

## **AMELIORATION DES PLANTES Biotechnologies et arachide**

### **Biotechnologies Biotechnologies and groundnut**

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 9, Numéro 4, 206-11, Juillet - Août 2002, La filière

**Auteur(s)** : Danièle CLAVEL, Ceraas-Coraf, BP 3320, Thiès-Escale, Thiès, Sénégal.

**Author(s)** : Danièle CLAVEL

**Résumé** : Les recherches sur les biotechnologies de l'arachide sont principalement conduites aux États-Unis mais également à travers des programmes collaboratifs internationaux où interviennent l'Icrisat et le Cirad. Malgré une forte variation phénotypique, l'arachide cultivée montre peu de variabilité moléculaire. L'arachide étant une culture alimentaire et de rente très importante dans les régions sahéliennes, la sécheresse et la contamination des graines par l'aflatoxine en cours de culture constituent des contraintes majeures. La seule application connue en sélection assistée par marqueurs d'ADN fait intervenir des gènes provenant d'une espèce sauvage compatible en croisement avec l'espèce cultivée. Les principaux résultats publiés jusqu'à présent concernent la mise au point de techniques de régénération et de transfert de gènes. Le marquage moléculaire s'avérant inefficace, les recherches s'orientent aujourd'hui sur la génomique fonctionnelle du fait de la disponibilité des techniques de transformation génétique. L'objectif est de développer de nouveaux outils moléculaires capables d'assister les programmes de sélection pour la résistance à ces deux traits complexes.

**Summary** : Research on groundnut biotechnology is mainly carried out in the United States and also through international collaborative programs involving Icrisat and Cirad. However, despite its high phenotypic variation, cultivated groundnut shows little molecular polymorphism. The only known application to DNA marker-assisted selection has been the use of genes from wild species in crosses with cultivated species. Until quite recent years, the main results published concerned the development of efficient plant regeneration and gene transfer techniques. Groundnut is an important food and cash crop in the semi-arid tropics but drought and subsequent seeds pre-harvest aflatoxin contamination are the main constraints to crop productivity and quality. Since genetic engineering techniques are available and genetic mapping proves unfruitful, research is now focused on functional genomics. The objective is to provide new molecular tools to assist breeding programmes for the resistance to these two complex traits.

**Mots-clés** : arachide, biotechnologie, aflatoxine, sécheresse.

**Keywords** : groundnut, biotechnology, aflatoxin, drought.

## ARTICLE

### Les biotechnologies de l'arachide

Les principaux travaux de biotechnologie concernant l'arachide, ont lieu dans le domaine de la régénération de la plante. Ils visent la « préparation » à la transformation génétique (transgénèse). Ils sont principalement réalisés aux États-Unis par le département d'horticulture de l'Université de Georgie, à Tifton et à Athens. D'autres équipes travaillent dans ce domaine, notamment au département de botanique de l'Université de Caroline du Nord de Raleigh (USA), à l'Institut de Biologie de l'Université Fédérale de Rio de Janeiro (Brésil) et à l'Icrisat<sup>1</sup> à Hyderabad (Inde). Des expériences de transgénèse proprement dite ont eu lieu l'Université de Georgie à Athens pour la résistance au « Tomato spotted Virus » et l'Institut Indien des Sciences (Bangalore) pour la recherche de génotypes résistants à la cercosporiose précoce. Des essais de transformation de l'arachide utilisant des gènes permettant d'augmenter le taux d'acide oléique dans l'huile ont été réalisés à Collège Station (Texas A & M) et à l'Université de Clemson (Caroline du Sud).

Les applications de la recherche sur la résistance à l'aflatoxine sont limitées actuellement à des constructions génétiques au niveau du champignon-vecteur *Aspergillus flavus*, l'objectif étant de suivre l'induction de l'aflatoxine *in situ* et d'identifier des composés antifongiques. Ces travaux se déroulent en grande partie dans les départements de phytopathologie de différentes universités américaines notamment à Collège Station (Texas A & M), Raleigh (Géorgie), Bâton Rouge (Louisiane) et East Lansing (Michigan).

Dans le domaine de la sécheresse le seul travail rapporté concerne l'expression différentielle de marqueurs (transcrits) polymorphes sur deux variétés d'arachide soumises ou non à un stress hydrique. Il vient d'être publié par des chercheurs de l'Université de Floride (Tallahassee).

Enfin, en raison du très faible polymorphisme moléculaire observé au niveau de l'ADN à l'intérieur de l'espèce cultivée, la sélection assistée par marqueurs d'ADN n'a eu qu'une seule application concrète. Elle a été pratiquée à Collège Station (Texas A & M), à l'aide de marqueurs de type RFLP, dans un croisement impliquant une arachide sauvage portant une résistance aux nématodes.

