140
- Leon AJ, Andrade FH, Lee M (2000) Genetic mapping of factors affecting quantitative variation for flowering in sunflower. *Crop Science* 40: 404-407
- Leon AJ, Lee M, Andrade FH (2001) Quantitative trait loci for growing degree days to flowering and photoperiod response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 102: 497-503
- 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
- Lin CL, Kao CH (2002) Osmotic stress-induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Growth Reg* 37: 177-184.
- Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943–1945.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25 (2001) 402–408.
- Lnader E S, Botestein D (1989) Mapping Mendelian factors underling quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- Lopez Pereira M, Sandra VO, Trapani N (2000) Physiological traits associated with sunflower yield potential: Future oportunities. 15th International Sunflower Conference, 12-15 June 2000, 2: E-82
- Ludlow M.M, Chu ACP, Clements RJ, Kerslake RG (1983) Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. *Australian J Plant Physiol* 10: 119–130.
- Ludlow MM, Muchow RC (1990) A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Adv Agron* 43: 107-153

- Luu DT, Maurel M (2005) Aquaporins in the challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant cell Env* 28: 85-96
- Machacek C (1979) Study of the inheritance of earliness in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genet and Sel* 15: 225-232
- Mackill DJ, Zhang Z, Redona ED, and Colowit PM (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977
- Manly KF, Olson JM (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. *Mam Genome* 10: 327-334
- Marsan PA, Gorni C, Chiotto A, Redaelli R, Van Vijk R, Stam P, 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
- Martre P, Morillon R, Barrieu F, Gretchen BN, Park SN, Maarten JC (2002) Plasma membrane aquaporin play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol* 130: 2101-2110
- Matin MA, Brown JH, Ferguson H (1989) Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agron J* 81: 100-105.
- Matthews MA, Boyer JS (1984) Acclimation of photosynthesis to low leaf water potentials. *Plant Physiol* 74: 161-166.
- Maurel C, Chrispeels MJ (2001) Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol* 125: 135-138.
- Maury P, Berger M, Mojayad F, Planchon C (2000) Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant Soil* 223: 153-160
- Maury P, Mojayad F, Berger M, Planchon C (1996) Photosynthesis response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiol Plant* 98: 57-66
- Maxwell K, Johnsen GN (2000) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot* 345: 659-668.
- Mc Daniel CN, Singer SR, Smith SME (1992) Developmental states associated with the floral transition. *Developmental*.
- McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol* 111: 1177-1181.
- Merrien A (1992) Les points techniques du CETIOM: physiologie du tournesol. Ed. CETIOM, 66p.
- Merrien A, 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, Gelfi N (1981a) Relationships between water supply, leaf area development and survival, and production in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie* 1: 917-922.
- 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 CC, Melchinger AE (2005) QTL mapping of resistance to *Sclerotinia* midstalk-rot in RIL of sunflower population NDBLOSSel × CM625, *Theor Appl Genet* 110: 1490-1498.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci* 7: 405-410.

- Mohammed GH, Binder WD, Guillies S L (1995) Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand J For Res* 10: 383-410.
- Mojayad F (1993) Adaptation à la sécheresse, photosynthèse et photoinhibition chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.). PhD Thesis. Institut National Polytechnique, Toulouse, France, 97p.
- Mojayad F, Planchon C (1994) Stomatal and photosynthetic adjustment to water deficit as the expression of heterosis in sunflower. *Crop Sci* 34: 103–107.
- Mokrani L, Gentzittel 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
- Moons A, Bauw G, Dekeyser R, Von Montagu M, Van Der Straeten D (1995) Novel ABA responsive proteins in vegetative rice tissue. *Curr Topics Plant Physiol* 10: 288-289
- Morgan J M (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 299-319
- Morgan JM (1983) Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. *Aust J Agric Res* 34: 607–614.
- Morizet J, Le Blevenec L (1990) Flux de sève et de solutés obtenus par exsudation forcée sur un système racinaire de tournesol. *Plant Physiol Biochemistry* 28: 87–94.
- Morizet J, 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.
- Muller JE, Whitsitt MS (1993) Plant cellular response to water deficit. *Plant Growth regul* 20 (1996) 41-46.
- Munns R, Sharp RE (1993) Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Aus J Plant Physiol* 20: 425–437.
- Munns R, 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
- Neven LG, Haskell DW, Hofig A, Li Q-B, Guy CL (1993) Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Mol Biol* 21: 291–305
- 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
- Oidaira H, Sano S, Koshiha T, Ushimaro T (2000) Enhancement of antioxidative enzyme activities in chilled rice seedlings. *J Plant Physiol* 156: 811-813.
- Oono Y, Seki M, Nnjo T, Narusaka M, Fujita M, Satoh R, Satou M, Sakurai T, Ishida J, Akiyama K, Lida K, Maruyama K, Satoh S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003) Monitoring expression profile of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca 7000 full-length cDNA microarray. *Plant J* 34: 868-887
- Osmond CB, Ramus J, Levavasseur G, Franklin LA, Henley WJ (1993) Fluorescence quenching during photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid. *Planta* 190 : 97-106.
- 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

