

Programmation 1993-1997

**Biotechnologies appliquées
à l'amélioration des plantes tropicales :
Biotrop, unité de recherche du CIRAD**



Le CIRAD, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, est un organisme scientifique spécialisé en agriculture des régions tropicales et subtropicales. Sous la forme d'un établissement public, il est né en 1984 de la fusion d'instituts de recherche en sciences agronomiques, vétérinaires, forestières et agroalimentaires des régions chaudes.

Sa mission : contribuer au développement de ces régions par des recherches, des réalisations expérimentales, la formation, l'information scientifique et technique.

Il emploie 1 850 personnes, dont 920 cadres, qui interviennent dans une cinquantaine de pays. Son budget s'élève à près de 1 milliard de francs, dont plus de la moitié provient de fonds publics.

Le CIRAD comprend sept départements de recherche : cultures annuelles (CIRAD-CA) ; cultures pérennes (CIRAD-CP) ; productions fruitières et horticoles (CIRAD-FLHOR) ; forêts (CIRAD-Forêt) ; élevage et médecine vétérinaire (CIRAD-EMVT) ; systèmes agroalimentaires et ruraux (CIRAD-SAR) ; gestion, recherche, documentation et appui technique (CIRAD-GERDAT). Le CIRAD travaille dans ses propres centres de recherche, au sein de structures nationales de recherche agronomique des pays partenaires, ou en appui à des opérations de développement.

Programmation 1993-1997

Biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales : Biotrop, unité de recherche du CIRAD

**Centre de coopération internationale
en recherche agronomique
pour le développement**

Sommaire

Les enjeux	6
Biotechnologies et recherche agronomique	6
Les biotechnologies végétales au CIRAD	7
Les missions	14
Biotrop, unité de recherche commune du CIRAD	14
La formation	16
Le partenariat	16
La valorisation	17
L'organisation	18
Organisation interne	20
Données budgétaires	20
Communication scientifique	21
Formation	21
La stratégie	23
Le laboratoire de culture <i>in vitro</i>	24
Le laboratoire d'histologie	26
Le laboratoire Agétrop	27
Le laboratoire Igé pam	28
Annexes	31
Les activités par laboratoire	33
Sigles et abréviations	55

L'unité de recherche commune Biotrop, unité de biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales, a été créée le 1^{er} janvier 1991. Unité du département CIRAD-GERDAT, elle recouvre depuis cette date les activités conduites jusqu'alors par trois laboratoires communs, qui en constituent toujours le soubassement : les laboratoires de culture *in vitro*, d'histologie et d'analyse du génome des espèces tropicales.

En mai 1992, Biotrop a connu sa première revue externe, établie à partir d'un bilan scientifique des cinq années précédentes. Le rapport de la commission et la réponse de Biotrop ont été présentés à la commission de programmation et de coordination scientifique (CPCS) puis réexaminés par le conseil scientifique du CIRAD. La suite logique de cette évaluation consistait pour Biotrop à établir son schéma pluriannuel de programmation, qui a été soumis au conseil scientifique le 24 février 1993.

Pour répondre aux recommandations des différentes instances, l'unité s'est dotée depuis le 1^{er} janvier 1993 d'une quatrième structure, le laboratoire d'ingénierie génétique et de pathologie moléculaire, Igé pam. Les pôles d'activité d'Igé pam sont de deux types : d'une part une implication dans une recherche thématique, d'autre part un rôle de structure d'accueil et de support pour l'étude moléculaire des populations de parasites et de pathogènes des plantes.

La mission de Biotrop, désormais élargie, consiste à « conduire des recherches sur l'ingénierie génétique, l'analyse du génome des plantes et de leurs pathogènes, les techniques de culture *in vitro* et les observations histocytologiques associées en vue de l'utilisation des biotechnologies modernes pour l'amélioration des espèces des régions chaudes ». Un tel mandat est en conformité avec l'un des grands enjeux du CIRAD définis dans son projet d'entreprise : « connaître mieux les espèces tropicales [...] pour mieux en tirer parti ».

Des agents de plusieurs départements du CIRAD exercent leurs activités dans l'unité de recherche commune Biotrop, gérée par le CIRAD-GERDAT. Un comité de pilotage rassemblant les différents partenaires a été constitué par le conseil scientifique du CIRAD et la commission de programmation et de coordination scientifique au début de 1993. Il suit la mise en œuvre du schéma pluriannuel de programmation de l'unité en donnant son avis sur la proposition de budget, en arbitrant entre les différentes priorités affichées dans le plan de travail et en proposant les coopérations et les partenariats susceptibles de contribuer à l'amélioration de l'activité de l'unité.

Les enjeux

Les outils issus de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire servent aux scientifiques pour étudier les phénomènes biologiques au niveau le plus fin, celui de l'information génétique. Ils interviennent aussi dans de nouvelles stratégies d'action concernant des domaines aussi variés que la santé, l'agriculture et l'agroalimentaire, l'environnement, voire l'énergie et les matériaux.

Pour la première fois dans l'histoire de la biologie, des outils et des méthodes d'investigation permettent de transgresser certaines contraintes liées au vivant, comme la reproduction à l'identique des organismes ou le contournement des barrières liées à la reproduction sexuée.

Biotechnologies et recherche agronomique

L'évolution des biotechnologies appliquées à l'agriculture et à l'agroalimentaire est marquée par deux aspects.

D'une part, les perspectives n'ont pas fondamentalement évolué depuis les années 80, bien que les connaissances de base aient progressé de manière significative. Si les outils mis au point ont confirmé leur puissance extraordinaire pour l'approfondissement des connaissances, les objectifs d'application n'ont pas varié, même si des informations supplémentaires ont permis d'en préciser la pertinence.

D'autre part, le nombre des produits issus des biotechnologies reste encore limité, ce qui contraste avec l'optimisme affiché auparavant, qui laissait supposer un développement beaucoup plus rapide.

A une appréciation erronée des difficultés de développement de ces techniques — en particulier, concernant le passage du laboratoire à la production industrielle — s'est ajouté le poids des réglementations mises en place, qui font suite aux inquiétudes exprimées par l'opinion publique. Il existe en effet de nombreuses inconnues quant aux risques qui pourraient résulter de l'utilisation de produits « mutants », non « naturels », pour l'environnement et la santé humaine.

Cependant, les biotechnologies devraient contribuer à répondre aux trois grands défis auxquels est confrontée la recherche agronomique de la prochaine décennie : respecter et mieux gérer l'environnement ; nourrir une population en augmentation constante ; aménager les espaces de manière plus équilibrée en luttant contre la croissance urbaine et la désertification des campagnes.

Concrètement, il s'agit de réduire les intrants dans l'agriculture, d'améliorer la production agricole, de diversifier les productions, de mieux contrôler les processus de reproduction.

La diminution de l'usage des pesticides et des engrais, allée à une meilleure gestion des terres, implique la mise en œuvre de recherches nouvelles sur la biologie des populations, l'assimilation des éléments nutritifs par les plantes, la nature des interactions hôte-pathogène et l'identification de gènes de résistance.

Pour améliorer la production agricole, les recherches sur la biologie de l'adaptation aux facteurs de l'environnement doivent conduire à la mise en évidence des mécanismes de la tolérance à des stress particuliers. L'identification des déterminants génétiques de la qualité nutritionnelle, organoleptique ou technologique des productions agricoles passe par des recherches sur la biologie du développement qui associent des approches génétiques, physiologiques et biochimiques.

Diversifier les productions par la recherche de produits de substitution afin de répondre à des besoins alimentaires ou industriels suppose une meilleure gestion de la diversité biologique en vue de sa préservation et surtout de sa valorisation.