### Le marquage du génome

Le marquage moléculaire a pour objectif de cartographier et de localiser les gènes dont le rôle est important dans la résistance à une contrainte biotique ou abiotique. Pour que la sélection assistée par marqueurs (SAM) ou la sélection à l'aide de marqueurs soit efficace le génome doit être saturé avec des marqueurs uniformément espacés et/ou présentant un haut niveau de déséquilibre de liaison [1, 2]. Or, alors que sa diversité morphologique est importante, l'arachide répond mal aux techniques de marquage de l'ADN [3, 4]. Le faible polymorphisme moléculaire observé est attribué à une polyploïdisation récente de l'espèce cultivée et une forte conservation du génome en dépit de la sélection [5]. Pour expliquer ces échecs, la capacité limitée de certains marqueurs moléculaires, comme les RFLP et les RAPD, à détecter des substitutions nucléotidiques isolées dans les gènes et l'utilisation d'un matériel végétal mal choisi ont également été invoquées [6, 7]. Il demeure que l'on ne dispose à ce jour, que de cartographies très sommaires sur cette espèce. Le séquençage ne concernant que des fragments chromosomiques importants [8, 9], il ne permet aucune

interprétation sur l'action individuelle des gènes et de leurs interactions. Dans l'état actuel des connaissances, ces cartes, réalisées à l'aide de marqueurs d'ADN de type AFLP, microsatellites et RAPD, n'ont fourni qu'une seule application en termes d'assistance à un programme de sélection sur l'arachide cultivée. Il s'agit de l'utilisation de marqueurs RFLP pour l'obtention d'individus homozygotes pour la résistance (monogénique) au nématode *Meloidogyne arenaria* à partir d'une population (TP 263-3-5) résultant d'un croisement interspécifique avec une arachide sauvage *Arachis cardenasii* [10, 11].

### **La génomique fonctionnelle**

Approche plus ciblée de l'étude du génome la génomique fonctionnelle vise, non pas la localisation des gènes sur une carte, mais la connaissance de la fonction de ces gènes et l'analyse de leur expression. L'expression (ou transcrite) plus ou moins importante du gène est accessible à travers les changements d'ARNm, eux-mêmes traduits en protéines, qui sont en général des enzymes dont la fonction métabolique est connue. Son objectif est parfois l'aide à la sélection par la mise au point de test de criblage sur la réponse de la plante en termes d'expression de tel ou tel gène-cible sous la pression du stress pour lequel la résistance est recherchée. Cependant, quelle que soit l'espèce considérée c'est, le plus souvent, la transformation génétique qui est visée par ces techniques. L'objectif à terme est d'inclure dans le génome de l'espèce cultivée des gènes intéressants appelés gènes-candidats. Dans le cas de l'arachide cultivée, il s'agit, le plus souvent de gènes de résistance présents dans d'autres espèces d'arachides, les arachides sauvages dont la grande majorité est incompatible en croisement avec l'espèce cultivée.

### **Les méthodes de transformation**

La transformation génétique consiste en un ensemble de méthodes permettant le transfert de gènes individuels conférant des caractères de résistance. Les caractères visés sont en général mono- ou oligo-génique (contrôlés par un seul ou un faible nombre de gènes) comme la résistance à des insectes ou des nématodes ou une augmentation de la qualité des graines. À l'instar de la plupart des espèces, les techniques de transformation de l'arachide utilisent le gène-reporter beta-glucuronidase (GUS) dont l'expression est facilement détectable par fluorimétrie et qui permet donc de connaître l'efficacité de la transformation ainsi que l'expression des gènes dans les transformants [12]. La régénération des plantes transformées est réalisée sur le milieu classique d'induction MS [13, 14] plus ou moins modifié. Les premiers essais de régénération *in vitro* de l'arachide ont été réalisés dès 1992 à partir de gynophores prélevées sur des fleurs, juste après leur fécondation [15]. Depuis, des arachides transgéniques ont été produites par bombardement de particules [16-18] ou *via* la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* portant une résistance à un antibiotique [19-21]. Plus récemment, la mise au point d'une méthode d'électroporation a permis un transfert direct de gène dans des folioles embryonnaires (plus faciles à manipuler que les protoplastes) avec une bonne qualité de régénération [22].

### **Les principales applications du génie génétique sur l'arachide**

Les résultats obtenus récemment sur cette espèce concernent la transmission de certaines résistances biotiques et l'augmentation de la qualité de l'huile dont le contrôle génétique est simple.

Les résistances plus complexes comme la résistance à l'aflatoxine ou à la sécheresse n'ont pas encore abouti à des applications concrètes.