- Ouvrard O, Cellier F, Ferrare K, Tousch D, Lamaze T, Dupuis J-M, Casse-Delbart F (1996) Identification and expression of water stress- and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol Biol* 31: 819–829
- Paniego N, Echaide M, Munoz M, Fernandez L, Torales S, Faccio P, Fuxan I, Crrera M, Zandomeni R, Syarez EY, Esteban Hopp H (2002) Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34–43.
- 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.
- Parcy F, Valon C, Kohara A, Miséra S, Giraudat J (1997) The ABSCISIC ACIDINSENSITIVE3, FUSCA3 and LEAFY COTYLEDON1 genes act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *Plant Cell* 9: 1265-1277
- Passioura JB (1994) The yield of crops in relation to drought. In: *Physiology and Determination of Crop Yield*, Boote KJ et al. (Ed). Crop Science Society of America. Madison WI, pp. 343-359.
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations and environments. *Genetics* 127: 181-197
- Pathirana R (1992) Gamma ray-induced field tolerance to Phytophthora blight in sesame. *Plant Breed* 108: 314-319
- Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplik V, Castiglioni P, Taramino G, 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.
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D (1997) Differential accumulation of water-stress related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol Plant* 99: 153–159.
- 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
- Phillips J, Bartels D (2000) Gene expression during dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. In *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role in Genetic Engineering* (eds JH Cherry, JD Locy, A. Rychtes), pp. 195– 199. NATO Science Series 83. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol* 107: 125–130.
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears Tobin KH, Van Dun K (1999) Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiol Bioch* 37: 313–317.
- Piquemal M, Cavalié G, Poeydomenge O, 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.
- Piva G, Bouniols A, Mondières M (2000) Effect of cultural conditions on yield, oil content and fatty acid composition of sunflower kernel. 15th International Sunflower Conference, 12-15 June 2000, 1: A-61
- Poormohammad Kiani S, Grieu P, Maury P, Hewezi T, Gentzbittel L, Sarrafi A (2007) 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, 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.* 172: 773-787
- Premachandra GS, Saneoka H, Fujita K, Ogata S (1992) Osmotic adjustment and stomatal response to water deficits in maize. *J Exp Bot* 43: 1451-1456.
- 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 (*Oryza Sativa* L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. *Theor Appl Genet* 100: 49-56
- Pruvot G, Cuine S, Peltier G, Rey P (1996) Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants. *Planta* 198, 471–479.
- Pugnaire FI, Serrano L, Pardos J (1997) In: M. Passaraki (Eds), *Handbook of photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 271-283.
- Quigley F, Rosenberg JM, Shahar-Hill Y, Bonhert HJ (2002) From genome to function: The Arabidopsis aquaporins. *Genome Biol* 3: 1–17
- Ramanjulu S, Bartels D (2002) Drought and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Env* 25: 141-151
- Razi H, Assad M T (1999) Comparison of selection criteria in normal and limited irrigation in sunflower. *Euphytica* 105: 83–90.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol* 161:1189-1202
- Reid JL, Walker-Simmons MK (1993) Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L). *Plant Physiol* 102: 125-131
- Rey P, Pruvot G, Becuwe N, Eymery F, Rumeau D, Peltier GA (1998) A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant J* 13: 97–107.
- Reymond M., Muller B., Leonardi A., Charcosset A., 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 JM, 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
- 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 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
- Robles P, Micol JL (2001) Isolation and characterization of fast-neutron induced mutants with abnormal leaf morphology in Arabidopsis thaliana. *Int J Dev Biol* 45: 59-60.
- Rollier M (1972) Les besoins en éléments nutritifs du tournesol. *Proceeding 5th International sunflower conference*, Clermont Ferrand, France, p73-76
- Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS, Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curr Sci* 90: 683-689

