

## La composition isotopique du carbone, critère intégrateur du fonctionnement photosynthétique : application à l'amélioration génétique du blé dur en conditions méditerranéennes

Othmane Merah, Philippe Monneveux, Miloudi Nachit, Éliane Deléens

Le blé dur est une culture traditionnelle du pourtour méditerranéen : la Turquie, la Syrie, la Grèce, l'Italie, l'Espagne, et les pays d'Afrique du Nord sont parmi les principaux producteurs [1]. Exclusivement destinée à l'alimentation humaine, cette céréale est consommée sous différentes formes : couscous, pâtes alimentaires, formes concassées (Burgul, Friké), pain, pâtisseries. L'augmentation de sa production est largement dépendante du progrès génétique et de l'utilisation de variétés améliorées à haut potentiel de rendement. Toutefois, les conditions climatiques limitantes des pays méditerranéens restreignent considérablement le développement de telles variétés au profit de populations locales, bien adaptées aux

conditions les plus difficiles, mais qui ont un rendement potentiel faible et qui ne permettent pas de pourvoir à la totalité des besoins alimentaires locaux. L'enjeu pour le sélectionneur est donc d'associer un haut rendement potentiel et un niveau élevé de tolérance à la sécheresse [2, 3]. Ceci passe tout d'abord par une meilleure connaissance des ressources génétiques disponibles au sein de l'espèce (et en particulier par une meilleure description de leur adaptation à la limitation hydrique) ainsi que par un élargissement de la base génétique du matériel en sélection. Paradoxalement, le grand nombre de formes présentes dans les collections constitue un obstacle majeur à leur exploitation en sélection [4] : la conservation d'un trop grand nombre de ressources génétiques locales, souvent redondantes, diminue en effet l'efficacité des banques de gènes [5]. C'est pour pallier cet inconvénient qu'a été développé le concept de « collection de référence » (*core collection*) [6, 7] : il s'agit d'un échantillon de la collection entière, qui présente la plus grande part possible de la diversité existante. L'ICARDA (International Center for Agricultural Research in Dry Areas) a mis en place depuis 1989 une collection de référence pour le blé dur (*Durum Wheat Core Collection*, DWCC), rassemblant 144 accessions

représentant 70 à 80 % de la variabilité génétique du blé dur [8], qui sert de base à des études d'adaptation aux facteurs de l'environnement.

La tolérance à la sécheresse d'une plante cultivée est le résultat de l'expression de nombreux caractères d'adaptation dont l'efficacité d'utilisation de l'eau (EUE). Ce caractère peut être défini de plusieurs façons :

- en intégratif, comme la capacité de la plante à produire une quantité importante de biomasse en présence d'une quantité d'eau limitée ; la mesure, destructive, est très longue et onéreuse, et difficile à effectuer sur un grand nombre de génotypes ; ce caractère a jusqu'ici été peu utilisé dans les programmes de sélection ;
- en instantané, comme le rapport du  $\text{CO}_2$  assimilé à l'eau transpirée. Étant mesuré sur des feuilles dans les circuits d'échanges gazeux photosynthétiques, il n'est pas à même de caractériser le comportement moyen de la plante sur l'ensemble du cycle ; de plus, les mesures ne peuvent être faites simultanément sur un grand effectif de plantes.

L'emploi de la composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) et de la discrimination isotopique du carbone ( $\Delta$ ) proposé en 1984 par Farquhar et Richards [9] comme indicateur de l'efficacité d'utilisation de l'eau s'est beaucoup développé. L'analyse isotopique

O. Merah, É. Deléens : Laboratoire structure et métabolisme des plantes, UMR 569 CNRS, Institut de biotechnologie des plantes, 91405 Orsay, France.  
M. Nachit : International Center for Agricultural Research in Dry Areas, CIMMYT/ICARDA Durum Wheat Program, PO Box 5466, Aleppo, Syria.  
P. Monneveux : UFR génétique et amélioration des plantes, ENSA-INRA, 2, place Viala, 34060 Montpellier cedex 01, France.

Tirés à part : O. Merah

porte directement sur le carbone photosynthétique accumulé par la plante, c'est-à-dire sur la biomasse. Le critère est précis, fiable, tout en étant intégratif. La facilité de la prise d'échantillons pour les analyses permet d'établir des comparaisons pour un grand nombre de plantes simultanément.

Le but du présent article est d'exposer les bases théoriques de la discrimination isotopique liée à la photosynthèse, puis d'illustrer l'utilisation possible en sélection du critère « composition isotopique de la plante » à l'aide de résultats obtenus avec la DWCC mise en place par l'ICARDA. Nous décri-

rons plus spécialement deux accessions, une variété améliorée de l'ICARDA (Cham1) et une population locale tunisienne (Jennah Khetifa). Ces deux accessions ont été choisies comme parents d'une descendance en ségrégation. Celle-ci sert actuellement à l'élaboration d'une carte génétique et à la recherche de marqueurs liés à la composition isotopique du carbone ( $\delta^{13}C$ ) et à divers caractères agronomiques, dans le cadre du réseau international SEWANA (*Durum Wheat in South of Europe, West Asia and North Africa*). Les caractéristiques morphologiques, phénologiques et agrono-

miques de ces deux accessions sont très différentes (*encadré 1, photo 1*); elles présentent des comportements distincts en matière d'ajustement osmotique et fonctionnement photosynthétique [10, 11].

Les essais ont eu lieu à Montpellier (France) où les précipitations annuelles sont suffisamment variables pour permettre de tester des comportements dans une large gamme de conditions de disponibilité en eau; ils ont été répétés sur trois ans.

#### Encadré 1

### Exemples de variétés améliorées et de populations locales

Cham1 est une variété améliorée de blé dur sélectionnée à l'ICARDA. Elle connaît maintenant une large diffusion sur le pourtour méditerranéen et est cultivée en Algérie, sous le nom de Waha (l'oasis). Il s'agit d'une variété à paille courte, très précoce, à indice de récolte élevé et à tallage fertile élevé. Ses feuilles, étroites et dressées à l'anthesis (*photo 1A*, à gauche), peuvent être couvertes de cires en conditions de déficit hydrique sévère. Elle présente des épis courts, compacts, blancs, et des barbes courtes prenant une couleur noirâtre à maturité (*photo 1A*, à droite). Soumise à un déficit hydrique, cette variété présente un fort ajustement osmotique (lors d'une réduction du potentiel hydrique foliaire, la turgescence cellulaire est maintenue grâce à une réduction du potentiel osmotique due à une accumulation de solutés) [10, 11].

Jennah Khetifa est une population locale tunisienne. Elle est tardive, à paille haute, à tallage faible. À l'anthesis, elle présente des feuilles larges et assez fines (*photo 1B*, à gauche). Ses épis, roux (*photo 1B*, à droite), sont longs et semi-compacts. Son grain est plus petit que celui de Cham1. Les barbes, longues, restent rousses à maturité. Soumise à un déficit hydrique, cette variété présente un faible ajustement osmotique [10, 11].

#### Examples of improved varieties and landraces



**Photo 1.** Caractéristiques morphologiques des deux variétés de blé dur Cham1 et Jennah Khetifa.

**A :** Épis de Cham1. À gauche, à la floraison, les épis ont des barbes évasées et sont dans une même strate en raison de la grande uniformité de hauteur des talles. À droite : aspect des épis à maturité.

**B :** Jennah Khetifa, à la floraison (à gauche), se caractérise par des épis aux barbes parallèles, répartis dans différentes strates de la culture en raison de l'importante gamme de hauteur des talles. À maturité (à droite), Jennah Khetifa se caractérise par ses épis longs, recourbés sous le poids de ses grains roux.

**Photo 1.** Morphological characteristics of the two durum wheat varieties presented in the study, Cham1 and Jennah Khetifa.

**A :** Spikes of Cham1. At flowering (left), the spikes present open outer awns and are localised in the same stratum, due to the uniformity of tillers height. Aspect of the spikes at maturity (right).

**B :** Jennah Khetifa, at flowering (left) is characterised by parallel awned spikes, distributed in different stratum of the crop, due to the important variation of tillers height. At maturity (right), Jennah Khetifa is characterised by long spikes, curved by the weight of its red grains.