#### *La résistance à des facteurs biotiques*

Des plantes d'arachide fertiles ont été transformées via *A. tumefaciens* avec un gène hétérologue du tabac de type chitinase afin d'obtenir une résistance à *Cercospora arachidicola*, la cercosporiose précoce. L'analyse du transgène par Northern Blot (hybridation entre l'ADN de la sonde « chitinase » marquée et l'ARN de la plante) a montré une forte expression de la chitinase et la transmission du gène correspondant dans la descendance a été vérifiée en utilisant des Southern Blots (hybridations entre l'ADN marqué de la sonde et l'ADN des plantes). La résistance des plantes transformées et de leur descendance a été confirmée en serre [21].

La résistance au virus du « Tomato Spotted Wilt » (TSWV) a été également obtenue par transformation en utilisant le bombardement de particules. La construction génétique a été réalisée avec un gène anti-sens de TSWV isolé à partir de plants d'arachide infestés. Un taux très faible de plantes transformées fertiles a été obtenu uniquement sur l'un des deux cultivars étudiés. Une évaluation au champ de ces quelques plantes a montré que la présence du gène améliorait significativement la résistance au virus [23].

#### *Augmentation de la qualité de l'huile*

Une série d'investigations est actuellement réalisée par des équipes d'Amérique du Nord dans l'objectif de modifier la qualité de l'huile d'arachide. Ces recherches visent l'augmentation du ratio O/L (ratio entre l'acide oléique et l'acide linoléique représentant dans l'huile d'arachide 80 % des acides gras totaux). Une forte teneur en acide oléique améliore la conservation de l'huile du fait d'une oxydation moindre. En utilisant en croisement la lignée F 435, mutant spontané à fort taux d'acide oléique (34:1), Moore et Knauft [24] avaient conclu, dès 1989, à un contrôle génétique simple (deux gènes récessifs) de ce caractère. Les travaux récents en génétique moléculaire ont confirmé et précisé ces résultats. Dans l'optique de la transformation génétique, la recherche de gènes-candidats s'est logiquement orientée sur la répression de gènes codant pour des désaturases, enzymes permettant d'augmenter le taux d'insaturation de l'huile chez l'arachide. L'expression de l'un des deux gènes codant pour ces désaturases de l'arachide a été analysée par RT-PCR (Differential Display) dans une descendance en ségrégation entre deux parents différents en termes de ratio O/L. Les résultats ont montré une stricte correspondance entre les phénotypes à fort taux d'acide oléique et la réduction de l'expression d'une de ces désaturases [25]. Néanmoins, pour que le caractère contrôlant la haute teneur en acide oléique s'exprime, il semble que la réduction importante de l'expression de cette désaturase doive être accompagnée par la mutation d'une autre désaturase [26]. Par ailleurs, les comparaisons entre l'ADN génomique de la lignée mutante F 435 et un génotype à taux O/L normal (1,3:1) et leurs descendance obtenues par back-cross ont révélé un polymorphisme limité à quelques séquences codantes. Ces résultats autorisent à penser qu'une sélection assistée par marqueur permettra d'obtenir plus rapidement des lignées à forte teneur en acide oléique [27].

### *La résistance à l'aflatoxine en pré-récolte*

L'aflatoxine est une toxine hautement cancérigène transmise par des champignons du sol saprophytes du genre *Aspergillus* (*A. flavus* et *A. parasiticus*) extrêmement fréquents dans les zones de production surtout si ces régions sont régulièrement soumises à des déficits hydrique en fin de cycle (*photo 1*). Les méthodes traditionnelles de sélection mises en œuvre depuis les années 70 n'ont pas permis d'obtenir de variétés résistantes à l'aflatoxine. Ainsi, depuis une dizaine d'années environ, la recherche arachidière a recours aux biotechnologies dans ce domaine. Au niveau du champignon des constructions de gènes impliquant un gène intervenant dans la biosynthèse de l'aflatoxine comme promoteur et le gène GUS comme reporter ont été réalisées. Ces outils moléculaires ont été utilisés afin d'identifier des agents et des composés qui inhibent la production de l'aflatoxine [28]. Le principal résultat publié sur l'arachide concerne une étude histologique de l'infection réalisée *in situ* grâce à un transformant de *A. parasiticus* utilisant comme promoteur un précurseur de l'aflatoxine, le gène *Nor-1* [29]. Sur le maïs, des transformants *A. flavus*-GUS ont permis d'évaluer la croissance et le degré de l'infestation fongique [30] dans les graines et d'analyser l'expression des gènes reliés à l'aflatoxine [31].