- Sadras VO, Villalobos FJ, Fereres E, Wolfe DW (1993) Leaf responses to soil water deficits: Comparative sensitivity of leaf expansion rate and leaf conductance in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant soil* 153: 189–194.
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 23: 319–327.
- Santrucek M, Krepelka J (1988) Antioxidants-potential chemotherapeutic agents. *Drugs of future*, 13: 974-996.
- Sarda X, Tusch D, Ferrare K, Cellier F, Alcon C, Dupuis JM, Casse F, Lamaze T (1999) Characterization of closely related δ -TIP gene encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Mol Biol* 40: 179-191
- Sarda X, Tusch D, Ferrare K, Legrand E, Dupuis JM, Casse- Delbart F, Lamaze T (1997) Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant Jour* 12: 1103–1111
- Sari-Gorla M, Krajewski P, Di Fronzo N, Villa M, Frova C (1999) Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering. *Theor. Appl. Genet.* 99: 289–295.
- 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
- SAS Institute Inc (2002) *Sas guide for personal computers*, 9th edn, 2002, SAS Institute, Cary.
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7–12.
- Schiex T, Gaspin C (1997) CARTHAGENE, Construction and joining maximum likelihood genetic maps. *Proceeding of ISMB. Porto Carras, Halkidiki, Greece*, 5: 258–267.
- Schneider K, Wells B, Schmelzer E, Salamini F, Bartels D (1993) Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189: 120–131.
- Schneiter AA, Miller JF (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Sci* 21: 901-903
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339–364
- Schonfeld MA, Johnson BF, Craver BF, Morhinweg DW (1988) Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Sci.* 28: 526–531.
- Schwacke R, Grallath S, Breitkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* 11: 377–391.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi- Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses using full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kanya A, Nakajama M, Enju A, Sakurai T, Satou K, Akyama K, Taji T, Yamahuchi-Shinozaki K, Carninci P, kawai J, hayashizaki Y , Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray *Plant J* 31: 279–292
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response *Plant Physiol* 115: 327–334
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1999) Molecular responses to drought stress In: Shinozaki K, Yamaguchi-

- Shinozaki K Molecular (ed) Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants Austin. TX: RG Landes, pp 11–28
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217–223
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho THD, Qu RD (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci* 155: 1–9.
- Skorda EA (1977) Stem and stripe rust resistance in wheat induced by gamma rays and thermal neutrons. In: *Induced mutation against plant disease*, pp. 385-392. IAEA, Vienna.
- Smart LB, Moskal WA, Cameron KD, Bennett AB (2001) MIP Genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant Cell Physiol* 42: 686–693
- Smirnov N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125: 27–58.
- 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.
- Srikanthbabu V, Ganesh K, Krishnaprasad BT, Gopalakrishna R, Savitha M, Udaya Kumar M (2002) Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response (TIR) technique. *J Plant Physiol* 159: 535-545
- Srivalli B, Geetanjali S, Renu KC (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water followed by recovery *Physiol. Plant* 119: 503-512.
- Stitt M (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory protein in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41:153-185
- Stoenescu F (1974) Genetics. In: Vranceanu, A.V. (ed) *Floarea-soarelui*. Editura Academiei Republicii Socialiste, Romania, Bucuresti. P.92-125
- Strand A, Zrenner R, Trevanion S, Stitt M, Gustafsson P, Gardestrom P (2000) Decreased expression of two key enzymes in sucrose biosynthesis pathway cytosolic fructose-1,6 bisphosphatase and sucrose phosphate synthase has remarkably different consequences for photosynthetic carbon assimilation in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Jour* 23: 759-770.
- Strauss SH, Lande R, Namkoong G (1992) Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Can J For Res* 22: 1050-1061
- Sudhakar C, Lakshmi A, Grirdarakumar S (2001) Changes in antioxidant enzymes activity in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity, *Plant Sci*. 161: 613-619.
- Supronova T, Krugman T, Fahima T, Chien G, Shams I, Korel A, Nevo E (2004) Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant Cell Env* 27: 1297-1308
- Tang S, Kishore VK, Knapp SJ (2003) PCR-multiplexes for a genome-wide framework of simple sequence repeat marker loci in cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 107: 6–19.
- Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK, Knapp SJ (2002) Simple sequence repeat map of the sunflower genome.