## Tableau

### Principales caractéristiques morphologiques et phénologiques des variétés de blé dur Cham1 et Jennah Khetifa (expérimentations conduites à l'ENSA-INRA Montpellier, France)

Accession	Précocité à l'épiaison (jours)	Poids de mille grains (g)	Nombre de grains par épi	Nombre de talles par plante	Hauteur de la plante (cm)	Indice de récolte
Cham1	122	55,63	30,5	5	85	0,36
Jennah Khetifa	140	49,75	41,75	3	132,8	0,28

Main morphological and phenological characters of the varieties Cham1 and Jennah Khetifa of durum wheat (data from the experiments at ENSA-INRA Montpellier, France)

## Bases théoriques de la méthode isotopique : la composition isotopique, critère intégrateur du fonctionnement stomatique

Depuis la mise en évidence du rôle primordial du type photosynthétique sur la composition isotopique naturelle des végétaux [12, 13], des progrès successifs dans la compréhension des phénomènes fondamentaux impliqués ont permis de proposer des modèles mathématiques expliquant la discrimination isotopique du carbone, notée  $\Delta$  (encadré 2). Ces modèles ont été publiés au début des années 80 [14-16]. L'intérêt grandissant du critère isotopique en sélection est la conséquence d'une publication de Farquhar et Richards [9] montrant que « les plantes de type  $C_3$  économes en eau sont riches en  $^{13}C$  ». Les bases théoriques de cette relation ont été reprises et illustrées d'exemples dans différentes revues [17-21]. De nombreuses plantes de grande culture ont été étudiées (haricot, orge, soja, tournesol...) et la relation entre efficacité d'utilisation de l'eau élevée et richesse en  $^{13}C$  ne s'est jamais trouvée démentie, quelle que soit l'échelle de temps considérée. Différentes grandeurs sont données dans l'encadré 2.

La photosynthèse est un processus physico-chimique qui entraîne le carbone du  $CO_2$  atmosphérique ( $\delta a = -8 \times 10^{-3}$  ou  $-8 \text{ ‰}$ ), dans une relation covalente avec

un autre carbone dans les photosynthétats ( $\delta p$  compris entre  $-21$  et  $-35 \text{ ‰}$ ) [13]. Différents facteurs agissent sur la valeur de la discrimination isotopique de la photosynthèse. Il s'agit tout d'abord de la concentration et de la disponibilité du  $CO_2$  de l'atmosphère entourant les plantes, ainsi que de la contrainte liée à sa diffusion de l'extérieur vers l'intérieur des tissus (couche limite, passage à travers les stomates, circulation dans les méats et dissolution dans les milieux cellulaires). Il existe, de plus, un particularisme des réactions enzymatiques vis-à-vis de la discrimina-

Encadré 2

### La discrimination isotopique du carbone

Les éléments chimiques existent sous différentes formes isotopiques stables, possédant un même nombre de protons, un même nombre d'électrons mais un nombre différent de neutrons. Ainsi, les éléments primordiaux en biologie, azote, carbone, hydrogène, oxygène, et soufre existent sous une forme dite légère (nombre de protons = nombre de neutrons) et une forme lourde (nombre de neutrons > nombre de protons). La proportion des isotopes lourds par rapport à la totalité de l'élément peut dépasser 1 % (ex. :  $^{13}C/(^{13}C + ^{12}C) = 1,11 \text{ ‰}$ ). L'accroissement de masse de la molécule comportant un isotope lourd lui confère des propriétés physiques et chimiques particulières. Ainsi, le  $CO_2$  de masse 45 ( $^{13}C^{16}O_2$ ) a des propriétés physiques (densité, diffusion en milieu gazeux ou liquide) et chimiques (vitesse de réaction et constante d'équilibre) différentes de celles du  $CO_2$  de masse 44 ( $^{12}C^{16}O_2$ ). Ces deux molécules se répartissent sélectivement au cours d'une transformation : ce phénomène est appelé effet isotopique par les chimistes, fractionnement isotopique par les géochimistes et souvent discrimination isotopique ( $\Delta$ ) par les physiologistes. La modification de composition isotopique du produit de la transformation est de faible grandeur, mais cette différence est reproductible et obéit aux lois physico-chimiques. La précision des spectromètres de masse isotopique qui mesurent la proportion de l'isotope lourd jusqu'à  $10^{-6}$  (quatrième décimale du pour-cent) permet de quantifier cette grandeur. Ce fractionnement se définit comme suit :

$$\Delta (\text{‰}) = \frac{(\delta a - \delta p)}{1\,000 + \delta p} \times 1\,000$$

avec  $\delta a$  = composition isotopique du substrat et  $\delta p$  = composition isotopique du produit de la transformation.

Comme  $\delta p$  est très petit par rapport à 1 000, une forme simplifiée de l'équation ( $= \delta^{13}C - \delta p$ ) est parfois utilisée. La composition isotopique  $\delta$  est une différence relative entre le rapport isotopique de l'échantillon ( $R = ^{13}C/^{12}C$ ) et un standard international ( $R_s$ ). Elle est, pour des raisons de commodité, exprimée en ‰.

Dans le cas du carbone, le standard est le Pee Dee Belemnite (PDB), fossile choisi lors de l'initiation de ce type de mesure [22]. Il est plus riche en  $^{13}C$  que la matière organique naturelle. C'est pourquoi les  $\delta^{13}C(\text{‰})$  usuellement rencontrés sont négatifs et d'autant plus négatifs que l'échantillon est pauvre en  $^{13}C$ . La composition isotopique se mesure sur la matière organique, après sa combustion totale, dans un analyseur élémentaire par spectrométrie de masse isotopique. La détermination du  $\delta^{13}C(\text{‰})$  est reproductible à 0,1 ‰. Les détails techniques sont décrits dans Deléens *et al.* [23, 24].

### Carbon isotope discrimination

tion : la RuBisCO, enzyme de carboxylation primaire des végétaux C<sub>3</sub>, rejette fortement le <sup>13</sup>C, alors que la PEPCase, enzyme de carboxylation primaire des végétaux C<sub>4</sub> le rejette faiblement [25]. Enfin, la valeur finale du fractionnement isotopique dépend du degré relatif de limitation des deux étapes successives de la photosynthèse, diffusion et carboxylation. C'est cette dernière propriété qui permet de classer les plantes en fonction du degré de limitation de leur fonctionnement photosynthétique. En effet, le fractionnement isotopique global de la photosynthèse n'est pas la simple addition des fractionnements isotopiques intrinsèques à la diffusion (a) et à la carboxylation (b<sub>R</sub>) mais va dépendre aussi des vitesses relatives des deux étapes. Si la diffusion est limitante, elle ne permet pas à la carboxylation d'exercer son fractionnement isotopique intrinsèque à son maximum : à la limite, elle utilise la totalité du substrat apporté par diffusion et le restituera donc dans son état isotopique initial. À l'inverse, si la carboxylation est limitante, elle manifeste son fractionnement avec intensité. L'étape limitante imprime donc son fractionnement isotopique avec d'autant plus d'intensité que la limitation est marquée (encadré 3).

Les plantes fixant le plus de carbone par unité d'eau transpirée ont une concentration interne de CO<sub>2</sub> faible, une valeur de Δ faible et une composition isotopique riche δ en <sup>13</sup>C (peu négative). La baisse de Pi peut être obtenue par une fermeture des stomates, ou par une carboxylation plus active pour un même degré d'ouverture. Pour une même valeur de Pi (et donc une même composition isotopique), on peut avoir une baisse de biomasse par limitation de l'entrée du CO<sub>2</sub> (cas du blé) ou une augmentation de biomasse par l'assimilation d'un plus grand flux (cas du tournesol). La validation du modèle à divers niveaux d'accumulation des produits de la photosynthèse peut être effectuée selon différentes durées d'intégration du critère Pi/Pa [20, 21]. La composition isotopique peut être analysée dans le flux de CO<sub>2</sub> entrant et sortant de la feuille dans les circuits d'échange gazeux, dans les glucides solubles accumulés dans une photopériode, ou enfin dans la biomasse de la feuille ou de la plante, lorsque l'on souhaite intégrer ce critère sur des temps plus longs. Un écart de composition isotopique entre deux plantes de

### Encadré 3

## Les plantes économes en eau sont riches en <sup>13</sup>C

L'expression la plus courante du fractionnement isotopique global (Δ) de la photosynthèse C<sub>3</sub> est :

$$\Delta = a + \text{Pi}/\text{Pa} (b_R - a).$$

Le fractionnement isotopique à la diffusion est de 4,4 %, et celui de la carboxylation est de 30 % [26]. Ce modèle a été complété ultérieurement en décomposant plus finement l'étape de carboxylation [27].