Dans le domaine plus complexe de l'interaction hôte-parasite, les essais antérieurs tentant d'associer certains marqueurs protéiques à une résistance reconnue à l'aflatoxine ont échoué [32]. La principale difficulté réside dans l'intervention des conditions environnementales (températures, déficit hydrique) dans l'expression de la sensibilité des génotypes. Parmi les gènes-candidats concernés par d'éventuels essais de transformation génétique, il y a le gène codant pour la stilbène synthase contrôlant la synthèse des stilbène phytoalexines, molécules classiquement produites en réponse à l'infestation fongique et également au déficit hydrique [33, 34]. Certains gènes codant pour des lipoxigénases (LOXs), importante famille d'enzymes régulant le métabolisme des acides gras, sont supposés jouer un rôle important dans l'interaction *Aspergillus*/graine d'arachide car les LOXs induisent l'expression de signaux de défense des plantes comme la production d'acide jasmonique et d'hydroperoxydes [35]. Les gènes codant pour certaines LOXs, ont été récemment clonés dans l'arachide et leur expression a été étudiée dans des graines matures et immatures. Les résultats sur la présence de certains produits d'expression suggèrent que l'activation des LOXs induites par le champignon pourraient expliquer la grande sensibilité de l'arachide à l'aflatoxine en particulier dans les graines immatures [36]. Enfin d'autres enzymes ou protéines potentiellement anti-fongiques, constitutives ou induites en réponse à l'attaque du champignon sont proposées. Il s'agit notamment d'enzymes hydrolytiques comme les chitinases [37], chitosanases [38] et glucanases, d'osmotines, d'inhibiteurs de protéases [38, 39], de deshydrogénases et de peroxidases [40]. Cependant aucune application concrète n'est encore disponible pour assister la création variétale. Une illustration graphique d'un montage théorique utilisant l'ingénierie génétique pour tenter d'améliorer la résistance à l'aflatoxine est donné dans la *figure 1*.

### *Résistance à la sécheresse*

La sécheresse est la contrainte majeure de la production arachidière surtout dans les zones tropicales sèches où cette culture est très appréciée pour sa grande rusticité, ses valeurs alimentaires et commerciales. Suivant le principe émis par Passioura [41], on considère généralement qu'un faible nombre de gènes ne peuvent permettre à eux seuls de conférer un niveau d'adaptation à la

sécheresse suffisant sur plan agronomique. En effet, la résistance à la sécheresse est un trait à hérabilité complexe car toute une série de mécanismes (échappement, évitement, tolérance *sensu stricto*) rentrent en jeu. Les réponses de la plante sont donc variées et interactives surtout chez une espèce naturellement résistante à la sécheresse comme l'arachide dont la capacité d'adaptation est renforcée par une floraison et une croissance indéterminée.

Néanmoins, dans le cas de certaines espèces comme le maïs [42, 43] ou le riz [44], on a pu relier la résistance à la sécheresse à des caractères quantitatifs (QTLs) en utilisant un polymorphisme moléculaire au niveau de l'ADN. Cette stratégie ne peut être envisagée chez l'arachide du fait de la quasi-absence de cartes génétiques. Ainsi, la voie de la génomique fonctionnelle est actuellement explorée sur cette espèce car la compréhension des mécanismes biochimiques et génétiques de la tolérance vraie ne peuvent que contribuer à l'efficacité de la sélection. En outre, la forte capacité de tolérance au sens strict de l'arachide est largement connue (*photo 2*) [45, 46] et il a été montré qu'un des mécanismes majeurs mis en jeu est probablement le maintien de l'intégrité membranaire [47]. Une étude récente, la première du genre utilisant la RT-PCR, vient d'être publiée [48]. Elle indique des différences moléculaires en termes de transcrits entre les plantes stressées et les irriguées au niveau de certains gènes. Plus intéressant, les résultats montrent aussi qu'en condition de stress prolongé, certains transcrits ont été exprimés plus longtemps sur le génotype « résistant » que sur le génotype témoin. Cependant le fait qu'aucune indication ne soit fournie sur la nature de la résistance du génotype « résistant » ni sur la fonction des gènes exprimés limite l'intérêt pratique de l'étude. Il semble plus rationnel d'utiliser la génomique fonctionnelle pour comprendre au plan moléculaire le mécanisme de tolérance le plus connu, celui par lequel les membranes cellulaires résistent au déficit hydrique ou tolérance protoplasmique. Cette dernière s'exprime lors d'une sécheresse prolongée lorsque les dispositifs périphériques impliqués dans l'évitement ne suffisent plus et que les plantes doivent supporter une déshydratation intense.