- Theor. Appl. Genet. 105: 1124–1136.
- Taramino G, Trigey S (1996) Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39: 277–287
- Tardieu F, Zhang J, Gowing DJG (1993) A model of stomatal control by both ABA concentration in the xylem sap and leaf water status. Test of the model and of alternative mechanisms for droughted and ABA-fed field-grown maize. *Plant Cell Environ* 16: 413–420.
- 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
- 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
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll S P, Lawlor DW (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J Exp Bot* 375: 1781–1791
- Trevino MB, O’Connell AM (1998) Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol* 116: 1461–1468.
- Tuberosa R, Salvi S, Sanguineti MC, Landi P, Maccaferri M, Conti S (2002) Mapping morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann. Bot.* 89: 941–963
- 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.
- Turner NC (1986) Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Australian J Plant Physiol* 13: 175–190.
- Turner NC, Jones MM (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 NC (1997) Further progress in crop water relation. *Adv Agron* 58: 293–338
- Turner NC, Wright GC, Siddique KHM (2001) Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Adv Agron* 71: 193–231
- Tuttobene R, Anastaki U, Sortino O, 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
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25: 173–194.
- Upadyayula N, da Silva HS, Bohn MO, Rocheford TR (2006) Genetic and QTL analysis of maize tassel and ear inflorescence and architecture *Theor Appl Genet* 112: 592–606
- Van Berloo R (1999) GGT software for the display of graphical genotypes. *J Heredity* 90: 328–329.
- Vander Willigen C, Pammenter NW, Mundree SG, Farrant JM (2004) Mechanical stabilization of desiccated vegetative tissues of the resurrection grass *Eragrostis nindensis*: does a TIP3;1 and/or compartmentalization of subcellular components and metabolites play a role?. *J Exp Bot* 55: 651–661
- Verwoerd TC, Bekker BM, Hoekema A (1989) A small scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic*