La maîtrise des processus de reproduction, ou la construction d'organismes mieux adaptés à des conditions d'utilisation et à des besoins spécifiques, suppose des études sur la biologie de la floraison, de la fécondation et du développement des embryons.

Les biotechnologies végétales au CIRAD

Trois domaines doivent plus particulièrement être maîtrisés par le CIRAD : les technologies de l'*in vitro* appliquées aux cellules et aux tissus pour la multiplication clonale et l'amélioration de certaines étapes de la sélection ; les techniques de la biologie moléculaire appliquées aux génomes qui permettent d'en caractériser les « fonctions », avec des applications dans le domaine du diagnostic et de l'aide à la sélection ; le génie génétique proprement dit qui, en transformant le génome, modifie les caractéristiques des êtres vivants.

Au travers de son unité de recherche Biotrop, le CIRAD, compte tenu de son mandat de conduire des recherches en vue du développement des pays du Sud, doit opérer des choix stratégiques en fonction de deux objectifs : bien maîtriser les méthodes et les outils des biotechnologies pour les rendre accessibles et opérationnels dans les différentes étapes de l'amélioration des plantes, tant en amont qu'en aval de la création variétale ; choisir des modèles de plantes et des sujets de recherche en fonction des demandes exprimées par les partenaires du développement *via* les départements du CIRAD, tout en évitant une dispersion des moyens et des compétences, préjudiciable à l'accumulation des connaissances.

Un tel enjeu, ciblé sur des applications et sur la valorisation des résultats scientifiques, nécessite le maintien et le développement des savoirs fondamentaux nécessaires à la maîtrise de ces techniques, parallèlement au travail réalisé sur des plantes et des thèmes issus des projets de recherche et de développement conduits par les départements du CIRAD.

La micropropagation

Parmi les activités de Biotrop, les applications de la micropropagation sont les plus aisément valorisables. La maîtrise atteinte dans la régénération de plantes en culture *in vitro* — qu'il s'agisse du microbouturage, de la prolifération de méristèmes, de l'embryogenèse somatique — confère au CIRAD un avantage certain pour plusieurs espèces tropicales. Le clonage est ou sera une technique incontournable de l'exploitation agricole de ces espèces. Cette technique a trois fonctions.

Valoriser la sélection par la multiplication conforme

L'état sanitaire des vitroplants est un élément essentiel pour la conservation des ressources génétiques et pour les activités liées à l'indexation du matériel végétal en transit. L'utilisation de vitroplants sains associée à la pratique d'une jachère, par exemple pour les cultures de bananiers, évite des traitements nématocides coûteux et dégradants pour l'environnement durant plusieurs cycles de culture.

Chez certaines espèces tropicales d'importance économique majeure, des contraintes inhérentes à la plante rendent la multiplication conforme par voie sexuée inopérante ou font obstacle aux techniques efficaces de multiplication horticole. La micropropagation est alors le relais à mettre en œuvre pour la diffusion à grande échelle des meilleurs génotypes reconnus par le sélectionneur (palmier à huile, hévéa et distribution d'hybrides F_1 ou F_2 de caféier...).

Mettre en place des champs d'expérimentation pour évaluer le comportement sur le terrain des plants issus de culture *in vitro* et faire la démonstration de leur valeur ajoutée est le préalable qui conditionne le succès d'une technique de micropropagation. Le CIRAD a la possibilité de mettre en œuvre cette démarche, grâce à une articulation étroite entre Biotrop et les programmes des départements. L'analyse de la plus-value agronomique du matériel micropropagé nécessite des relations suivies entre les équipes de terrain et les chercheurs des laboratoires, tant pour l'échange d'informations scientifiques que pour la résolution des problèmes tels que les variations somaclonales que génère parfois le passage *in vitro*.

Maîtriser l'embryogenèse somatique

La perspective d'un développement industriel implique des recherches en vue d'adapter les procédures de laboratoire aux contraintes d'une production de masse. Une évolution des techniques vers une plus grande automatisation et industrialisation est prévisible. Les recherches conduites par Biotrop doivent tenir compte de cette évolution. Elle passe par un accroissement nécessaire des connaissances, notamment sur l'embryogenèse somatique en milieu liquide, qui doit devenir un procédé totalement utilisable à grande échelle. D'ici une dizaine d'années, les techniques d'embryogenèse somatique en milieu liquide, d'enrobage et de création de graines artificielles seront opérationnelles. Les moyens de production industrielle seront hautement techniques et nécessiteront peu de main-d'œuvre. Les graines artificielles produites apporteront un « plus » incontestable sous la forme d'embryons génétiquement transformés, protégés par un enrobage synthétique.

Maîtriser la régénération *in vitro* pour la transformation génétique

Les connaissances en transformation génétique, produit hybride de la biologie moléculaire et de la biologie cellulaire, restent limitées et les recherches très empiriques. La

communauté scientifique s'accorde à reconnaître que la maîtrise de la régénération de cellules transformées est souvent le premier des facteurs limitants dans les expériences de transformation. Toutes les méthodes actuelles de transformation constituent un stress perturbant le métabolisme, notamment l'aptitude à la régénération. Or, le CIRAD dispose d'un savoir-faire compétitif en matière de régénération des plantes. La démarche logique consiste à utiliser cette compétence en complément de la micropropagation.

Améliorer et maîtriser les procédés de culture *in vitro* s'inscrit alors dans une logique prioritaire de réponse aux besoins du développement.

La transformation génétique

La possibilité de transférer des gènes de tout organisme vivant dans le génome des plantes cultivées pour leur conférer des propriétés nouvelles s'est matérialisée en 1984 par l'obtention des premières plantes transgéniques. Cette technique offre aujourd'hui de formidables potentialités pour protéger les plantes, comprendre puis manipuler certains de leurs processus biochimiques et physiologiques, améliorer notre connaissance de l'organisation et de la régulation de leur génome.

L'investissement dans ces nouvelles biotechnologies apparaît nécessaire à plusieurs titres :

- elles peuvent avoir un impact potentiel très fort sur le développement agricole ;
- les pays partenaires demandent à disposer de variétés génétiquement résistantes aux agressions ou de ces technologies, alors que les méthodes conventionnelles de sélection sont de plus en plus prises en charge par les systèmes de recherche nationaux ;
- elles permettent d'utiliser et de valoriser les acquis ou l'avance du CIRAD en matière de systèmes de régénération (sur lesquels repose *in fine* l'efficacité de la transformation) et de techniques opérationnelles de micropropagation, pour lesquelles la diffusion rapide de matériels transgéniques constituera une originalité ;
- des collaborations directes peuvent être établies avec des laboratoires internationaux de biologie moléculaire travaillant sur le clonage de gènes et de promoteurs, partenaires de projets de transfert de gènes originaux ;
- elles sont, comme toute technologie émergente, source de rapide notoriété scientifique. De plus, ce domaine de recherche est encore peu investi pour les cultures tropicales.

Le développement de projets de transfert de gènes est éminemment fédérateur, car il génère l'association de chercheurs des quatre laboratoires constitutifs de Biotrop, de chercheurs du CIRAD spécialisés dans d'autres disciplines — sélectionneurs en amont et en aval du projet, phytopathologistes, entomologistes, physiologistes, etc. —, et enfin de chercheurs d'autres institutions nationales (INRA, ORSTOM, Université) ou internationales autour de projets de recherche finalisés.

Le champ ouvert à la transformation génétique est extrêmement vaste. Le choix est fait de donner la priorité aux espèces tropicales pour lesquelles on trouve au CIRAD un système de régénération compatible avec la méthode de transformation, un programme (dans les départements) de sélection fort et demandeur, et des objectifs d'amélioration difficiles ou impossibles à atteindre par des méthodes conventionnelles.