Ainsi, le Cirad<sup>2</sup> et ses partenaires, l'Université de Paris 12 et le Ceraas<sup>3</sup>-Coraf<sup>4</sup>, ont entrepris des études relevant de la génomique fonctionnelle pour mettre en évidence les gènes qui permettraient d'accroître le niveau de tolérance protoplasmique à la déshydratation. L'objectif est principalement de développer la compréhension précise de l'expression phénotypique de ce caractère et de fournir un outil de criblage de la variation génotypique.

Des recherches réalisées sur le niébé et le haricot par le laboratoire partenaire à Paris ont montré que des enzymes du catabolisme sont impliquées dans la réponse des plantes à la sécheresse. Il s'agit d'acylhydrolases, de protéinases, d'une ascorbate peroxydase, de régulateurs de protéases et de phospholipases [49-52]. Les ADNc codant pour ces enzymes ont été clonés et l'expression (transcrits) des gènes correspondants a été analysée. Les résultats indiquent que la sécheresse induit une augmentation des transcrits corrélée positivement avec le degré de sensibilité de la plante au déficit hydrique. Ainsi plus les plantes sont sensibles, plus les enzymes dégradatives sont efficaces, conduisant à une destruction des membranes cellulaires, photosynthétiques et mitochondriales. Il s'ensuit des carences métaboliques et une réduction de la croissance et du rendement.

Suivant le même principe, l'identification de marqueurs moléculaires de la résistance à la sécheresse a été entreprise sur l'arachide. La recherche des sondes « sécheresse » spécifiques de l'arachide a été réalisée sur une variété d'arachide sénégalaise dont les caractères adaptatifs physiologiques et

agronomiques sont connus. Des sondes spécifiques de l'arachide ont été obtenues par RT-PCR à partir d'ARNm de cette variété et d'amorces hétérologues du niébé. Les sondes ont été clonées et séquencées.

L'étude de la réponse de l'arachide à différents stades de déficit hydrique en termes de transcrits est en cours (*figure 2*). Les ARNm ont été obtenus à partir de trois cultivars précoces parfaitement caractérisés au plan agronomique et physiologique et présentant des niveaux différenciés de tolérance membranaire. L'analyse des transcrits a été réalisée par RT-PCR et Northern blotting à partir des ARNm extraits des feuilles prélevées à des niveaux différents de déficit hydrique. Les résultats de cette étude permettront de préciser l'intensité du déficit hydrique le plus favorable à l'expression de la variabilité phénotypique au niveau moléculaire.

En liaison avec les recherches précédentes, des travaux visant à mettre au point des outils moléculaires pour la sélection de la résistance à l'aflatoxine en pré-récolte ont été également entrepris. Ces recherches sont conduites dans le cadre d'un projet pluridisciplinaire de type Inco (DG12, Bruxelles, 2001) en collaboration étroite avec l'Université de Paris 12 et le Ceraas-Coraf. Les travaux entrepris s'appuient sur les connaissances concernant l'action puissante de la sécheresse sur la contamination par les *Aspergillus* du fait de l'inhibition d'agents protecteurs (phénols, phytoalexines) ou de protéines anti-fongiques (chitinases) [34] et de son effet sur les enzymes régulant la dégradation des membranes cellulaires. L'objectif visé dans ce projet est la détection de variations moléculaires utiles pour la sélection de génotypes résistants à l'aflatoxine en pré-récolte grâce à l'intégration des connaissances acquises sur le plan de la physiologie de la sécheresse et de l'éco-physiologie des génotypes en conditions de déficit hydrique.

Notes :

<sup>1</sup> *International crops research institute for Semi-Arid Tropics.*

<sup>2</sup> Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

<sup>3</sup> Centre d'étude régional pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse.

<sup>4</sup> Conseil ouest et centre africain pour la recherche et le développement agricole.

## REFERENCES

1. GALLAIS A (1995). La sélection assistée par marqueurs. In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* Aupelf-Uref, éd. Paris : John Libbey Eurotext, 387-97.
2. STUBER CW, POLACCO M, LYNN SENIOR M (1999). Synergy of empirical breeding, marker assisted selection and genomics to increase crop yield potential. *Crop Sci*, 39 : 1571-83.
3. HALWARD TM, STALKER HT, KOCKERT GD (1993). Development of RFLP map in diploid peanut species. *Theor Appl Genet*, 87 : 379-84.