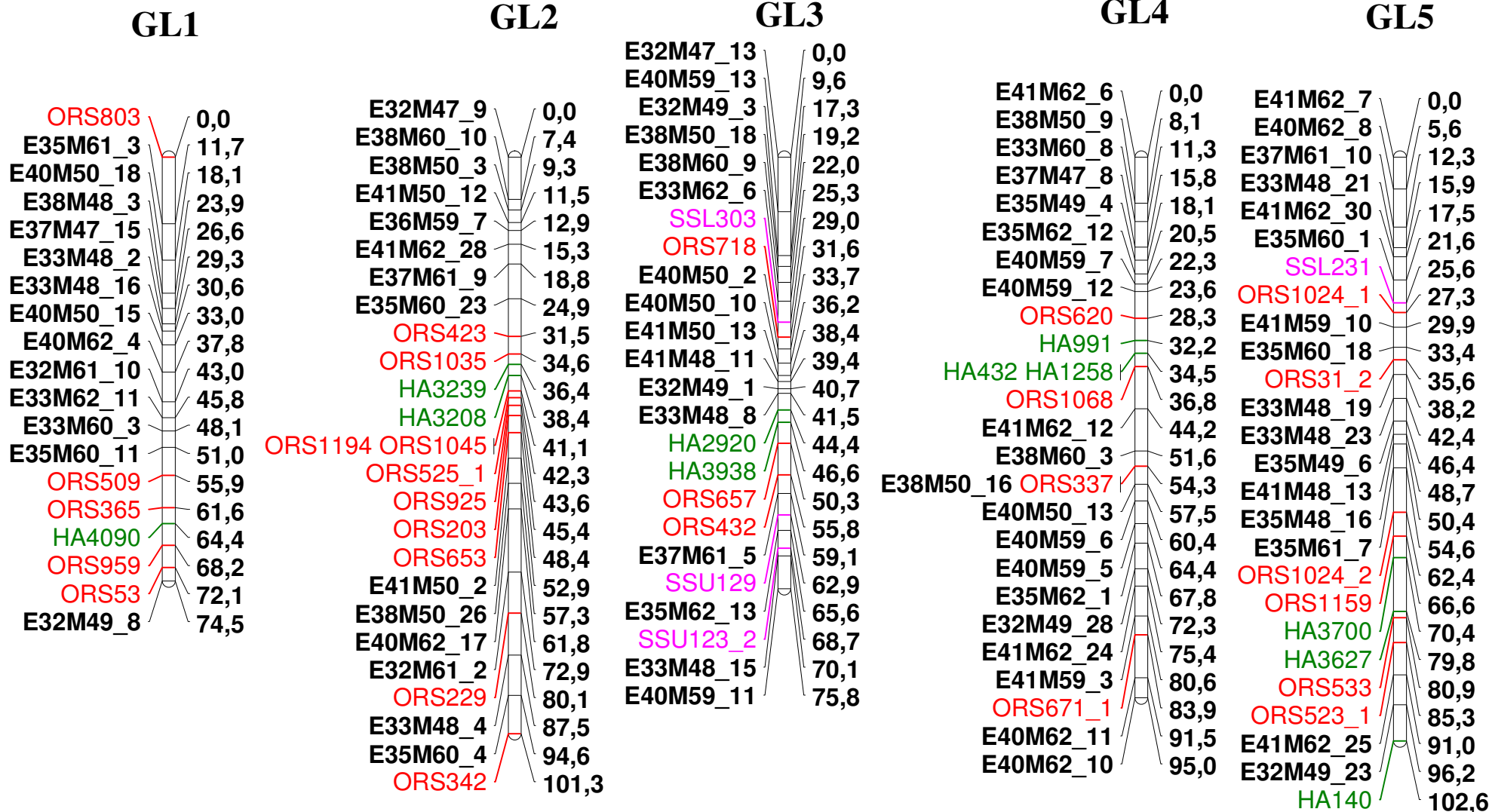
Acid Res. 17: 2362.

- Vichnevetskaia KD, Roy DN (1999) Oxidative stress and antioxidative defence with emphasis on plant antioxidants. Environ. Rev. 7: 31-51.
- 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
- Wang YH, Thomas CE, and Dean RA (1997) A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theor Appl Genet 95: 791-798
- Watkinson JI, Sioson AA, Vasquez-Robinet C, Shukla M, Kuma D, Ellis M, Heath LS, Ramakrishnan N, Chevone B, Watson L T, Van Zyl L, Egertsdotter U, Sederoff R R, Grene R (2003) Photosynthetic acclimation is reflected in specific patterns of gene expression in drought-stressed loblolly pine. Plant Physiol 133: 1702–1716
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res 19: 861-866
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18: 6531-6535
- Wise RR, Sparrow DH, Ortiz-Lopez A, Ort DR (1991) Biochemical regulation during the mid-day decline of photosynthesis in field-grown sunflower. Plant Sci 74: 45–52.
- Xu D, Duan X, Wang B, Ho THD, Ray W (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiol 110: 249–257
- Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H (1997) Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. Plant Cell Physiol 38: 1226–1231
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genetics 238: 17–25.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992) Molecular cloning of 9 cDNA that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana* Sequence analysis of one cDNA that encodes a putative transmembrane channel protein. Plant Cell Physiol 33: 217–224
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. Plant Cell Physiol 38: 1095–1102.
- Yu JK, Mangor J, Thompson L, Edwards KJ, Slabaugh MB, Knapp SJ Allelic (2002) diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. Genome 45 : 652–660.
- Yu JK, Tang S, Slabaugh MB, Heesacker A, Cole G, Herring M, Soper J, Han F, Chu WC, Webb DM, Thompson L, Edwards KJ, Berry S, Leon AJ, Olungu C, Maes N, Knapp SJ (2003) Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. Crop Sci. 43: 367–387.
- Zeevaart JAD, Creelman RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39: 439–473
- Zhang J, Davies WJ (1989) Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. Plant Cell Environ 12: 73–82.