Au-delà de ce principe général, une analyse de chaque cas doit être faite en tenant compte de l'état d'avancement des recherches des autres laboratoires, publics ou privés, sur le plan international, et des possibilités d'alliances. Cette analyse doit aussi porter sur la valeur d'un cas précis en tant que modèle pour d'autres.

A terme, Biotrop doit savoir mettre en œuvre les trois méthodes de transformation ayant permis le transfert répétable et stable de gènes chez les plantes supérieures : transfert *via* les agrobactéries, transfert direct sur les protoplastes ou utilisation de la biolistique.

Le développement de systèmes de transformation demande la maîtrise des étapes suivantes :

- optimiser les systèmes de régénération en vue du transfert de gènes ;
- identifier l'agent le plus efficace pour la sélection des cellules transformées, et le promoteur constitutif permettant la meilleure expression du gène dans la plante transgénique ;
- mettre au point la méthode de transfert ;
- utiliser des outils biochimiques, moléculaires et histocytologiques nécessaires à l'étude du mode d'intégration du transgène dans le génome, de la localisation et du niveau de son expression et de sa transmission dans les descendances ;
- observer sur le terrain son niveau d'expression et son incidence agronomique ;
- étudier la conformité du matériel régénéré et l'intégration du transgène (et, le cas échéant, recroiser la plante transgénique par la variété d'origine) ;
- transférer le transgène dans d'autres variétés par voie sexuée en contrôlant le transfert, voire en l'accéléralant par l'assistance des marqueurs moléculaires.

Il n'entre pas dans le rôle de Biotrop de mettre au point d'autres méthodes ou de nouveaux protocoles de transfert de gènes, mais l'unité doit s'employer à adapter rapidement les innovations technologiques aux plantes tropicales.

Si l'unité ne doit pas orienter son activité sur le clonage de nouvelles séquences de promoteurs, elle devra cependant, à l'avenir, savoir modifier ponctuellement des promoteurs existants pour rendre les constructions transférées plus efficaces dans les systèmes biologiques particuliers qu'elle étudie. Le clonage de promoteurs « organes ou tissus spécifiques » ou induits par des stimuli, qui est le travail à part entière d'une équipe de chercheurs, doit être développé dans d'autres laboratoires de biologie moléculaire partenaires ou obtenu par des échanges.

En ce qui concerne les gènes agronomiquement utiles à transférer, l'effort de Biotrop porte actuellement sur le clonage et la modification de gènes d'endotoxines de *Bacillus thuringiensis*, et sur leur association avec d'autres gènes conférant également une protection vis-à-vis des ravageurs, pour l'utilisation de leurs produits comme biopesticides ou leur transfert dans les plantes. La synthèse de gènes à partir de la séquence de gènes natifs de *B. thuringiensis*, dont l'expression dans les plantes est supérieure, sera réalisée en collaboration. Biotrop devra cependant procéder à la fusion finale de ces gènes entre eux et avec les promoteurs à expression spécifique qui assurent une expression optimale dans les plantes en leur conférant la meilleure protection.

A l'avenir, d'autres types de gènes pourront être clonés par Biotrop ou être obtenus par des collaborations et transférés dans les espèces tropicales : gènes de résistance aux virus, gènes de résistance aux pathogènes fongiques. A plus long terme, l'amélioration de la qualité des produits récoltés, une modification de l'architecture de la plante, une tolérance accrue aux agressions abiotiques ou la synthèse de nouveaux produits sont d'autres objectifs qui pourraient également être atteints par la transgénose.

La transformation génétique, légitime de par les potentialités qu'elle offre, nécessite une prise en compte des contraintes qu'elle entraîne, contraintes encore loin d'être toutes parfaitement définies. D'ores et déjà, la législation française impose la mise en conformité des installations du CIRAD pour l'accueil d'organismes génétiquement modifiés. Le CIRAD ne pouvant généralement procéder en France à des essais en champ sur des plantes tropicales, des possibilités d'expérimentation devront être recherchées auprès

de ses partenaires d'outre-mer, alors que la réglementation dans ces pays est actuellement inexistante.

Pour certaines espèces, la diffusion de plantes transgéniques dont la multiplication aura été réalisée par micropropagation posera le problème des risques inhérents à un matériel d'origine somaclonale. Des plantations multiclonales, dont il conviendra de définir la configuration spatiale, devraient permettre de se prémunir vis-à-vis d'agents pathogènes inféodés à un seul clone. Enfin, l'obtention de brevets pour les gènes et les techniques est un point non résolu, tandis que l'acceptation par le public des produits issus de la transgénose reste encore dans le domaine de l'hypothèse.

Les ressources génétiques végétales

Le CIRAD opère dans une large gamme d'écosystèmes et entretient des programmes d'amélioration génétique pour un grand nombre d'espèces tropicales et méditerranéennes. Pour être efficaces, de tels programmes nécessitent la disponibilité d'une grande diversité génétique et son utilisation raisonnée. Ainsi, le CIRAD a toujours été très actif en matière de collecte, de conservation et d'évaluation de la diversité génétique des espèces cultivées et de leurs espèces apparentées. Le CIRAD n'a, pour aucune espèce, mandat de conserver l'ensemble de la biodiversité, mais a constitué et maintient des collections dites de travail. Elles servent pour la création variétale et sont à l'origine de courants d'échanges internationaux. Dans le domaine des ressources génétiques, le CIRAD doit veiller à remplir son rôle.

Conserver et échanger les collections

Biotrop conserve, sous forme *in vitro*, des collections de génotypes de canne à sucre et d'ananas, et assume des activités de transit et d'indexation du matériel végétal pour la distribution de boutures ou de vitroplants certifiés sains de canne à sucre et de bananier. Parties intégrantes des programmes du CIRAD pour ses filières, ces activités de service sont appelées à se maintenir, car stratégiquement importantes pour valoriser les collections du CIRAD.

Biotrop conduit les recherches sur les méthodes, parmi lesquelles la cryoconservation — notamment celle d'apex caulinaires de canne à sucre ou de suspensions cellulaires de *Citrus* — tient une place de plus en plus large. En revanche, les activités de service devraient être transférées au sein d'une autre structure, dont les bases doivent être définies par le CIRAD.

Analyser les collections pour optimiser la création variétale

La diversité morphologique, agronomique et enzymatique (électrophorèse d'isozymes) de la plupart des espèces cultivées étudiées par le CIRAD a été analysée. L'analyse approfondie de la diversité au niveau de l'ADN est en cours pour le cacaoyer, la canne à sucre, l'hévéa, le bananier et le sorgho. Les travaux sur les plantes déjà étudiées doivent être poursuivis, et d'autres engagés sur de nouvelles plantes. Ils permettront de définir des collections, réduites mais représentatives, qui seront caractérisées de manière très détaillée, et ainsi de guider les stratégies de conservation des ressources génétiques et de création variétale.

Les analyses de diversité moléculaire connaissent généralement une phase exploratoire très lourde, suivie d'une phase d'analyses routinières simplifiées et moins intensives. Au

CIRAD, ces analyses portent sur de très nombreuses plantes et doivent être effectuées sur une gamme très large de matériels. On a, par ailleurs, le souci d'identifier des techniques simples qui pourront être appliquées en milieu tropical près de sites de prospections. C'est pourquoi des recherches méthodologiques sont prévues, afin de mettre au point des outils efficaces et simples pour évaluer la biodiversité végétale. L'estimation de l'efficacité demande la comparaison des résultats obtenus sur toute une gamme de critères, qu'ils soient botaniques, agronomiques ou moléculaires, sur des modèles biologiques contrastés, notamment par le mode de reproduction, le taux de ploïdie ou le type de distribution géographique.