Ainsi, le fractionnement isotopique de la photosynthèse dépend de facteurs isotopiques constants (fractionnements isotopiques intrinsèques, a et b<sub>R</sub>) et d'un facteur physiologique primordial, à savoir le rapport de la pression partielle du CO<sub>2</sub> à l'intérieur des tissus (Pi) à celle du CO<sub>2</sub> à l'extérieur (Pa). Le rapport Pi/Pa dépend de l'importance relative de la diffusion qui fait augmenter la réserve interne de CO<sub>2</sub> vis-à-vis de la carboxylation, qui épuise cette réserve. Le contenu en <sup>13</sup>C des photosynthétats est donc un enregistrement continu de la concentration interne du CO<sub>2</sub> dans la feuille : une feuille riche en <sup>13</sup>C est caractérisée par une faible pression partielle Pi, une feuille pauvre en <sup>13</sup>C par une pression partielle Pi élevée. Farquhar et Richards [9] ont cherché à lier le modèle isotopique et le modèle décrivant l'efficacité d'utilisation de l'eau, tous deux articulés autour de la variable Pi/Pa. Le rapport du taux d'assimilation du CO<sub>2</sub> (A) et du taux de transpiration à travers les stomates (E) ou l'efficacité d'utilisation de l'eau ou *water use efficiency* WUE (A/E) est donnée à l'échelle foliaire instantanée par la relation :

$$\text{WUE} = \frac{\text{Pa} (1 - \text{Pi}/\text{Pa})}{(\text{Wi}/\text{Wa})(b - a)}$$

W = Wi - Wa étant les différences de pressions partielles en vapeur d'eau à l'intérieur et à l'extérieur des tissus. En combinant les équations des deux modèles, on obtient :

$$\text{WUE} = \frac{A}{E} = \frac{C}{1,6 W} \frac{(b - \Delta)}{(b - a)}$$

Cette équation a été modifiée pour tenir compte de différents niveaux d'intégration dans le temps, pour la plante entière et pour le couvert. Les méthodes de raisonnement sont résumées par Guehl *et al.* [28]. L'équation présentée permet de voir que, lorsque la valeur de δ<sup>13</sup>C est très négative (pauvre en <sup>13</sup>C), sa discrimination sera forte, et WUE tendra vers zéro : la plante a alors une faible efficacité d'utilisation de l'eau. Au contraire, lorsqu'une plante a une valeur de δ<sup>13</sup>C peu négative (riche en <sup>13</sup>C), sa discrimination Δ est faible, et WUE tend vers sa limite supérieure Pa/1,6 (Wi-Wa) (b-a) : elle aura alors une forte efficacité d'utilisation de l'eau.

### Plants saving water are rich in <sup>13</sup>C

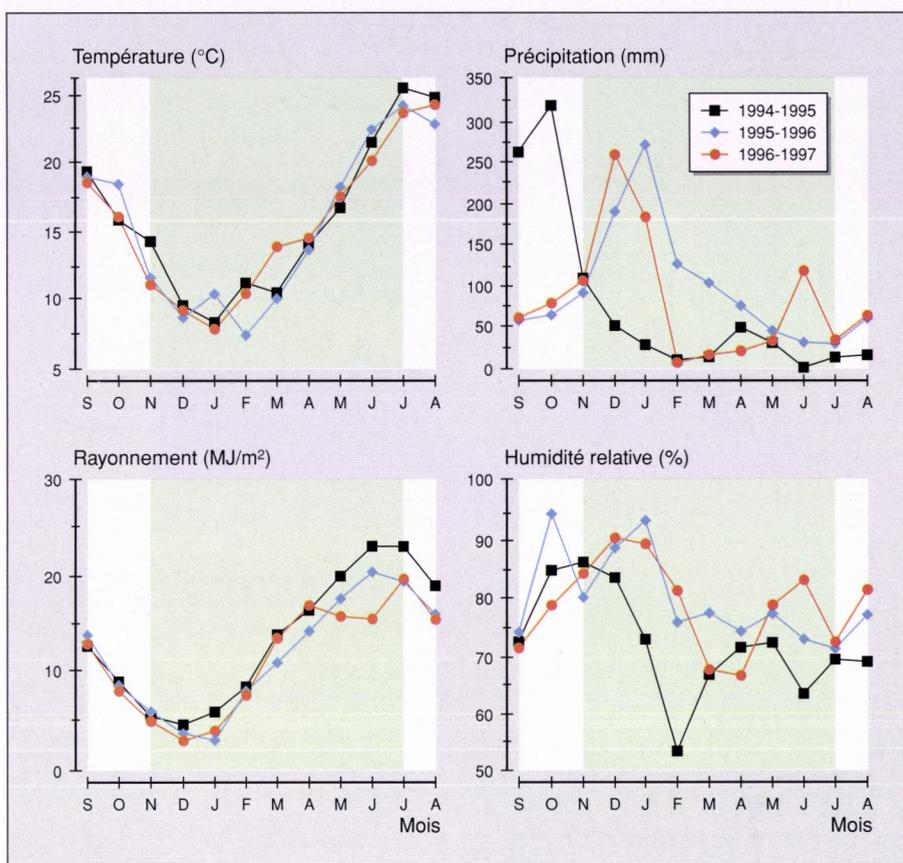
0,3 %, différence à partir de laquelle on considère que les valeurs de biomasse de plantes sont distinctes, représente approximativement une différence de Pi de 5 à 10 ppm. Celle-ci est faible si elle existe durant un temps court ; en revanche si elle est maintenue en moyenne pendant la durée de vie de la plante, elle peut constituer un bon critère pour la sélection. Le blé a été étudié à différents niveaux d'organisation, depuis la feuille jusqu'au champ [29, 30]. Les gammes de réponse ont été établies pour différentes espèces C<sub>3</sub> et

en différents lieux [31-34]. De telles études ont permis la sélection de géniteurs pour les programmes de croisement [35-39]. Les gammes de variations du δ<sup>13</sup>C des plantes pour un même génotype selon les lieux ou pour différents génotypes en un même lieu sont généralement de 4 ‰. Le climat (humidité relative, température, pluviométrie), par son action sur l'ouverture stomatique, est une source importante de variation des valeurs de composition isotopique et d'efficacité d'utilisation de l'eau.

## Effets des facteurs climatiques sur la composition isotopique

Le climat méditerranéen est caractérisé par une pluviométrie moyenne annuelle allant de 200 à 800 mm selon les années et l'altitude, avec un nombre de jours de pluie généralement inférieur à 100. Il pleut principalement en saison froide et les intensités de pluie sont alors fortes. L'amplitude thermique est élevée et les vents sont souvent violents [40, 41]. Ces conditions climatiques, qui présentent par ailleurs de grandes variations inter-annuelles, sont très contraignantes et les rendements en blé varient généralement entre 7 et 15 quintaux par hectare. En Italie (premier producteur européen), les rendements présentent un fort gradient nord-sud, allant en moyenne de 49 qx/ha au nord, à 32 qx/ha au centre pour descendre à 19 qx/ha au sud [42].

Le site expérimental de l'ENSA-INRA Montpellier est situé en climat méditerranéen tempéré. Au cours de trois années successives (1994-1995-1997), la somme des précipitations entre novembre et juin s'est échelonnée entre 285 à 932 mm, ce qui a permis de tester les accessions de blé dur, menées en conditions pluviales, dans une large gamme de conditions hydriques. L'expérimentation, conduite sur sol sablo-limoneux, est constituée de microparcelles de quatre lignes de 1,5 m de long espacées de 0,25 cm. Deux répétitions ont été effectuées par génotype. Les variables climatiques (température, rayonnement, humidité relative et précipitations) des trois campagnes successives sont données par la *figure 1*. La campagne 1994-1995 a été caractérisée par une sécheresse très marquée durant tout le cycle (285 mm entre novembre et juin) ainsi que par des températures et un rayonnement élevés à partir d'avril. Les deux autres campagnes présentent des conditions climatiques voisines (maximum de précipitations en décembre et janvier, et faibles variations d'humidité relative) ; la pluviométrie est cependant plus élevée en 1996 (932 mm, les pluies s'étant maintenues jusqu'à mai), qu'en 1997 (743 mm). Les représentations ombrothermiques permettent de repérer les périodes de contrainte hydrique et de les situer par rapport aux stades de déve-



**Figure 1.** Conditions climatiques des cultures du blé au cours des trois années successives d'expérimentation (1994/1995, 1995/1996 et 1996/1997). Le cycle de développement est matérialisé par la zone en vert.

**Figure 1.** Climatic conditions of wheat cultures during the three successive years of the study (1994/1995, 1995/1996 and 1996/1997).