4. STALKER HT (1997). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crop Res*, 53 : 205-17.
5. BHAGWAT AS, KRISHNA TG, JAWALI N, MITRA RK (2001). Cloning and characterization of ribosomal RNA gene repeat unit from groundnut. *Plant Cell Rep*, 20 : 193-7.
6. HE G, PRAKASH CS (1997). Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 97 : 134-49.
7. SINGH AK, SMARTT J, SIMPSON CE, RAINA SN (1998). Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). polymorphism in groundnut. *Gen Res and Crop Eval*, 45 : 119-26.
8. HOPKINS MS, CASA AM, WANG T, *et al.* (1999). Discovery and characterization of polymorphic Simple Sequence Repeats (SSRs) in Peanut. *Crop Sci*, 39 : 1243-7.
9. SUBRAMANIAN V, GURTU S, NAGESWARA RAO, NIGAM SN (2000). Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome*, 43 : 656-60.
10. CHOI K, BUROW MD, CHURCH G, *et al.* (1999). Genetics and mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut germplasm. *J Nematology*, 31 : 283-90.
11. CHURCH G, SIMPSON CE, BUROW MD, PATERSON AD, STARR JD (2000). Use of RFLP markers for identification of individuals for resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. *Nematology*, 2 : 575-80.
12. TEHRYUNG K, CHOWDHURY MKU, WETZSTEIN HY (1999). A quantitative and histological comparison of GUS expression with different promoter constructs used in microprojectile bombardment of peanut tissue. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 35 : 51-6.
13. MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15 : 473-97.
14. GILL R, OZIAS-ATKINS P (1999). Thidiazuron-induced highly morphogenic and high frequency regeneration of fertile peanut (*Arachis hypogaea* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 35 : 445-50.
15. TALLURY PSR, STALKER HT, PATTEE HE, REECE P (1992). *In Vitro* culture of *Arachis hypogaea* Peg Tips. *Peanut Sci*, 19 : 78-82.
16. OZIAS-ATKINS P, SCHNALL JA, ANDERSON F, *et al.* (1993). Regeneration of transgenic peanut plants from stably transformed embryogenic callus. *Plant Sci*, 93 : 185-94.
17. BRAR G, COHEN BA, VICK CL, JOHNSON GW (1994). Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivar utilizing ACCELL technology. *Plant J*, 5 : 745-53.
18. SINGSIT C, ADANG MJ, LYNCH RE, *et al.* (1997). Expression of *Bacillus thuringiensis cryIA(C)* gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk Borer. *Trangen Res*, 69 : 169-76.



19. CHENG RL, JARRET RL, LI CX, DEMSKI JW (1997). Expression and inheritance of foreign genes in transgenic peanut plants generated by using *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 16 : 541-4.
20. SHARMA KK, ANJIAH V (2000). An efficient method for production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. *Plant Sci*, 159 : 7-19.
21. ROHINI VK, SANKARA RAO K (2001). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci*, 160 : 889-98.
22. DE PADUA VLM, PESTANA MC, MARGIS-PINHEIRO M, DE OLIVEIRA DE (2000). Electroporation of intact embryonic leaflet of peanut: gene transfer and stimulation of regeneration capacity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 36 : 374-8.
23. MAGBANUA ZV, WILDE D H, ROBERTS JK, *et al.* (2000). Field resistance to tomato spotted virus in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) expressing in antisense nucleocapsid gene sequence. *Mol Breeding*, 6 : 227-36.
24. MOORE KM, KNAUFT DA (1989). The inheritance of high oleic acid in peanut. *J Hered*, 80 : 252-3.
25. JUNG S, POWELL G, MOORE K, ABBOTT A (2000). The high oleate in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases. *Mol Gen Genet*, 263 : 796-805.
26. JUNG S, POWELL G, MOORE K, ABBOTT A (2000). The high oleate in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). II. Molecular basis and genetic of the trait. *Mol Gen Genet*, 263 : 806-11.
27. LOPEZ Y, NADAF H, SMITH OD, CONNELL JP (2000). Isolation and characterization of the D 12 fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines. *Theor Appl Genet*, 101 : 1131-8.
28. CLEVELAND TE, CARY JW, BROWN RL, *et al.* (1997). Use of biotechnology to eliminate aflatoxin in preharvest crops. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences*. Kinski University, 5 : 75-90.
29. XU H, ANNIS S, LINZ J, TRAIL F (2000). Infection and colonization of peanut pods by *Aspergillus parasiticus* and the expression of the aflatoxin biosynthesis gene, *nor-1*, in infected hyphae. *Physiol Mol Plant Pathol*, 56 : 185-96.
30. BROWN RL, CHEN ZY, CLEVELAND TE, RUSSIN JS (1999). Advances in the development of host plant resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 89 (2) : 113-7.
31. FLAHERTY JE, WEAVER MA, PAYNE GA, WOLOSHUK CP (1995). A b-Glucuronidase reporter gene construct for monitoring aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, 61 : 482-6.
32. BIANCHI-HALL CM, KEYS RD, STALKER HT (1994). A note of use of seed protein markers for

identification of aflatoxin resistance in peanut. *Peanut Sci*, 21 : 159-61.