Des analyses de diversité moléculaire sont également pratiquées au CIRAD sur les parasites des différentes plantes, parallèlement à des études de diversité du pouvoir pathogène, ce qui ouvre la voie à l'analyse précise de l'interdépendance des structures génétiques de l'hôte et du parasite. Le CIRAD, avec ses implantations hors des zones de distribution des plantes tropicales — qui conviennent pour réaliser des essais avec des souches importées — et ses laboratoires de biologie moléculaire, dispose des atouts nécessaires pour développer une compétence particulière sur ce thème. Cette analyse a conduit à la mise en place au sein de l'unité du laboratoire Igéam, qui accueille les phytopathologistes des départements désireux de s'investir dans cette thématique nouvelle.

Les enjeux sont importants, et mieux connaître les interactions hôte-parasite présente de multiples avantages. En particulier, on peut ainsi lier degré d'agressivité d'un pathogène donné et marqueurs moléculaires, déterminer les facteurs génétiques contrôlant la réaction d'une plante vis-à-vis des différentes souches reconnues d'un pathogène dont on aura étudié par ailleurs les populations et la variabilité, et disposer d'outils d'aide à la décision en matière de contrôle parasitaire.

La cartographie du génome

Déterminisme génétique des caractères et sélection assistée par marqueurs

La connaissance du génome des plantes tropicales, et en particulier du déterminisme des caractères à sélectionner, est généralement peu développée. Les sélectionneurs sont toujours à la recherche de marqueurs simples, insensibles aux conditions de milieu, pour suivre les variations de différents caractères agronomiques. Ces marqueurs pourraient alors jouer le rôle de marqueurs précoces de sélection. Le développement des techniques de biologie moléculaire, et en particulier des RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), et des SSR (*simple sequence repeat*) permet d'effectuer un marquage dense de l'ensemble du génome et d'envisager une sélection assistée par marqueurs. De telles cartes denses ont déjà été établies avec succès pour plusieurs espèces végétales, dont le maïs et la tomate. Elles ont permis de localiser et de suivre au cours des cycles de sélection un certain nombre de gènes impliqués dans les caractères de résistance. Un autre apport de ces marqueurs moléculaires est la meilleure compréhension du contrôle des caractères quantitatifs, multigéniques, et leur décomposition en composantes majeures. Alors que la génétique quantitative classique aboutit à la seule résultante des effets de tous les gènes impliqués dans les caractères quantitatifs, l'utilisation des marqueurs moléculaires est une voie d'accès à chacun d'eux. Leur part respective dans la variation observée pourra être estimée grâce à des modèles statistiques adé-

quats ; les effets des QTL (*quantitative trait loci*) identifiés pourront alors être testés pour leur stabilité dans différents milieux environnementaux, et les plus « robustes » utilisés pendant les cycles de sélection.

Connaissance du génome

Chez certaines espèces, tel le bananier, de nombreux remaniements structuraux sont apparus au cours de l'évolution. La présence de translocations et d'inversions conditionne de façon prépondérante les stratégies de sélection quand il s'agit de brasser le matériel génétique ou de recréer des plantes stériles, sans graines. Les marqueurs moléculaires apportent un outil de choix pour localiser ces remaniements structuraux et donc assurer une meilleure gestion des phénomènes de stérilité et de fertilité au cours des cycles de sélection.

Marquage moléculaire et sélection

L'analyse à grande échelle de centaines d'échantillons sera une étape indispensable à franchir si l'on veut mettre à la disposition des sélectionneurs de véritables outils de sélection s'appuyant sur le marquage génétique.

Actuellement, les RFLP constituent un outil de marquage génétique très puissant, mais présentent de lourdes contraintes de mise en œuvre pratique et de coût. Les techniques de PCR (*polymerase chain reaction*) se développent par ailleurs, mais n'offrent pas encore les mêmes performances en précision, répétabilité et puissance de marquage.

De nouvelles stratégies sont donc à développer en vue de valoriser et de combiner les avantages de chaque technique disponible (RFLP, microsatellites, PCR, séquençage, etc.) et d'aboutir à des tests de diagnostic précoce de type « + » ou « - » utilisables sur le terrain. Cette démarche est d'autant plus nécessaire que les sélectionneurs du CIRAD sont bien souvent contraints à travailler avec des équipements très limités.

L'enjeu est donc de valoriser les progrès acquis par les techniques de RFLP dans la connaissance du génome (analyse de la polyploïdie, des introgressions interspécifiques, des remaniements structuraux) et du déterminisme des caractères d'intérêt agronomique, et de rendre facilement réalisable et efficace une sélection assistée par marqueurs.

Des méthodes très rapides de tri d'individus par marqueurs auront par ailleurs autant d'intérêt pour la caractérisation des ressources génétiques que pour la sélection assistée par marqueurs. Elles facilitent l'évaluation rapide des collections pour en améliorer la gestion et l'utilisation rationnelle.

Les missions

Biotrop, unité de recherche commune du CIRAD

Les unités de recherche du CIRAD, lieux de production, d'accumulation et de synthèse de connaissances et de méthodes, sont structurées en fonction des domaines scientifiques nécessaires au déploiement de l'activité de leurs départements. Elles peuvent être organisées en laboratoires, et leur activité est orientée selon les besoins des programmes du département au travers de l'appui scientifique et méthodologique qu'elles apportent aux projets de recherche et de développement. Elles remplissent un rôle d'animation et d'échange auprès de la communauté scientifique que forment les agents qui lui sont rattachés, tout particulièrement les expatriés. Elles apportent un appui dans le domaine de la documentation, de la formation et des publications scientifiques. Elles sont, dans leur spécialité, l'interlocuteur de leur département auprès de la communauté scientifique française et internationale. Certaines de ces unités, par leur thématique scientifique, sont communes à l'ensemble du CIRAD et réunissent des moyens matériels et humains provenant de plusieurs départements.

C'est le cas de l'unité de recherche Biotrop rattachée au département CIRAD-GERDAT, qui a vocation à accueillir ce type de structure. L'unité dispose d'un budget individualisé et de moyens humains qui valorisent les outils et les méthodes mis à la disposition de la communauté scientifique du CIRAD.

Des thèmes de recherche fédérateurs

L'accueil, fonction importante de l'unité, correspondait à des besoins en recherche exprimés par les programmes. La situation actuelle est un reflet de l'histoire, c'est-à-dire de la politique relative aux biotechnologies végétales qui est menée par les départements. La demande, exprimée par les pays en développement au travers des départements, se structure désormais en thématiques de recherche — création de plantes résistantes aux parasites et pathogènes par génie génétique, multiplication conforme des meilleurs génotypes par régénération *in vitro*, choix dans les ressources génétiques des génotypes à intégrer dans les dispositifs d'amélioration, assistance à la sélection par des marqueurs moléculaires, etc.

La première fonction de l'unité est la fonction de recherche sur des thématiques communes au bénéfice des départements. Ces projets, nécessairement fédérateurs, pro-

posent un pôle suffisamment intéressant pour que les départements continuent d'y programmer et d'y conduire les recherches qu'ils souhaitent. Biotrop doit atteindre une masse critique de chercheurs qui s'investissent dans une thématique et qui répondent à la demande en provenance directe des départements. L'unité poursuivra d'autant plus facilement sa politique d'accueil de chercheurs et de techniciens dépendant administrativement des départements que leurs sujets de recherches seront en parfaite concordance avec les orientations scientifiques de l'unité, qui ne peuvent être raisonnablement menées que grâce à ce concours.