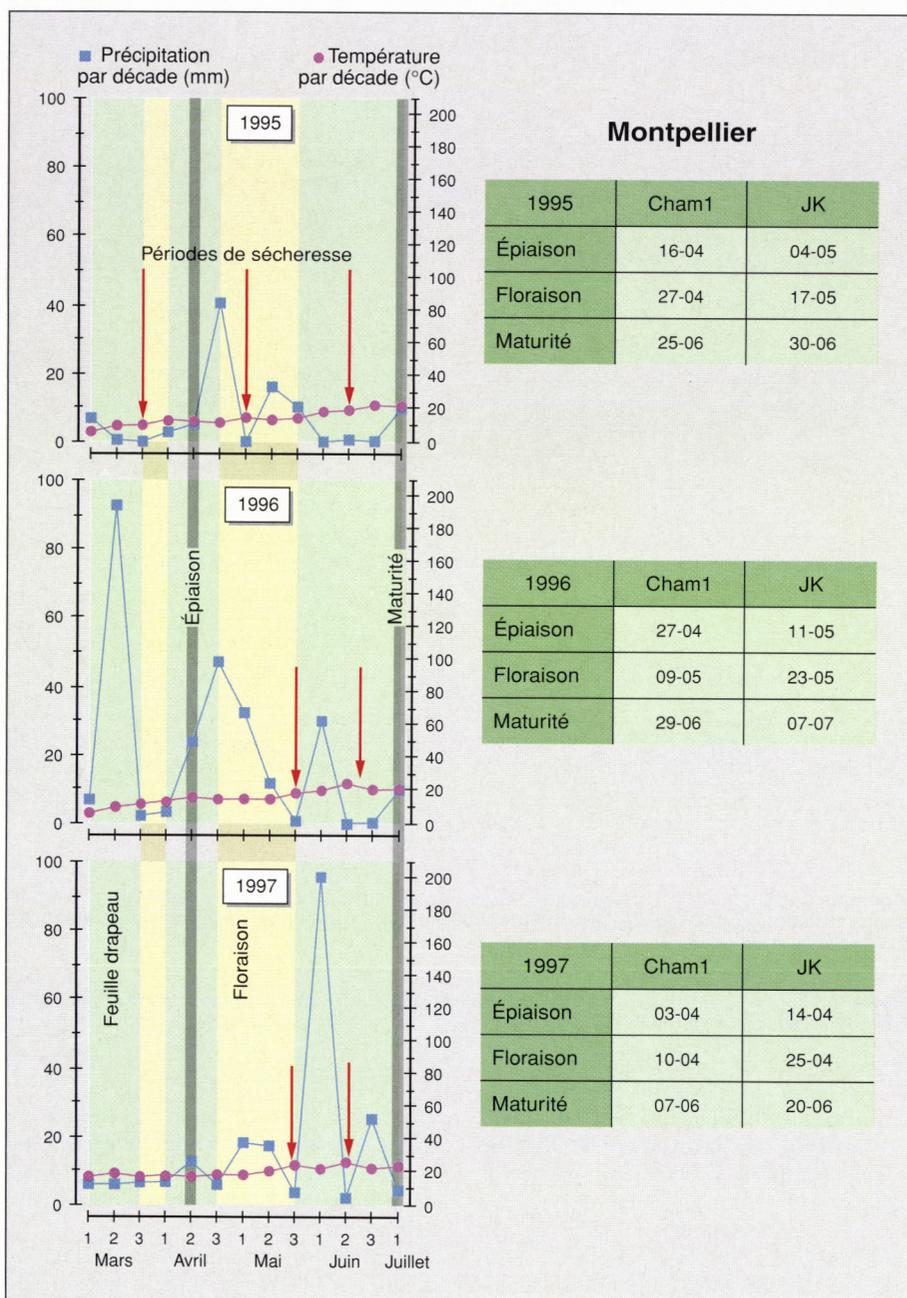
loppement du blé (*figure 2*, gauche). L'apparition de la dernière feuille (ou feuille « drapeau ») a été accompagnée de conditions hydriques limitantes en 1995 et à un degré moindre en 1997 et non limitantes en 1996. La période de remplissage s'est déroulée en conditions limitantes en 1995.

Les dates d'apparition des stades phénologiques des variétés testées sont modifiées selon le climat de l'année ; ces modifications peuvent différer considérablement entre génotypes. C'est en particulier le cas en ce qui concerne les variétés Cham1 et Jennah Khetifa (*figure 2*, droite) : la variété améliorée Cham1 présente une grande plasticité de réponse pour la date d'épiaison (écart d'un mois environ), ainsi que pour les dates des stades post-épiation ; chez la population locale Jennah Khetifa, la plasticité de la réponse n'est observée que pour les stades post-épiation. L'absence de plasti-

cité phénologique de la variété Jennah Khetifa traduit un comportement général des populations locales, dont l'adaptation est assez strictement restreinte à leur aire d'origine.

Les compositions isotopiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ) des feuilles récoltées au stade floraison, sur les deux lignes centrales des 144 génotypes de la DWCC, varient en moyenne (sur 3 ans) entre  $-24$  et  $-29$  ‰ ; la différence la plus marquée entre valeurs minimum et maximum est observée pour l'année 1997 (*figure 3*). Les compositions isotopiques des grains sont comprises entre  $-22$  et  $-28$  ‰, la variation la plus importante (4 ‰) étant observée en 1995. Les valeurs de composition isotopique des grains varient peu entre accessions et entre années.

Les différences de composition isotopique foliaires sont faibles entre Cham1 et Jennah Khetifa ; les variations interannuelles de ces valeurs sont toutefois plus marquées



**Figure 2.** Diagramme ombrothermique des trois années successives d'expérimentation (1994/1995, 1995/1996 et 1996/1997) (à gauche) et stades phénologiques de Cham1 et de Jennah Khetifa (JK) (à droite).

**Figure 2.** Ombrothermic diagram of the 3 successive years of the study (1994/1995, 1995/1996 and 1996/1997) (left), and phenologic stages of the two accessions (right).

chez Jennah Khetifa (figure 4, gauche). La composition isotopique des feuilles apparaît très dépendante des conditions climatiques qui ont prévalu durant leur développement. On note une étroite corrélation entre les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  des feuilles drapeaux des deux accessions, et les pluviométries cumulées entre le 10 mars et le 20 mai, période au cours de laquelle a

été accumulé le carbone des structures permanentes des feuilles (alors qu'aucune corrélation n'est notée lorsque l'on considère la pluviométrie cumulée pendant toute la durée du cycle). La variété locale Jennah Khetifa modifie fortement sa composition isotopique en fonction des précipitations cumulées, alors que la variété améliorée Cham1 présente une plus grande stabilité

des valeurs (figure 4, gauche). L'étude de la répartition des stomates sur la surface supérieure de la feuille drapeau durant l'année 1995 montre (photo 2) que Cham1 présente une densité de stomates plus faible (97 stomates/mm<sup>2</sup>) que Jennah Khetifa (142 stomates/mm<sup>2</sup>). Or Cham1, d'après les valeurs de composition isotopique de 1995, a une limitation stomatique plus faible que celle de Jennah Khetifa ; ces résultats montrent donc que la densité stomatique ne règle pas seule le flux de CO<sub>2</sub> entrant et de vapeur d'eau sortant, et conduisent à postuler que le mode de régulation stomatique est déterminant sur ces flux. Nous remarquons qu'à la plus grande densité stomatique correspond la plus grande réponse aux variations de la disponibilité en eau.