- Zhang J, Babu RC, Pantuwan G, Kamoshita A, Blum A, Wade LJ, Sarkarung S, O'Toole JC, Nguyen HT (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 LS, 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.
- Zhang MX, Xu JL, Luo RT, Shi D, Li Z K (2003) Genetic analysis and breeding use of blast resistance in a japonica rice mutant R917. *Euphytica* 130: 71-76.
- Zhu BC, Su J, Chan MC, Verma DPS, Fan YL, Wu R (1998) Over-expression of a Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water-stress and saltstress in transgenic rice. *Plant Sci* 139: 41–48.
- Zhu JK (2000) Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 941–948.
- Zrenner R, Krause KP, Apel P, Sonnewald U (1996) Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthesis sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *Plant J* 9: 671-681

ANNEXE

La carte génétique



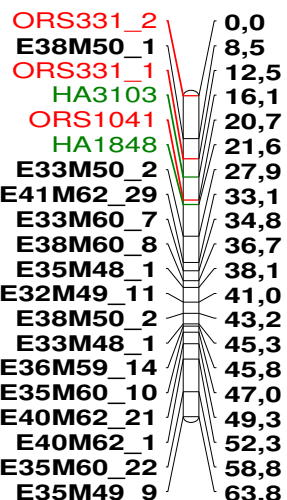
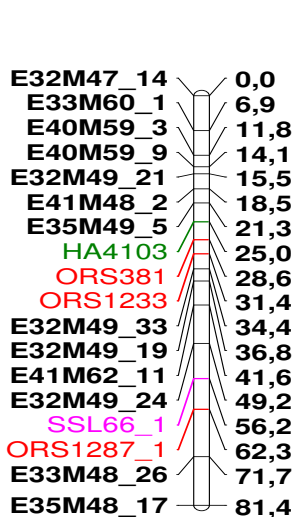
•495 marqueurs