Outre l'appui aux départements, Biotrop doit s'efforcer de trouver sa propre identité. C'est par des thèmes fédérateurs que peut se justifier l'investissement humain, structurel et matériel du CIRAD-GERDAT, qui est mis à la disposition de la communauté du CIRAD. Il est nécessaire de développer des thèmes de recherche d'intérêt commun, garants d'une compétence applicable à une multiplicité de plantes, et de maintenir la diversité des espèces analysées, chacune correspondant à un besoin spécifique en recherche, mais l'ensemble impliquant une grande richesse en connaissances scientifiques. Il faut également conserver un compromis entre la diversité nécessaire pour permettre une analyse comparée d'une part et le risque d'une dispersion des actions sur un trop grand nombre d'espèces d'autre part. Ce risque latent est inhérent à la structure même du CIRAD, car chaque département a le souci légitime de mettre en œuvre sur les espèces dont il a la charge des méthodologies mises au point ou en cours d'application sur d'autres espèces.

Une stratégie d'action concertée

L'émergence de nouvelles méthodes à acquérir pour les besoins des départements justifie un renforcement du personnel CIRAD-GERDAT, noyau de l'unité. Chercheurs et techniciens de ce département doivent avoir un rôle moteur d'appui aux programmes par plantes, mais aussi, de coordination d'un ensemble thématique.

L'élaboration du schéma pluriannuel de programmation de Biotrop ne peut que reposer sur la concertation, afin de prendre en compte et de refléter une demande multiforme. Celle-ci émane de la direction scientifique du CIRAD, de celle du département GERDAT, des départements.

Pour que l'activité globale de recherche de Biotrop réponde bien aux besoins des usagers, tout en préservant une certaine autonomie dans la conduite des projets propres à l'unité, et pour suivre l'exécution du schéma pluriannuel, un comité de pilotage a été mis en place. Sa mission est de garantir cet équilibre. Pour ce faire, il examine le programme de travail de l'unité proposé par son responsable en confrontant les objectifs fixés, les besoins des départements actionnaires et les moyens financiers et humains disponibles. Il arbitre les différentes priorités du plan de travail et donne son avis sur le budget annuel de l'unité, dont le responsable est l'ordonnateur par délégation du directeur du département CIRAD-GERDAT. Il assure le suivi des actions engagées et veille à leur adéquation avec les orientations fixées. Il propose une stratégie de développement permettant de faire les choix indispensables pour décider : d'arrêter, à très court terme, certaines actions qui se devront d'être transférées dans une unité de recherche plus appliquée ou de prévalorisation ; d'arrêter, à moyen terme, des actions qui ne seraient plus prioritaires. Il conviendra pour ce faire de définir un objectif proche, cohérent et réaliste qui mette un point final à ce type d'action ; de concentrer les efforts sur un nombre restreint d'actions ambitieuses dans un cadre scientifique et dans leurs impacts sur le développement.

La formation

La fonction de recherche de Biotrop va de pair avec celle de la formation, qu'il s'agisse de celle de jeunes chercheurs français composant un vivier pour les futurs recrutements dont le CIRAD a besoin, ou de celle des partenaires étrangers avec lesquels nous coopérons. En ce qui concerne les biotechnologies, il existe peu d'autres lieux où cette formation spécialisée puisse être assurée. Cette fonction importante conforte l'unité dans sa fonction de recherche, même si elle génère des obligations d'encadrement scientifique. Elle renforce aussi nos liens avec les universités.

L'accueil assuré par l'unité, qui a atteint sa limite supérieure, devra être adapté aux moyens matériels et aux capacités d'encadrement. Les jeunes scientifiques représentent néanmoins un potentiel qu'il serait dangereux de trop restreindre. La mise en place d'une nouvelle dynamique essentiellement fondée sur l'augmentation du nombre de postdoctorants est en cours.

Durant cette phase transitoire, il semble inopportun d'accueillir un allocataire de recherche sur une plante nouvelle pour Biotrop sans qu'un encadrement efficace soit garanti par un chercheur ou un postdoctorant de la même filière.

Deux impératifs se dégagent de ces constatations. Les capacités d'accueil doivent être renforcées afin d'assurer la formation et l'encadrement des jeunes chercheurs, en particulier de ceux qui viennent d'outre-mer, auxquels il convient d'apporter l'appui scientifique et technique indispensable pour assurer le transfert de méthodologies. D'autre part, le personnel du CIRAD-GERDAT spécialisé dans certaines thématiques doit être renforcé.

Dans le cadre du comité de pilotage, en liaison étroite avec le chargé de mission de la mission connaissance et amélioration des plantes (MICAP), une réflexion sera conduite sur la durée du schéma pluriannuel de programmation en vue d'un redéploiement des effectifs du CIRAD-GERDAT prenant en compte ces impératifs.

Le partenariat

Dans le domaine des biotechnologies, Biotrop n'est qu'un élément d'un ensemble beaucoup plus vaste, interne ou externe au CIRAD. Au sein de notre institution, c'est l'unité la mieux équipée, où se regroupent nombre de spécialistes. Son rôle moteur et centralisateur dans le recueil et l'échange d'informations, en liaison avec ses partenaires montpelliérains, sera amplifié dans un avenir proche grâce à la délocalisation des départements CIRAD-EMVT et CIRAD-Forêt, et plus particulièrement du laboratoire de biotechnologie des symbioses forestières tropicales (BSFT). Une réflexion devra être menée pour valoriser au mieux la synergie induite par cette future proximité géographique.

Biotrop n'ayant pas la capacité matérielle de répondre à toutes les demandes émanant des départements, ceux-ci ont, légitimement, développé des partenariats avec d'autres institutions. Ces partenariats sont généralement bénéfiques par les liens qu'ils créent entre le CIRAD et d'autres équipes appartenant à l'ORSTOM, l'INRA, le CNRS, les universités, etc. Ils méritent d'être poursuivis et renforcés, à condition que le CIRAD en tire une plus-value effective. La politique de Biotrop, avec l'appui de la mission connais-

sance et amélioration des plantes (MICAP), consiste à renforcer la coordination par l'organisation de réunions et par l'élaboration d'actions thématiques programmées (ATP).

Toutefois, la diversité des thématiques actuellement en cours et l'intérêt que chacune présente pour le CIRAD amènent à préconiser que les demandes soient traitées préférentiellement par Biotrop. Il importe que les départements, notamment le CIRAD-GERDAT, puissent dégager les moyens humains nécessaires pour qu'une masse critique de chercheurs soit en place sur chaque thématique. Cette politique est encore plus indispensable pour des domaines d'activité que l'unité se propose d'investir, comme la transformation génétique.

La valorisation

La notoriété de l'unité dans la communauté scientifique passe essentiellement par la publication d'articles scientifiques dans les revues internationales. Cette notoriété doit être confortée par l'organisation de séminaires et la participation effective des chercheurs à des colloques internationaux.

Les produits de la recherche sont valorisables sous d'autres formes. La plus conséquente consiste à mettre à la disposition du CIRAD des méthodologies que l'on peut mettre en œuvre sur le terrain et qui font l'objet d'un transfert naturel. A ce stade, il ne s'agit normalement plus d'une recherche, mais d'une application qui relève des départements (ou des filiales) utilisateurs. En retour, des problèmes liés à ce transfert peuvent générer des compléments de recherche, qui devront être effectués par l'unité.

L'organisation

L'unité de recherche commune Biotrop réunit des chercheurs, des techniciens et des étudiants impliqués dans des actions de recherche à finalités diverses, mais pour lesquels l'intérêt thématique constitue l'élément fédérateur. Biotrop regroupe un personnel relevant du CIRAD-GERDAT, des agents d'autres départements du CIRAD et des étudiants français ou étrangers (tableau I).

Tableau I. Effectifs des personnels dans les laboratoires de Biotrop

Laboratoires	Culture <i>in vitro</i>	Histologie	Agétrop	Igé pam	Effectif par département
Chercheurs					
CIRAD-GERDAT	2	2	2	1	7
CIRAD-CA	1		3	1	5
CIRAD-CP	4		2		6
CIRAD-FLHOR	1				1
Total	8	2	7	2	19
Techniciens					
CIRAD-GERDAT	4	3	4	1	12
CIRAD-CA	2		1	1	4
CIRAD-CP	4		1		5
CIRAD-FLHOR	3				3
Total	13	3	6	2	24
Doctorants					
CIRAD-GERDAT		2	2	1	5
CIRAD-CA		1	2	2	5
CIRAD-CP		2			2
CIRAD-FLHOR		3	2		5
Total		8	6	3	17*

* Dont 7 étrangers.