Les compositions isotopiques des grains sont étroitement corrélées à la pluviométrie cumulée entre janvier et juin, période au cours de laquelle l'activité photosynthétique est à son maximum. On ne note pas de différence entre les deux accessions Cham1 et Jennah Khetifa ; la régression entre composition isotopique et pluviométrie cumulée au cours du cycle présente la même pente pour ces deux génotypes. Ces pentes se trouvent sensiblement voisines pour l'ensemble des accessions (figure 4, droite). Les  $\delta^{13}\text{C}$  des grains sont assez voisins de ceux des feuilles pour les deux campagnes présentant de fortes limitations en eau (1995 et 1997). Par contre, la composition isotopique des grains est très enrichie en <sup>13</sup>C par rapport à celle des feuilles dans la situation non limitante de 1996. Or, il est généralement admis que la photosynthèse postfloraison de la feuille drapeau alimente le remplissage des grains ; les différences de composition isotopique entre feuilles et grains peuvent donc s'expliquer par le fait que :

- la feuille synthétise des glucides exportables qui auront la composition isotopique dépendant du climat postfloraison, alors que ses structures en place répondent aux conditions climatiques préfloraison ;
  - le grain accumule des carbones provenant non seulement des feuilles, mais aussi d'autres organes sources, tels que les tiges, les parties vertes de l'épi et notamment, les barbes [20, 21, 43, 44].
- Lors d'une limitation en eau, les feuilles, puis la tige se dessèchent les premières, les différentes parties de l'épi restent actives plus longtemps. La composition isotopique des feuilles va donc apporter une information sur la photosynthèse préfloraison alors que la composition isotopique des grains va

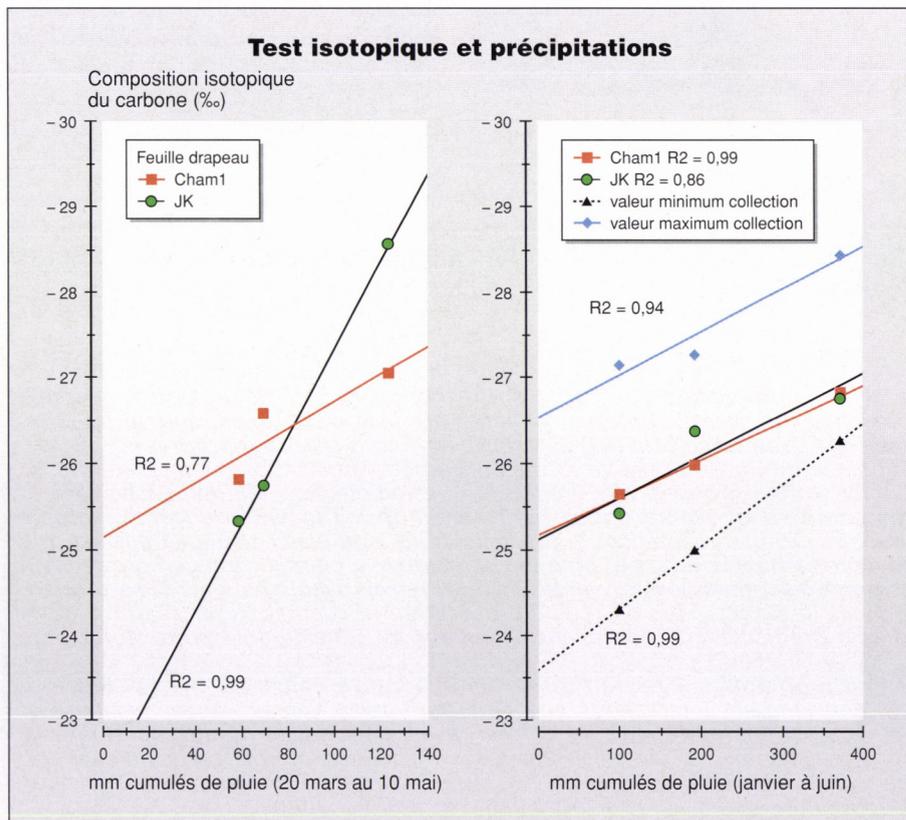
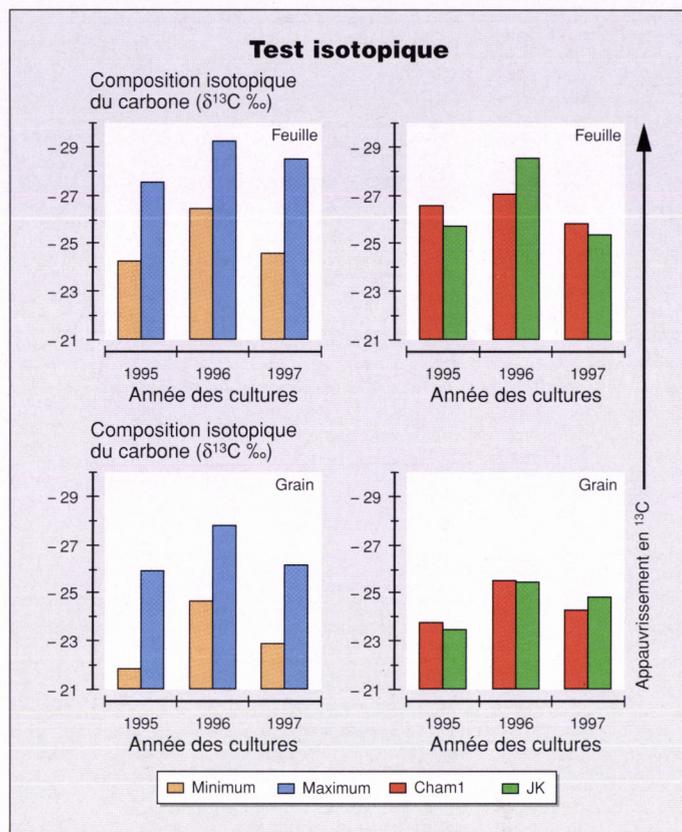
donner une valeur très intégrative révélant le comportement photosynthétique de tous les organes participant au remplissage. Des expériences actuellement en cours, comportant la mise à l'obscurité ou l'excision de différents organes verts à floraison, devraient permettre de préciser l'importance relative de chacun de ces organes dans le remplissage. Un « test isotopique », fondé sur la composition isotopique des feuilles et autres organes verts importants pour le remplissage du grain (tels que glumes et barbes), devrait à terme rendre possible une sélection de plantes pour leur efficacité d'utilisation de l'eau.

## Composition isotopique, analyses génétiques et marquage moléculaire

La composition isotopique des feuilles et des grains présente, comme nous venons

**Figure 3.** Variation interannuelle de la composition isotopique des feuilles (en haut) et des grains (en bas). À gauche, compositions isotopiques minimales et maximales au sein de la DWCC (*Durum Wheat Core Collection* de l'ICARDA). À droite, compositions isotopiques de Cham1 (variété améliorée de l'ICARDA) et de la population locale tunisienne Jennah Khetifa (JK).

**Figure 3.** Interannual variations in leaf (at the top) and kernel (at the bottom) carbon isotope compositions.



**Figure 4.** Corrélations entre les compositions isotopiques des feuilles ou des grains et les précipitations au cours de différentes phases du développement.

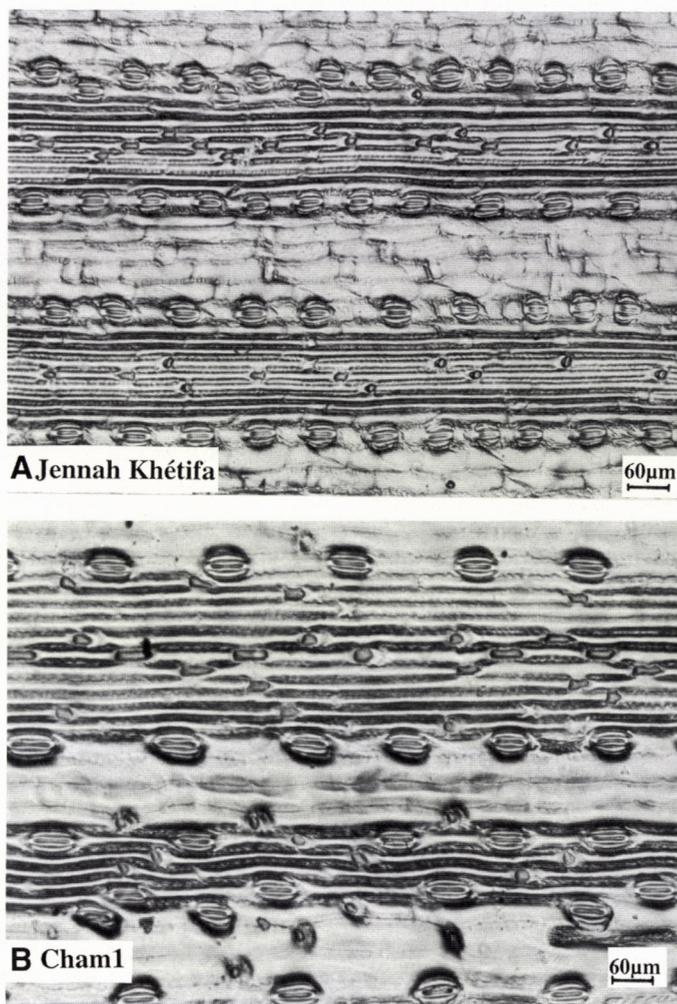
À gauche, corrélations entre les compositions isotopiques des feuilles drapeaux et les précipitations cumulées reçues par les plantes du 20 mars au 10 mai, période de développement des feuilles de Cham1 et Jennah Khetifa (JK).