33. MISRA JB (1997). Update on transformation of groundnut and potential genes for enhancement of quality. *IAN*, 17 : 18.

34. STRANGE RN, SUBBA RAO PV (1994). The phytoalexin response of groundnut and its role in disease resistance. *Oléagineux*, 49 : 227-33.

35. CALVO AM, HINZE LL, GARDNER HW, KELLER NP (1999). Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acid on development of *Aspergillus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 65 : 3668-73.

36. BUROW GB, GARDNER HW, KELLER NP (2000). A peanut lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonisation. *Plant Mol Biol*, 42 : 689-701.

37. LONG-XI Y, DJEBROUNI M, CHAMBERLAND H, LAFONTAINE JG, TABAEIZADEH S (1998). Chitinase: differential induction of gene expression and enzyme activity by drought stress in the wild and cultivated tomatoes. *J Plant Physiol*, 153 : 745-53.

38. CUERO RG, GODSON OO (1995). *Aspergillus flavus* induced chitosanase in germinating corn and peanut seeds: *A. flavus* for growth dominance over associated fungi and concomitant aflatoxin production. *Food Additives Contaminants*, 12 : 479-83.

39. BHATNAGAR D, CLEVELAND TE, BROWN RL, CARY JW, YU J, CHANG PK (1997). Preharvest aflatoxin contamination: elimination through biotechnology. Ecological agriculture and sustainable development. International conference, Nov. 97, Chandigarh (India) : 100-29.

40. FAJARDO JE, WANISKA RD, CUERO RG, PETIT RE (1994). Effect of chitosan and *Aspergillus flavus* on isozymes related to phenolic synthesis and protein profiles in peanut seeds. *Food Biotechnology*, 8 : 213-28.

41. PASSIOURA JPB (1982). Water in the soil-plant-atmosphere continuum. *Encycl Plant Physiol, New Series*, 12B : 5-33.

42. RIBAUT JM, HOISINGTON DA, DEUTSCH JA, JIANG C, GONZALES DE LEON D (1996). Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. I. Flowering parameter and the anthesis-silking interval. *Theor Appl Genet*, 92 : 905-14.

43. FROVA C, KRAJEWSKI P, DI FONZO N, VILLA M, SARI-GORLA M (1999). Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield component. *Theor Appl Genet*, 99 : 280-8.

44. MACKILL DJ, NGUYEN HT, JINGXIANG Z (1999). Use of molecular markers in plant improvement programs for rainfed rice. *Field Crop Res*, 64 : 177-85.

45. NAUTIYAL PC, RAVINDRA V, JOSHI Y (1995). Gas exchange and leaf water relations in two peanut cultivars of different drought tolerance. *Biol Planta*, 37 : 371-4.

46. MARONE E, ANNEROSE DJM (1995). Effect of late drought on water relation and production of field grown peanut. Poster présenté à Interdrought 95, 31 août-02 septembre 1995, Montpellier (France). In : proceedings Interdrought 95, section VII52.

47. ANNEROSE DJM (1988). Critères physiologiques pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide. *Oléagineux*, 43 : 217-21.
48. JAIN KJ, BASHA SM, HOLBROOK CC (2001). Identification of drought responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Chili : Universidad de Valparaiso. *EJB*, 4 : 9 p.
49. ROY-MACAULEY H, ZUILY-FODIL Y, KIDRIC M, PHAM THI AT, VIEIRA DA SILVA JB (1992). Effect of water stress on proteolytic activities of cell compartments of *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol Plant*, 85 : 90-6.
50. FERRARI-ILIOU R, EL MAAROUF H, PHAM Thi A, D'ARCY LAMETA A, GAREIL M, ZUILY-FODIL Y (1996). Cloning and sequencing of a cDNA encoding a Cowpea ascorbate peroxidase and gene expression under drought. *C R Soc Biol* 190 : 666.
51. EL MAAROUF H, ZUILY-FODIL Y, GAREIL M, D'ARCY-LAMETA A, PHAM THI AT (2001). Cloning and expression under drought of cDNAs coding for two PI-PLCS in cowpeas leaves. *Plant Physiol Biochem*, 39 : 167-72.
52. EL MAAROUF H, ZUILY-FODIL Y, GAREIL M, D'ARCY-LAMETA A, PHAM THI AT (1999). Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp differing in their drought tolerance. *Plant Mol Biol*, 39 : 1257-65.6.