On y compte ainsi, en milieu d'année 1993, une soixantaine de personnes : 19 chercheurs, tous docteurs, dont 7 sont habilités à diriger des recherches (tableau II) ; 23 techniciens répartis au sein des laboratoires ; 17 étudiants dont le temps de séjour à Biotrop sera de trois à quatre années, selon que le stage pratique de DEA y sera ou non effectué ou selon les prolongations de bourses octroyées par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche ; 1 personne assurant le secrétariat.

Tableau II. Les chercheurs de Biotrop et leurs domaines d'activité

Laboratoires de Biotrop	Chercheurs	Département	Activité
Culture <i>in vitro</i>	C. Teisson	CIRAD-GERDAT	Responsable du laboratoire Transformation génétique
	T. Legrave	CIRAD-GERDAT	Transformation génétique
	E. Guiderdoni	CIRAD-CA	Transformation génétique, riz
	M. Berthouly	CIRAD-CP	Micropropagation, caféier, cacaoyer
	M.-P. Carron	CIRAD-CP	Micropropagation, hévéa
	H. Etienne	CIRAD-CP	Micropropagation, hévéa
	L. Lardet	CIRAD-CP	Micropropagation, hévéa
F.-X. Cote	CIRAD-FLHOR	Micropropagation, bananier	
Histologie	J. Schwendiman	CIRAD-GERDAT	Responsable de Biotrop Embryogenèse somatique
	N. Michaux-Ferrière	CIRAD-GERDAT	Responsable du laboratoire Embryogenèse somatique
Agétrop, analyse du génome des espèces tropicales	C. Lanaud	CIRAD-GERDAT	Responsable du laboratoire Cartographie moléculaire, cacaoyer
	P. Lagoda	CIRAD-GERDAT	Cartographie moléculaire, bananier
	A. D'Hont	CIRAD-CA	Cartographie moléculaire, canne
	J.-C. Glaszmann	CIRAD-CA	Cartographie moléculaire, canne
	P. Hamon	CIRAD-CA	Cartographie moléculaire, sorgho
	A. Leconte	CIRAD-CP	Isozymes, hévéa
M. Seguin	CIRAD-CP	Cartographie moléculaire, hévéa	
Igépam, ingénierie génétique et pathologie moléculaire	R. Frutos	CIRAD-GERDAT	Responsable du laboratoire Ingénierie génétique
	M. Peterschmitt	CIRAD-CA	Virologie, maïs

Le personnel du CIRAD-GERDAT constitue le support permanent de l'unité. Il joue un rôle essentiel dans la coordination des activités en assumant la responsabilité de Biotrop et des laboratoires constitutifs. Ce noyau est formé par 7 chercheurs et 12 techniciens. Ces chercheurs et techniciens viennent appuyer des recherches conduites par les autres départements soit par des mises au point méthodologiques, soit par des applications plus spécifiques à une plante.

Le personnel des départements, dont l'intérêt est généralement focalisé sur une plante et dans un domaine scientifique déterminé, représente 12 chercheurs et 12 techniciens, répartis dans les quatre laboratoires constitutifs de l'unité.

A ce personnel relativement permanent il convient d'ajouter les 17 étudiants présents dans le cadre de la formation en doctorat.

Organisation interne

Le responsable de Biotrop est chargé de la préparation du budget annuel et de l'ordonnement des dépenses liées au fonctionnement. Il assure l'administration générale, la représentation de l'unité vis-à-vis des instances extérieures et la coordination générale des activités scientifiques au sein de l'unité.

Pour chaque laboratoire, un responsable scientifique est chargé de l'animation, de la coordination et de la conduite des recherches.

Données budgétaires

Les salaires des personnels sont assurés par leurs départements d'appartenance. En ce qui concerne le CIRAD-GERDAT, leur couverture est essentiellement assurée par le titre III. La différence est couverte à partir des ressources propres générées par l'unité.

Le budget de fonctionnement de Biotrop comporte : des moyens (titre VI) accordés par la direction du CIRAD-GERDAT ; des financements émanant de la direction scientifique dans le cadre des actions thématiques programmées (ATP), utilisés tant sous la forme d'équipements que comme moyens de fonctionnement ; des ressources propres issues d'aides ou de contrats obtenus auprès de diverses instances ; une participation des départements (autres que le CIRAD-GERDAT) aux frais de fonctionnement générés par l'accueil de leurs chercheurs, techniciens, étudiants.

En 1993, trois quarts du budget, de 16 millions de francs, ont été consacrés à assurer les salaires du personnel (tableau III).

Tableau III. Budget 1993 de Biotrop, en milliers de francs

DÉPENSES		RESSOURCES	
Personnel CIRAD-GERDAT (et 1 allocataire de recherche)	5 394	BCRD du CIRAD	
Personnels des départements (et allocataires de recherche CIRAD)	5 454	Titre III	5 150
Allocataires de recherche	1 584	Titre VI	1 437
Fonctionnement	3 116	ATP	335
Investissement	335		6 922
Total des dépenses	15 883	Contributions des départements (salaires des personnels et allocataires de recherche)	7 038
		Refacturations aux départements	1 605
		Conventions	318
		Total des ressources	15 883

L'ensemble du budget de fonctionnement n'est pas également réparti entre les laboratoires, en raison des différences de coûts de fonctionnement selon les domaines d'activité (biologie cellulaire ou biologie moléculaire). L'analyse des dépenses de l'année écoulée permet d'établir le coût moyen de fonctionnement d'un manipulateur par domaine, déterminant la base de refacturation auprès des départements pour l'accueil de leurs agents, qui est arrêtée après accord du comité de pilotage de l'unité.

Communication scientifique

La majeure partie des résultats scientifiques est publiée dans des supports variés. Le bilan, établi de 1987 à fin 1993, fait apparaître : 87 articles dans les revues internationales à comité de lecture et 24 articles dans les revues spécialisées du CIRAD ; 62 communications à des congrès ou colloques internationaux ; 28 thèses effectuées dans l'unité de recherche et soutenues, essentiellement auprès des universités Paris XI (12 thèses) et Montpellier II (8 thèses).

Il est évident que l'effort en cours sera poursuivi dans les années à venir.

Dans le domaine des biotechnologies végétales, de nombreux congrès internationaux sont susceptibles d'être intéressants pour les membres de Biotrop. La politique de l'unité et des départements qui y sont accueillis vise à favoriser au maximum, dans la mesure des disponibilités financières, l'expression de Biotrop dans ces manifestations scientifiques.

Les chercheurs et techniciens sont fréquemment amenés à apporter leur appui aux chercheurs du CIRAD en poste outre-mer. Ces missions, très spécialisées et ciblées sur un problème particulier à résoudre, peuvent parfois relever d'un caractère plus informel d'échange d'informations scientifiques ou de coordination des projets de recherche. Elles sont le lien indispensable entre le travail sur le terrain et dans les laboratoires métropolitains.

Formation

La formation du personnel de Biotrop

L'ensemble des agents du CIRAD peut bénéficier de stages de formation permanente. Le personnel de Biotrop a essentiellement participé à des stages de perfectionnement en anglais, en informatique, ainsi qu'en biologie moléculaire.