À droite, corrélations entre les compositions isotopiques des grains et les précipitations cumulées reçues par les plantes de janvier à juin, pour Cham1 et Jennah Khetifa (JK) ainsi que pour le minimum et le maximum des valeurs rencontrées dans la collection de référence (DWCC).

**Figure 4.** Correlations between leaf and kernel carbon isotope compositions and cumulated rainfall during different phases of the growth cycle.

**Photo 2.** Différence de densité stomatique foliaire des variétés de blé dur, Cham1 et Jennah Khetifa. Les deux génotypes ont le même nombre de rangées de stomates par mm<sup>2</sup>, mais Jennah Khetifa a une densité stomatique plus élevée (142 stomates/mm<sup>2</sup>) que Cham1 (97 stomates/mm<sup>2</sup>).

**Photo 2.** Difference of leaf stomatal density between the two durum wheat accessions, Cham1 and Jennah Khetifa. Both genotypes have the same number of stomata rows per mm<sup>2</sup>, but Jennah Khetifa have a higher stomatal density (142 stomata/mm<sup>2</sup>) than Cham1 (97 stomata/mm<sup>2</sup>).



de le voir, d'importantes variations au sein de l'espèce blé dur. Il est donc intéressant d'analyser ses relations avec d'autres critères morphophysologiques d'adaptation. Ces aspects, déjà abordés chez le blé tendre, le sont peu chez le blé dur [39]. Or, il est nécessaire, avant tout passage à une étude génétique ou moléculaire du caractère, d'analyser ces relations et d'approfondir ainsi la compréhension des stratégies d'utilisation de l'eau et de tolérance à la sécheresse de la plante. Une étude des relations entre la composition isotopique et divers caractères morphologiques (hauteur de la plante, largeur de la feuille drapeau, densité stomatique foliaire), phénologiques (date d'épiaison, de floraison et de maturation) et physiologiques (transpiration, ajustement osmotique...) doit donc être entreprise. Les rares études déjà réalisées dans ce domaine montrent d'ailleurs que la composition isotopique est étroitement liée à la précocité, à l'indice de récolte et à la vigueur précoce des plantes [11]. La connaissance de la participation des différents organes sources au remplissage des grains est, elle aussi, fondamentale, car elle devrait permettre de focaliser l'intérêt sur les organes véritablement pertinents pour le rendement en fonction des conditions du déficit hydrique terminal de la plante. Aucune étude n'a rassemblé tous ces critères dans une même expérimentation pour une

## Summary

### The carbon isotope composition, an integrative criterion of stomatal functioning: application to durum wheat improvement under Mediterranean conditions

O. Merah, P. Monneveux, M. Nachit, E. Deléens

*Improvement of drought tolerance in cereals is the main objective of breeders in Mediterranean areas, which is particularly true for durum wheat because of its importance as a food crop in these regions. Physiological adaptive traits to drought have been extensively described in cereals, but their genetics are less well known, and so far criteria related to these physiological traits have not been taken into serious consideration in breeding programs.*

*Water use efficiency (WUE), defined as biomass production relative to the consumed water ratio, is considered to be one of the most consistent drought tolerance traits. However, it is limited by the tediousness and expansiveness of obtaining direct measurements on high numbers of plants under field conditions. The emergence of isotopic methods has completely modified the situation. The mathematical formalism of CO<sub>2</sub> and water vapour transfers and of carbon isotope fractionation by photosynthesis has made it possible to characterize a plant, or a given organ, by a carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and isotope discrimination ( $\Delta$ ) value. This value represents its water use efficiency. There have also been substantial advances in recent years on the automatization of such analyses. Carbon isotope composition has thus been proposed as a predictive criterion of WUE and shows considerable promise for physiological and agronomic approaches.*

*The advantages of this criterion in breeding programs are related to: (1) its integrative value; (2) the existence of genetic variability; (3) the low genotype x environment interactions and high heritability values; (4) the easiness of sample preparation and automatization of isotopic analysis. However, further investigations are required on the physiological origin of carbon isotope composition variations and relationships with diverse morphophysiological and phenological traits related to drought tolerance, especially with regards to durum wheat. A program has also been initiated to study heritability of the trait and identify molecular markers related to trait variation.*

The aim of this paper is to briefly describe the theoretical basis of carbon isotope discrimination ( $\Delta$ ) related to photosynthesis. The possible use of this criterion in plant breeding is also illustrated by results obtained in ICARDA's durum wheat core collection (DWCC). Two accessions are described in more detail: an ICARDA improved variety (Cham1) and a Tunisian landrace (Jennah Khetifa), which differ in their morphological, phenological and agronomic traits (Box 1, Photo 1).

Since the discovery of the clear role of the photosynthetic pathway on natural carbon isotope discrimination [12, 13], there has been on-going progress in understanding the fundamental phenomena involved. This has led to the development of mathematical models explaining carbon isotope discrimination. These models were published at the beginning of the 1980s [14-16]. The increasing interest for  $\Delta$  in plant breeding is the consequence of a Farquhar and Richards paper [9] showing that plants with a high WUE are also enriched in  $^{13}\text{C}$  (Box 2).

It is well known that the photosynthesis process involves two separate steps: diffusion, or  $\text{CO}_2$  input through the stomata, and carboxylation. Both steps have their own intrinsic carbon isotope fractionations ( $a = 4.4\%$  for diffusion, and  $b_R = 30\%$  for carboxylation). The final carbon isotope fractionation ( $\Delta$ ) value depends on the relative limitation and speed of these two photosynthesis steps and is not the sum of both. The current expression of  $\Delta$  in  $\text{C}_3$  plant is  $\Delta = a + \text{Pi}/\text{Pa} (b_R - a)$  when  $\text{Pi}$  and  $\text{Pa}$  are internal and air pressure of  $\text{CO}_2$ , respectively.

Farquhar and Richards [9] related isotopic and WUE models, which both depend on the  $\text{Pi}/\text{Pa}$  variable. Several  $\Delta$  range variations have been observed in various  $\text{C}_3$  species under different conditions [31-34]. The climate (air relative humidity, temperature, rainfall) is an important source of variation due to its action on the stomatal aperture.

In this study, trials were carried out in the experimental field of the ENSA-INRA station at Montpellier (southern France) over 3 successive years (1995-1996-1997). This location is characterized by a temperate Mediterranean climate. During the 3 years, annual cumulated rainfall (from November to June) ranged from 285 mm (for 1995) to 932 mm (for 1996), which allowed us to test the DWCC (durum wheat core collection) under different rainfed conditions. Figure 1 shows the differences in climatic factors (temperature, radiation, air relative humidity and rainfall) for the 3 successive years. For the 1995 growth cycle, plants were subjected to drought, especially during flag-leaf emergence and full functioning, and grain filling (Figure 2).

Flag-leaf  $\delta^{13}\text{C}$  varied (for the 3 years overall) from  $-24$  to  $-29\%$ . The most marked difference between the minimum and maximum values was noted for the 1997 plant cycle (Figure 3). The kernel  $\delta^{13}\text{C}$  ranged from  $-22$  to  $-28\%$ , with the highest variation (4%) observed in 1995.

Differences in flag-leaf  $\delta^{13}\text{C}$  between Jennah Khetifa (JK) and Cham1 were low, and between years the variations were more pronounced in JK (Figure 4, left). These variations seemed to be highly dependent on the climatic conditions prevailing during flag-leaf development. A close correlation was noted between flag-leaf  $\delta^{13}\text{C}$  of the two genotypes and the cumulated rainfall of the emergence and the full functioning period (March 10th to May 20th). For the JK landrace, its  $\delta^{13}\text{C}$  was modified markedly depending on the rainfall, whereas Cham1 showed high  $^{13}\text{C}$  value stability (Figure 4, left). The study of flag-leaf stomata distributions (Photo 2) for 1995 (driest year), showed a lower stomatal density in Cham1 (97 stomata/ $\text{mm}^2$ ) compared to JK (142 stomata/ $\text{mm}^2$ ). Nevertheless, Cham1 presented the lowest stomatal limitation compared to JK in terms of  $\delta^{13}\text{C}$ . It thus seems that stomata regulation was responsible for this variation rather than the stomatal density. This observation should be confirmed in the whole DWCC.