•Densité 3.7 cM

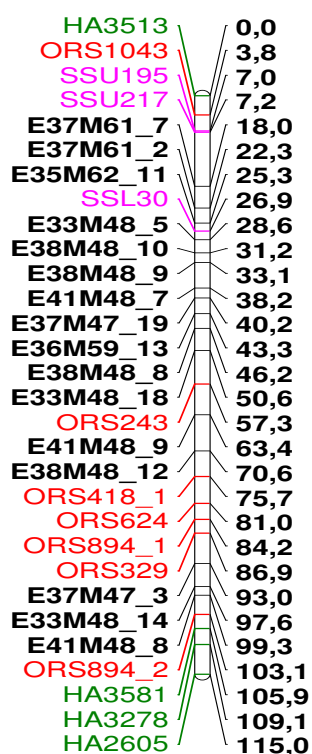
Carte Réf: 456 marqueurs

Carte Réf: 3.1 cM

GL6

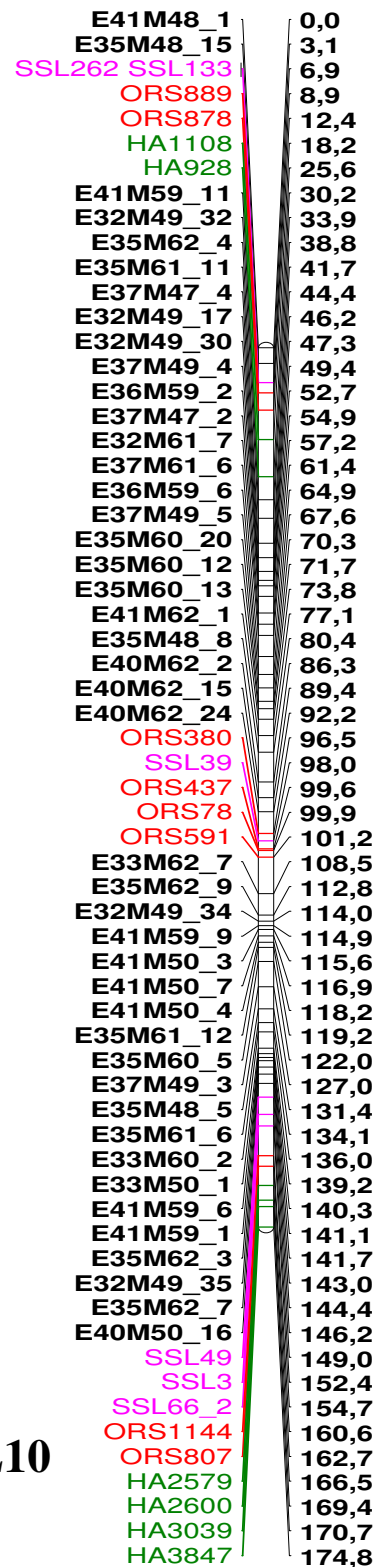
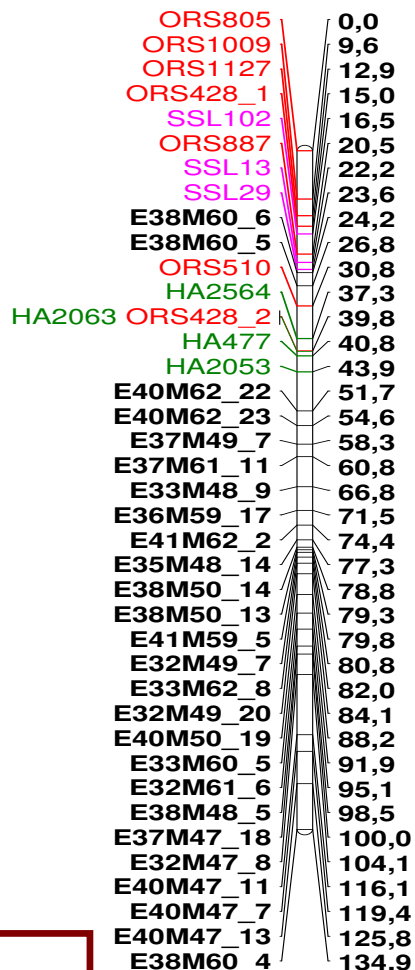