La formation par Biotrop

L'autre volet de la formation, qui se déroule dans l'unité, a déjà été signalé par la présence de doctorants : 10 étudiants français et 7 d'autres nationalités (Cameroun, Costa Rica, Côte-d'Ivoire, Pays-Bas, Maroc, Mexique). Pour leur grande majorité, les doctorants français sont des boursiers du ministère chargé de la recherche, auprès duquel les sujets ont été proposés et acceptés dans le cadre de l'appel d'offres « Agronomie tropi-

cale ». Les étudiants étrangers ont des statuts plus divers : boursiers de leur pays d'origine (souvent avec un complément fourni par le CIRAD) ou de la CCE. L'accueil d'étudiants implique un rôle d'encadrement très conséquent, qui trouve néanmoins une contrepartie importante par l'avancement des recherches qui sont confiées.

Parmi les sujets de thèse traités, on peut citer :

- le microbouturage (cacaoyer, hévéa) ;
- l'embryogenèse somatique, soit comme procédé de multiplication conforme (hévéa, cacaoyer), soit comme support de la transformation génétique (bananier, caféier, citrus, riz) ;
- l'analyse de la diversité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires (bananier, cacaoyer, hévéa) ;
- la cartographie du génome (bananier, cacaoyer, canne à sucre, hévéa, sorgho) ;
- la connaissance des gènes et des toxines de la bactérie *Bacillus thuringiensis* ;
- la variabilité génétique des pathogènes (*Fusarium*, *Mycosphaerella*, *Phytophthora*).

La stratégie

Les activités de recherche de l'unité Biotrop s'inscrivent dans des thématiques scientifiques traitées au sein des quatre laboratoires de l'unité. Deux thèmes, le développement de nouvelles méthodes histologiques et l'ingénierie génétique de *B. thuringiensis*, sont d'intérêt général. Les autres thèmes sont développés à partir de plantes « modèles » ou « supports » qui font l'objet d'un choix arrêté en fonction des besoins des départements utilisateurs et de la dynamique scientifique liée à ces techniques. Le tableau IV présente l'état actuel des actions, qui sont l'objet de fiches d'activités regroupées en annexe.

Tableau IV. Les actions de recherche de Biotrop

Thèmes de recherche	CIRAD-CA	CIRAD-CP			CIRAD-FLHOR	
	Riz – Sorgho – Canne – Maïs	Caféier	Cacaoyer	Hévéa – Palmier	Bananier	Citrus – Ananas
Microbouturage		■	■	■	■	
Embryogenèse somatique	■	■	■	■	■	■
Transformation génétique	■	■			■	■
Conservation des ressources génétiques						■
Diversité génétique	■		■	■	■	■
Cartographie du génome	■	■	■	■	■	
Variabilité des pathogènes	■	■	■	■	■	

Le laboratoire de culture *in vitro*

Les premières actions entreprises lors de l'ouverture du laboratoire, en 1978, concernaient le microbouturage du caféier, de la canne à sucre, de l'hévéa, ainsi que l'androgénèse du riz. Ces actions ont été remplacées par la micropropagation du bananier, du cacaoyer, par l'embryogenèse somatique et les manipulations de génie génétique. Plusieurs succès originaux ont été acquis par l'élaboration de techniques de régénération efficaces pour la micropropagation et la transformation génétique. Ce thème devrait mobiliser de plus en plus d'efforts et se traduire par des collaborations étroites avec d'autres unités, internes au CIRAD ou non, orientées vers la biologie moléculaire et la défense des cultures.

Parallèlement, des recherches analytiques (composition des milieux de culture, physiologie des vitroplants...) ont été rendues possibles grâce aux laboratoires d'analyse et de physiologie implantés sur le campus CIRAD. Cette évolution a été soutenue par une politique scientifique active du CIRAD, qui a fourni des appuis financiers conséquents sous forme d'actions thématiques programmées (ATP) regroupant différents départements du CIRAD et des intervenants extérieurs. Ces ATP ont porté sur quatre sujets : la compréhension de l'embryogenèse somatique, sa maîtrise en milieu liquide, une approche bioclimatologique de la physiologie des vitroplants et l'analyse des hormones endogènes. La dernière, en cours depuis le début de 1993, concerne la transformation génétique.

Domaines d'activité

L'approche des activités réalisées par le laboratoire doit prendre en compte trois caractères spécifiques du domaine de la culture *in vitro*.

La culture *in vitro* au CIRAD

Les techniques de culture *in vitro* sont aussi développées dans plusieurs départements du CIRAD.

Ainsi, le département des cultures annuelles (CIRAD-CA) travaille sur l'androgénèse du riz, la micropropagation de la canne à sucre, de l'anthurium et d'autres espèces florales d'intérêt local, à Roujol, en Guadeloupe, ainsi que sur la régénération et la transformation du cotonnier, avec l'INRA (Versailles). Le clonage par embryogenèse somatique du palmier à huile et du cocotier est réalisé par le département des cultures pérennes (CIRAD-CP), en collaboration avec l'ORSTOM (Montpellier). Diverses actions sont conduites par le département des productions fruitières et horticoles (CIRAD-FLHOR) : androgénèse du bananier à Neufchâteau, en Guadeloupe, amélioration non conventionnelle et micropropagation du bananier et du caféier, avec le CATIE (Costa Rica) ; micropropagation du bananier au CRBP (Cameroun) ; amélioration non conventionnelle des agrumes, avec l'INRA, à San Giuliano (Corse). Le département forestier du CIRAD (CIRAD-Forêt) utilise la micropropagation des clones d'*Acacia* et de *Casuarina* sélectionnés dans le cadre d'associations fixatrices d'azote au BSFT (Nogent-sur-Marne).

Valorisation

La culture *in vitro*, et plus particulièrement la micropropagation, est un domaine où la recherche est très proche de la valorisation industrielle et commerciale. Cet aspect,

conforme à la vocation d'un EPIC tel le CIRAD, est développé dans le cadre de filiales (Vitropic, micropropagation du bananier, SMH, microbouturage de l'hévéa, jusqu'à une date récente), de stations de recherche (La Mé, en Côte-d'Ivoire, embryogenèse somatique du palmier à huile), de réseaux internationaux (Promecafé, microbouturage du café en Amérique centrale) ou de partenariats privés (Socfindo, P.P. Marihat et FELDA, en Indonésie et en Malaisie, embryogenèse somatique du palmier à huile).

Coopérations

Les techniques de régénération en culture *in vitro* déterminent une étape essentielle, mais une étape seulement, du génie génétique appliqué à l'amélioration des plantes par insertion de gènes étrangers. Cette stratégie très prometteuse, mais complexe, exige des coopérations interdisciplinaires extrêmement larges — de la biologie moléculaire à l'expérimentation agronomique de plantes transgéniques. Elle fait donc intervenir des partenaires, parfois très divers. Les poids de la concurrence internationale et de la recherche privée sont particulièrement lourds dans ce domaine.

Le laboratoire se doit d'être considéré comme un élément d'un ensemble beaucoup plus vaste. Il joue toutefois un rôle particulier, car il représente la structure la mieux équipée, et qui regroupe le plus grand nombre de spécialistes. De plus, les liens de proximité sont très forts avec les autres unités de recherche et d'analyses du CIRAD, et aussi de l'ORSTOM. Enfin, le laboratoire a un rôle centralisateur pour le recueil et l'échange d'informations ainsi que pour la formation dans ce domaine.

Transferts d'activités

Les transferts d'activités hors de Biotrop sont réalisés dans le cadre des filières par plantes.

Recherche

Plusieurs méthodes initialement mises au point par Biotrop ont été transférées sur d'autres centres en zone tropicale, en particulier lorsque la qualité et la fraîcheur du matériel végétal représentent une condition déterminante pour le succès de la technique. C'est le cas des activités conduites au CIRAD-CA en Guadeloupe, au CATIE au Costa Rica, ou au CRBP au Cameroun.