Kernel  $\delta^{13}\text{C}$  was also closely linked to cumulated rainfall from January to June (the maximal photosynthetic activity period). There was no difference found between JK and Cham1. Kernel and flag-leaf  $^{13}\text{C}$  values were similar for the two water limited plant growth cycles (1995-1997), but were different for 1996. Two hypotheses can be put forward to explain the difference between kernel and flag-leaf  $\delta^{13}\text{C}$ : 1) leaves synthesize carbon whose isotope composition depends on the climatic conditions prevailing in the post-anthesis period, whereas their structures depend on pre-anthesis climatic conditions; 2) the kernel carbon is provided by the leaves and also by other photosynthetic organs such the stem, and the ear (particularly awns) [20, 21, 43, 44]. Therefore, the flag-leaf  $\delta^{13}\text{C}$  could signal pre-anthesis photosynthesis. In contrast, the kernel  $\delta^{13}\text{C}$  gives an integrative value of the photosynthetic behaviour of all plant organs participating in grain filling.

A better understanding of the origin of carbon isotope composition variations and complex relationships with other morphophysiological traits in durum wheat would help in breeding for drought tolerance. These aspects have already been studied in bread wheat, but more rarely approached in durum wheat [39]. The few studies undertaken in this field showed a close relationship between  $\Delta$  and earliness, harvest index and early growth habit [40]. There have been fewer investigations on the relationship between  $\Delta$  and other morphophysiological traits (water status, stomatal organization).

A low genotype  $\times$  environment interaction has been found for carbon isotope discrimination in bread wheat [45]. Heritability has also studied for several crop species including bread wheat [46, 47]. Three chromosomal regions involved in the variation have been identified in tomato [48, 49]. In barley, a region of chromosome 4 seems to be involved in the variation of  $\Delta$  [50, 51]. Studies on the genetic control of variation are less advanced in durum wheat, whereas a preliminary approach has been initiated [39].

A study on the stability of carbon isotope composition in durum wheat, based on multilocation trials, has been conducted jointly by ENSA-INRA of Montpellier (France) and ICARDA (Aleppo, Syria) for 3 years. On the other hand, a segregating population of recombinant inbred lines (RIL) has been produced by ICARDA. JK and Cham1 were crossed and 112 F7 RIL obtained and used to evaluate the heritability of the carbon isotope composition in durum wheat. This progeny is also being used for the construction of the first durum wheat genetic map by Cornell University (USA) jointly with ICARDA. Markers or QTLs (quantitative trait loci) linked or involved in variations in this species could thus be identified.

The final aim of the work is to screen durum wheat genetic resources (based on drought tolerance physiological traits and WUE) and the development of marker-assisted selection programs, allowing the accumulation of favourable alleles in a unique genotype.

meilleure compréhension des interactions entre ces critères.

Une évaluation pour le critère isotopique, sur huit géotypes de blé tendre dans cinq sites et sur deux années successives, a montré que les interactions géotype  $\times$  milieu étaient faibles [45]. Une étude du déterminisme génétique de la discrimination isotopique chez le blé tendre a montré une héritabilité au sens large de 0,6 à 0,9 [46, 47]. Une héritabilité au sens large de 0,48 a été notée sur une population issue d'un croisement interspécifique *T. polonicum*  $\times$  *T. durum*, menée en sélection divergente [39]. Trois zones chromosomiques impliquées dans la variation du critère isotopique ont été localisées chez la tomate [48, 49]. Chez l'orge, les variations de la discrimination isotopique semblent être liées à un locus présent sur le chromosome 4 [50, 51]. Les études du déterminisme génétique de la discrimination isotopique sont moins avancées chez le blé dur, une démarche préliminaire ayant toutefois été entreprise [39].

Une étude de stabilité de la composition isotopique et des principaux caractères morphophysologiques de tolérance a été initiée chez le blé dur ; elle est effectuée sur la DWCC, dans le cadre d'un dispositif d'essais pluriannuels et multilocaux mis en place conjointement par l'ICARDA et l'ENSA-INRA Montpellier. Les résultats permettront d'évaluer la stabilité des caractères et de préciser les interactions géotypes  $\times$  milieu. Une évaluation (sur plusieurs sites) de la composition isotopique de 112 lignées en ségrégations issues du croisement Jennah Khetifa  $\times$  Cham1 a également été initiée, parallèlement à la construction de la première carte génétique de liaison chez le blé dur (effectuée conjointement par l'ICARDA et l'Université Cornell, États-Unis). Le rapprochement des valeurs de composition isotopique et des données moléculaires, effectué dans le cadre du réseau blé dur « SEWANA », permettra la recherche de marqueurs ou de locus quantitatifs (QTL ou *Quantitative Trait Loci*) liés ou impliqués dans la variation de la discrimination isotopique du carbone chez le blé dur. Plus généralement, les QTL seront recherchés pour un ensemble de caractères agronomiques (rendement et composantes, résistances aux maladies) et physiologiques (ajustement osmotique, composition isotopique). L'objectif final de la recherche est le criblage de ressources génétiques (sur la base de caractères physiologiques

associés à la tolérance à la sécheresse et à l'efficacité d'utilisation de l'eau) et la mise en place de programmes de sélection assistée par marqueurs (SAM), permettant l'accumulation, dans un même géotype, d'allèles favorables pour un caractère donné ■

## Références

1. Braun P. Blé dur : le progrès technique au service de la qualité. *Perspectives Agricoles* 1996 ; 218 : 36-43.
2. Monneveux P. Quelles stratégies pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales d'hiver ? In : Chalbi N, Demarly Y, eds. *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*. Montrouge : AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, 1991 : 165-86.
3. Monneveux P, This D. La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse : espoirs et difficultés. *Sécheresse* 1997 ; 8 : 29-37.
4. Spagnoletti-Zeuli PL, Qualset CO. Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. *Crop Sci* 1987 ; 27 : 235-41.
5. Brush SB. Rethinking crop genetic resource conservation. *Conser Biol* 1989 ; 3 : 19-29.
6. Frankel OH, Brown ADH. Current plant genetic resources. A critical appraisal. In : *Genetic new frontiers*. Proc. of XVth Int. Congress of Genetics. Oxford : IBH publishing Co, 1984 : 3-13.
7. Brown AHD. The case for core collection. In : Brown AHD, Frankel OH, Marshall DR, Williams JT, eds. *The use of plant genetic resources*. Cambridge : Cambridge Univ Press, 1989 : 13-156.
8. Ali Dib T. *Contribution à l'étude de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur* (Triticum durum Desf.). Thèse de Doctorat, ENSA de Montpellier, 1992 ; 186 p.
9. Farquhar GD, Richards RA. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust J Plant Physiol* 1984 ; 11 : 539-52.
10. Teulat B, Rekika D, Nachit MM, Monneveux P. Comparative osmotic adjustments in barley and tetraploid wheats. *Plant Breeding* 1997 ; 116 : 519-23.
11. Rekika D, Nachit MM, Araus JL, Monneveux P. Effects of water deficit on photosynthetic rate and osmotic adjustment in tetraploid wheats. *Photosynthetica* 1998 ; 35 : 129-38.
12. Bender MM. Mass spectrometric studies of carbon 13 variations in corn and other grasses. *Radiocarbon* 1968 ; 10 : 468-72.
13. Smith BN, Epstein S. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio for higher plants. *Plant Physiol* 1971 ; 47 : 380-4.
14. O'Leary MH. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochem* 1981 ; 20 : 553-67.
15. Deléens E, Ferhi A, Queiroz O. Carbon isotope fractionation by plants using the pathway. *Physiologie Végétale* 1983 ; 21 : 897-905.

16. Farquhar GD. On the nature of carbon isotope discrimination in  $\text{C}_4$  species. *Aust J Plant Physiol* 1984 ; 10 : 205-26.

17. Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989 ; 40 : 503-37.

18. Araus JL, Febrero A, Bort J, Santiveri P, Romagosa I. Carbon isotope discrimination, water use efficiency and yield in cereals : some cases study. In : Monneveux P, Ben Salem M, eds. *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Paris : Colloques Ed INRA, 1993 ; 64 : 47-60.

19. Gate P, Bouthier A, Casabianca H, Deléens E. Caractères physiologiques décrivant la tolérance à la sécheresse des blés cultivés en France : interprétations des corrélations entre rendement et la composition isotopique du carbone des grains. In : Monneveux P, Ben Salem M, eds. *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Paris : INRA Colloques 1993 ; 64 : 61-73.

20. Deléens E, Barthes L, Prioul JL. Modélisation du fractionnement isotopique du flux de C photosynthétique chez les végétaux à métabolisme  $\text{C}_3$  et  $\text{C}_4$  et les applications obtenues en chambre d'assimilation. In : Maillard P, Bonhomme R, eds. *Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes*. Paris : INRA Colloques 1995 ; 70 : 43-64.