GL7

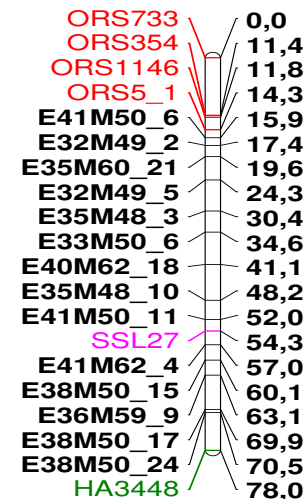


GL8

GL9



GL11



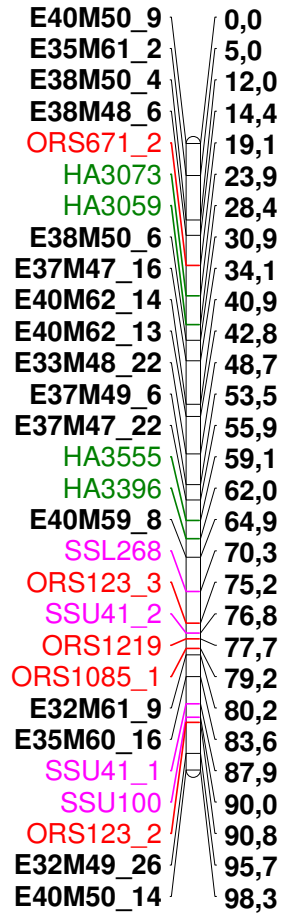
GL10

‘ORS’: OSU-USA

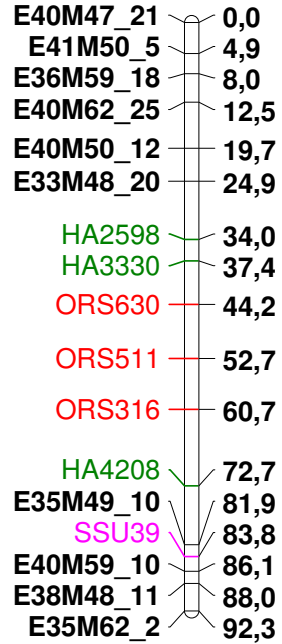
SSRs utilisés: ‘HA’: INTA-Argentine

‘SSL’ et ‘SSU’: Catisol-France

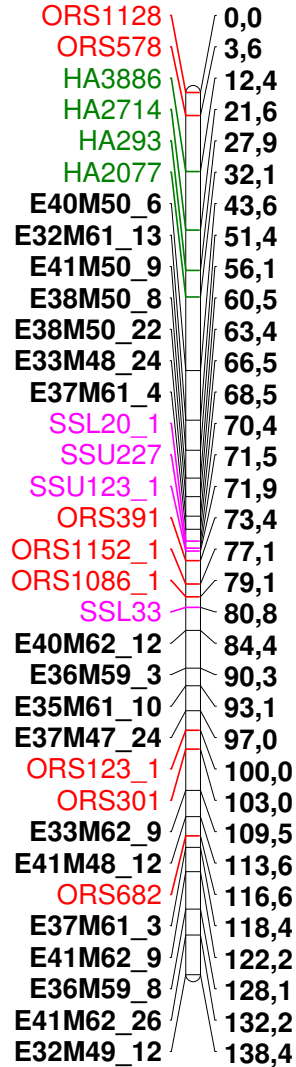
GL12



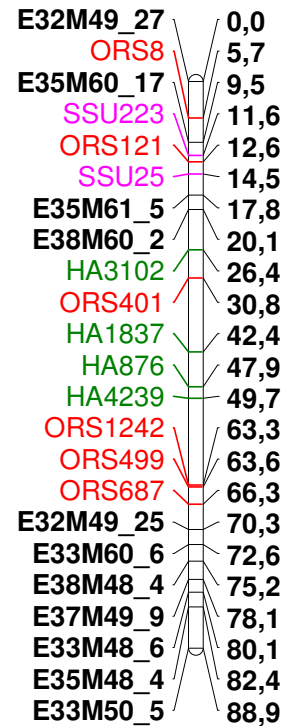
GL13



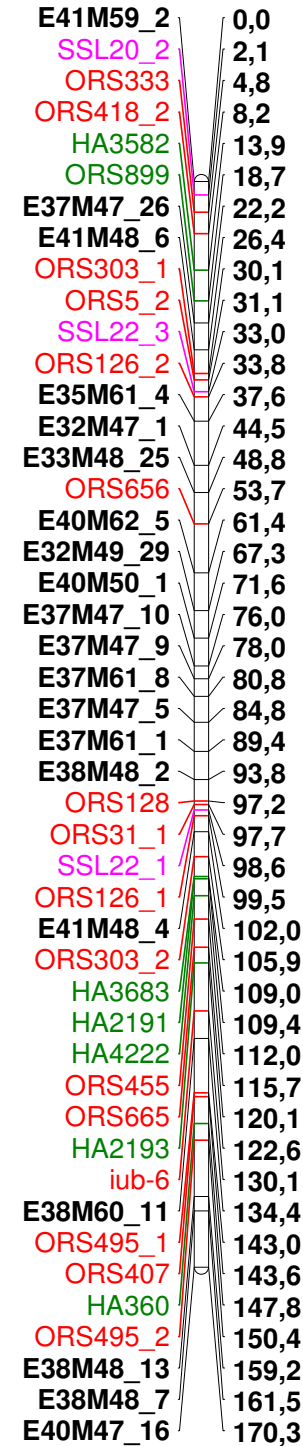
GL14



GL15



GL16



GL17