#### Illustrations

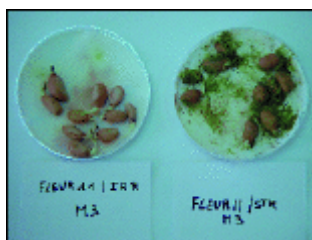


Photo 1. Effet du déficit hydrique de fin de cycle au champ sur des graines d'arachide : après 5 jours de maintien des graines en conditions d'humidité saturante et à 30 °C, une sporulation verte due à *Aspergillus flavus* apparaît uniquement sur les graines issues de plantes ayant subi une sécheresse en fin de cycle. Lors de la récolte, les gousses et les graines présentaient un aspect identique et extérieurement sain sous les deux conditions.



Photo 2. *Plants d'arachide de la variété 55-437 en pot en condition de déficit hydrique de fin de cycle, à 5 jours de la récolte. Le potentiel hydrique foliaire de la plante stressée, à gauche, est de 4 Mp. Si un arrosage est réalisé la plante stressée a la capacité de reprendre un aspect turgescents, comparable à celui de la plante de droite.*

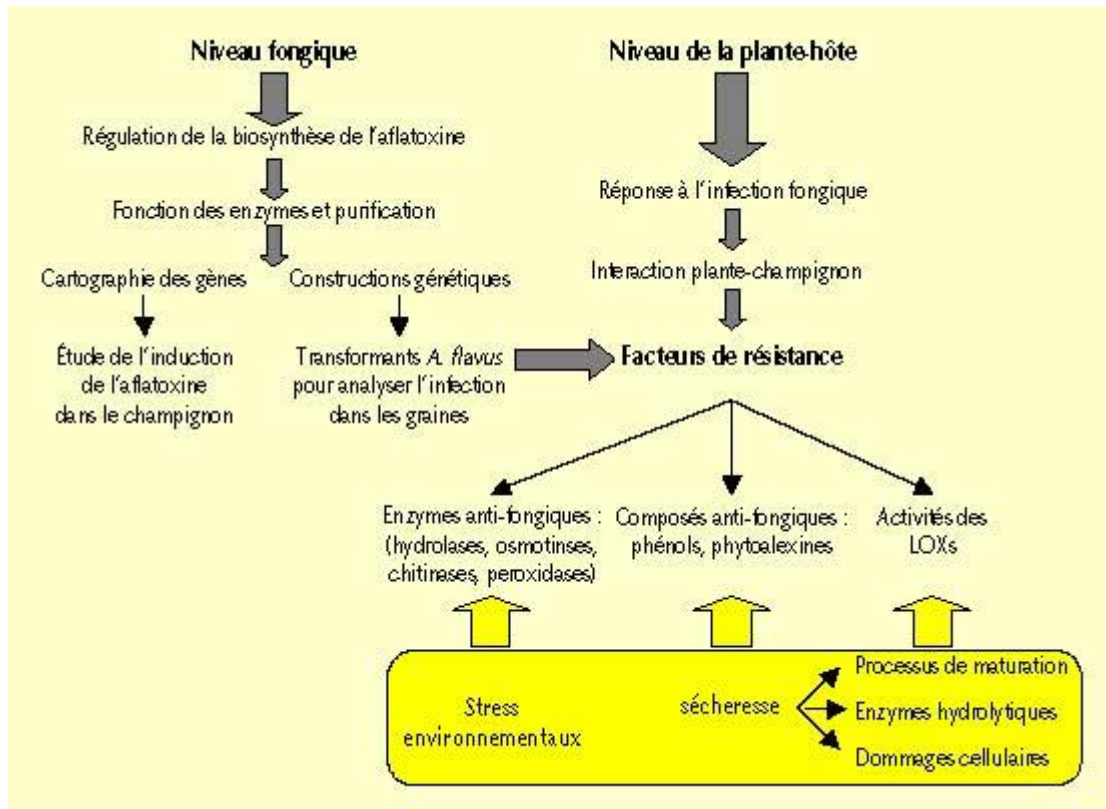


Figure 1. *Schéma théorique montrant une intégration des recherches en ingénierie génétique pour la résistance à l'aflatoxine en pré-récolte de l'arachide.*

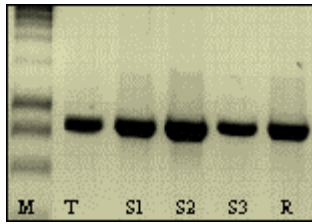


Figure 2. Expression d'une phospholipase sur la variété Fleur 11 en fonction du stress hydrique : m est un marqueur de taille, T est le témoin bien arrosé, S1, un stress modéré, S2 un stress moyen, S3, un stress sévère et R représente la plante réhydraté après un stress sévère.

---