21. Deléens E, Hannachi L, Gate P, Bouthier A, Casabianca H. Composition isotopique du carbone du blé au cours du développement : efficacité d'utilisation de l'eau de la plante et des différents organes verts participant au remplissage. In : Maillard P, Bonhomme R, eds. *Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes* Paris : INRA Colloques 1995 ; 70 : 65-82.

22. Craig H. Carbon 13 in plants and the relationship between carbon 13 and carbon 14 in nature. *J Géol* 1954 ; 62 : 115-49.

23. Deléens E, Barthes L, Hannachi L, et al. Caractérisation variétale. Un nouvel outil : l'analyse de la composition isotopique. *Perspectives Agricoles* 1994 ; 190 : 108-22.

24. Deléens E, Morot-Gaudry JF, Martin F, Thoreux, Gojon A. Méthodologie  $^{15}\text{N}$ . In : *L'assimilation de l'azote chez les plantes, aspects physiologique, biochimique et moléculaire*. Paris : INRA/Morot-Gaudry, 1997 : 265-81.

25. Deléens E, Treichel I, O'Leary MH. Température dépendance de carbon isotope fractionation in CAM plants. *Plant Physiol* 1985 ; 79 : 202-6.

26. Roeske CA, O'Leary MH. Carbon isotope effects on the enzyme-catalysed carboxylation of ribulose biphosphate. *Biochem* 1984 ; 23 : 6275-84.

27. Von Caemmerer S, Evans JR. Determination of the average partial pressure of  $\text{CO}_2$  in chloroplasts from leaves of several C plants. *Aust J Plant Physiol* 1991 ; 18 : 287-305.

28. Guehl JM, Picon C, Senequier C. Discrimination isotopique du carbone et efficacité d'utilisation de l'eau chez les arbres forestiers. In : Maillard P, Bonhomme R, eds. *Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes*, Paris : INRA Colloques 1995 ; 70 : 83-101.

29. Condon AG, Richards RA, Farquhar GD. Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field-grown wheat. *Crop Sci* 1987 ; 27 : 996-1000.

30. Condon AG, Farquhar GD, Richards RA. Genotypic variation in carbon isotope discrimination and water use efficiency in wheat. Leaf gas exchange and whole plant studies. *Aust J Plant Physiol* 1990 ; 17 : 9-12.
31. Hubick KT, Farquhar GD. Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gain to water lost in barley cultivars. *Plant Cell Environ* 1989 ; 12 : 795-804.
32. Hubick KT, Shorter R, Farquhar GD. Heritability and genotypes environment interactions of carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) germplasm. *Aust J Plant Physiol* 1988 ; 15 : 799-813.
33. Virgona JM, Hubick KT, Rawson HM, Farquhar GD, Downes RW. Genotypic variation in transpiration efficiency, carbon isotope discrimination and dry matter partitioning during early growth in sunflower. *Aust J Plant Physiol* 1990 ; 17 : 207-14.
34. White JW, Castillo JA, Ehleringer JR. Associations between productivity, root growth and carbon isotope discrimination in *Phaseolus vulgaris* under water deficit. *Aust J Plant Physiol* 1990 ; 17 : 189-98.
35. Johnson DA, Asay KH, Tieszen LL, Ehlinger JR, Jefferson PG. Carbon isotope discrimination : potential in screening cool season grasses for limited environments. *Crop Sci* 1990 ; 30 : 338-43.
36. Johnson DA, Bassett LM. Carbon isotope discrimination and water use efficiency in four cold season grasses. *Crop Sci* 1991 ; 31 : 157-62.
37. Read JJ, Johnson DA, Asay KH, Tieszen LL. Carbon isotope discrimination : relationship to yield gas exchange and water-use efficiency in field grown crested wheatgrass. *Crop Sci* 1992 ; 32 : 168-75.
38. Ismael AM, Hall AE. Correlation between water use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse cowpea genotypes and isogenic lines. *Crop Sci* 1992 ; 32 : 7-12.
39. Al Hakimi A, Monneveux P, Deléens E. Selection response for carbon isotope discrimination in a *Triticum polonicum* x *T. Durum* cross: potential interest for improvement of water-use efficiency in durum wheat. *Plant Breeding* 1996 ; 115 : 317-24.
40. Grignac P. Rendement et composantes du rendement dans l'environnement méditerranéen français. *AGRIMED de Bari* (Italie), 30 septembre-2 octobre, 1981 : 185-95.
41. Baldy C. Comportement des blés dans les climats méditerranéens. *Ecologia Mediterranea* 1986 ; XII : 73-88.
42. Dubost R, Jezequel S. Systèmes de production, les expériences espagnole et italienne. *Perspectives Agricoles* 1992 ; 170 : 6-23.
43. Araus JL, Brown HR, Febrero A, Bort J, Serret MD. Ear photosynthesis, carbon isotope discrimination and the contribution of respiratory CO<sub>2</sub> to differences in grain mass in durum wheat. *Plant Cell Environ* 1993 ; 16 : 383-92.
44. Hannachi L, Deléens E, Gate P. Nitrogen and carbon isotope composition of wheat grain : alteration due to sink-source modifications at flowering. *Mass Spectrometry* 1996 ; 19 : 979-86.
45. Matus A, Slinkard AE, van Kessel C. Genotype x environment interaction for carbon isotope discrimination in spring wheat. *Crop Sci* 1997 ; 37 : 97-102.
46. Condon AG, Richards RA. Broad sense heritability and genotypes x environment interaction for carbon isotope discrimination in field-grown wheat. *Aust J Agric Res* 1992 ; 43 : 921-34.
47. Edhaie B, Waines JG. Genetic analysis of carbon isotope discrimination and agronomic characters in a bread wheat cross. *Theor Appl Genet* 1994 ; 88 : 1023-8.
48. Martin B, Thorstenson YR. Stable carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ), water use efficiency and biomass productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennelli* and the F1 hybrids. *Plant Physiol* 1988 ; 88 : 213-7.
49. Martin B, Nienhuis J, King G, Schaeffer A. Restriction fragment length polymorphism associated with water use efficiency in tomato. *Science* 1989 ; 243 : 1725-8.
50. Handley LL, Nevo E, Raven JA, Martinez-Carrasco R, Scrimgeour CM, Pakoriyat H, Forster BP. Chromosome 4 controls potential water-use efficiency ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in barley. *J Exp Bot* 1995 ; 280 : 1661-3.
51. Forster BP, Russel JR, Ellis RP, et al. Locating genotypes and genes for abiotic stress tolerance in barley : a strategy using maps, markers and the wild species. *New Phytol* 1997 ; 137 : 141-7.

## Résumé

L'amélioration de la tolérance à la sécheresse est l'objectif majeur de sélectionneurs de céréales en zones méditerranéennes ; ceci est particulièrement vrai pour le blé dur, en raison de son importance dans la couverture alimentaire de ces régions. Les caractères d'adaptation à la sécheresse ont été largement décrits chez les céréales. Toutefois leur déterminisme génétique est moins bien connu et l'utilisation en sélection de critères liés à ces caractères physiologiques est encore peu répandue.

L'efficacité d'utilisation de l'eau (EUE), définie comme la production de biomasse par unité d'eau consommée, est un important caractère de tolérance à la sécheresse. La sélection pour l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau est confrontée à la lourdeur et au coût de mesures directes sur de larges effectifs et en conditions de plein champ. L'émergence de la méthode isotopique a complètement modifié ces données. Le formalisme mathématique des transferts de CO<sub>2</sub> et de vapeur d'eau ainsi que celui du fractionnement isotopique du carbone lors de la photosynthèse permettent d'attribuer à une plante (ou à un organe donné d'une plante) une valeur de composition isotopique qui révèle son efficacité d'utilisation de l'eau. Des progrès importants ont par ailleurs été réalisés au cours des dernières années dans l'automatisation des analyses.

Les avantages présentés par ce critère dans les programmes de sélection sont liés à : - sa valeur intégrative ; - l'existence d'une variabilité génétique ; - de faibles interactions génotypes x milieu et une forte héritabilité ; - la facilité de la préparation des échantillons et l'automatisation des analyses isotopiques qui conduisent à sa mesure.

L'origine physiologique des variations de la composition isotopique du carbone et ses relations avec divers caractères morphophysiologiques et phénologiques de tolérance à la sécheresse demandent toutefois à être approfondies chez le blé dur. L'étude de l'héritabilité et la recherche de marqueurs moléculaires liés à la variation de ce critère ont par ailleurs été initiées.