Valorisation

Deux transferts essentiels ont été réalisés sous l'impulsion des départements : la micropropagation des bananiers et des ananas et le microbouturage de l'hévéa.

Vitropic, société filiale du CIRAD, commercialise un million de vitroplants par an. Elle entretient des contacts étroits et a passé des contrats d'assistance et de coopération avec différents laboratoires en zone tropicale (Equateur, Colombie, Venezuela, Indonésie, Vietnam). L'ensemble de ce réseau représente un potentiel de production annuel de plus de 10 millions de plants, soit environ le quart du marché mondial actuel.

La mise au point technique du microbouturage de l'hévéa a été achevée au début de 1991 par une équipe du CIRAD-CP opérant dans l'unité Biotrop et, jusqu'à une date récente, à la Société de microbouturage de l'hévéa (SMH). Environ 5 000 vitroplants

ont été produits pour l'expérimentation et 10 hectares de champs d'évaluation plantés dans des stations agronomiques de Côte-d'Ivoire et du Gabon.

Les collections

La vocation de coopération internationale du CIRAD, ainsi que la situation géographique de Montpellier — qui permet d'éviter des interférences entre pathogènes tropicaux et espèces cultivées locales — font du centre CIRAD une plaque tournante dans les échanges internationaux de géotypes.

Compte tenu des avantages offerts par la miniaturisation et l'état sanitaire des vitro-plants, le laboratoire intervient dans ce domaine. Des actions ponctuelles ont été réalisées sur l'ananas, les agrumes (microgreffage) et l'igname. Mais deux plantes surtout sont concernées par ces collections de transit :

- le bananier, dans le cadre du réseau INIBAP et de l'indexation virale que réalise le CIRAD-FLHOR. Près de 300 clones ont pu être multipliés simultanément ;
- la canne à sucre, en liaison avec un centre d'indexation montpelliérain reconnu par l'IBPGR : 120 variétés sont établies *in vitro* chaque année, et la collection comprend actuellement plus de 600 variétés.

Le laboratoire d'histologie

Domaines d'activité

A partir de 1978, ce sont essentiellement des activités cytogénétiques qui ont été conduites à la demande des départements. Après une phase d'appui aux analyses caryologiques des hybrides interspécifiques complexes entre espèces éloignées de cotonnier, le laboratoire d'histologie s'est impliqué sur d'autres espèces tropicales. De nombreux comptages chromosomiques ont été réalisés sur des hybrides de riz, d'ananas, de canne à sucre. L'essentiel des activités a été consacré à l'étude de la stérilité d'un hybride entre deux espèces de palmier à huile. Si les activités purement cytogénétiques sont désormais en diminution, le laboratoire peut toujours répondre à des problèmes ponctuels relevant de cette discipline.

Appui aux travaux de l'unité

En 1985, il est devenu évident que l'histologie devait venir en appui à la culture *in vitro*. Le laboratoire a été reconverti vers l'histocytologie appliquée au suivi des phénomènes se déroulant au cours de la culture *in vitro*. Ces études, impliquant la mise au point de nouvelles techniques d'inclusion et de colorations spécifiques, ont d'abord été mises en œuvre sur le palmier à huile. L'acquis histologique et la compétence du laboratoire ont été appliqués à d'autres plantes tropicales, monocotylédones (riz, bananier) ou dicotylédones (caféier, hévéa, cacaoyer, agrumes).

Le thème principal du laboratoire est la compréhension du processus d'embryogenèse somatique. C'est l'un des volets des recherches pluridisciplinaires indispensables pour répondre à la demande formulée par les départements. Développée sur plusieurs plantes, et selon diverses modalités (milieu solide, milieu liquide, cals compacts ou friables, suspensions cellulaires, protoplastes, etc.), l'analyse comparative a permis au

laboratoire d'acquérir une notoriété nationale et internationale. Cette position doit être confortée. De nouvelles méthodes émergent et doivent être mises au point pour renforcer les thématiques en cours ou appuyer celles qui sont destinées à prendre de l'ampleur.

Un nouvel axe de recherche se met en place et s'inscrit dans la stratégie globale de lutte contre les insectes au moyen des endotoxines produites par *Bacillus thuringiensis*. L'efficacité de ces toxines, ou des combinaisons de toxines issues de l'ingénierie génétique, peut être testée *in vitro*. La procédure repose sur la recherche et la détection par histoinmunologie de récepteurs membranaires dans l'intestin moyen des insectes. C'est une démarche originale, susceptible de trouver de nombreuses applications tant dans le domaine des biopesticides que pour décider des combinaisons de gènes les plus efficaces à utiliser dans le cadre de la transformation génétique.

Accueil et collaborations

La compétence du laboratoire quant à la compréhension et à la maîtrise de la micro-propagation sur espèces tropicales peut facilement être mise en œuvre sur des espèces tempérées. Des demandes émanent de partenaires d'autres unités ou laboratoires du CIRAD, de l'ORSTOM, de l'INRA, des universités ou de sociétés privées. Le laboratoire accueille des stagiaires s'intéressant à des plantes variées et venant soit pour acquérir des techniques particulières d'histologie, soit pour traiter des problèmes que l'équipe, par son expérience, est à même de résoudre.

Le laboratoire Agétrop

Ouvert en 1978, le laboratoire d'analyse du génome des espèces tropicales, Agétrop, a tout d'abord travaillé essentiellement avec des marqueurs enzymatiques qui ont permis, au cours des dix premières années, l'étude génétique de 17 espèces tropicales de grande importance économique pour les pays en voie de développement. Les thèmes de recherche portaient essentiellement sur l'identification variétale et sur l'évaluation des ressources génétiques, et en particulier sur l'organisation de la diversité génétique des espèces, sur l'histoire de leur domestication, sur la mise en place de systèmes de classification variétale.

Domaines d'activité

Le développement récent des techniques de biologie moléculaire a apporté un outil de marquage génétique plus puissant et, depuis 1988, les marqueurs moléculaires (de type RFLP et RAPD) sont utilisés. Avec ces techniques qui ont permis d'accroître grandement le nombre de marqueurs génétiques disponibles, de nouveaux thèmes de recherche ont pu être abordés, notamment celui de la cartographie du génome, dont l'objectif est, d'une part, d'avoir une meilleure connaissance de la structure du génome et du déterminisme génétique des caractères à sélectionner, d'autre part, de fournir aux sélectionneurs des marqueurs précoces de sélection.

Les orientations scientifiques du laboratoire Agétrop sont axées sur l'approfondissement de la connaissance du génome des plantes tropicales avec ses deux composantes : la diversité génétique et la cartographie du génome.

Les techniques de marquage génétique y sont développées (marquage enzymatique, marquage moléculaire) et les informations acquises viennent en appui aux programmes d'amélioration variétale conduits dans les pays tropicaux. Les études sont actuellement engagées sur cinq espèces tropicales : bananier, canne à sucre, cacaoyer, hévéa et sorgho.

Transferts d'activités

Les techniques de marquage enzymatique mises au point ont pu être transférées dans les pays tropicaux. C'est le cas pour l'étude du cacaoyer et du caféier au Togo et en Côte-d'Ivoire, où des laboratoires d'électrophorèse ont été installés. C'est le cas aussi pour le bananier en Guadeloupe. Pour l'hévéa, un système original a été expérimenté avec succès : un laboratoire d'électrophorèse portable a été mis au point. Il permet de faire des analyses de conformité clonale à la demande, dans les plantations.

Les techniques de biologie moléculaire, beaucoup plus lourdes sur le plan expérimental, posent le problème de leur transfert outre-mer. Une recherche est en cours afin de développer des méthodes dont les applications seront simples à mettre en œuvre.

Le laboratoire Igépam

Le laboratoire d'ingénierie génétique et de pathologie moléculaire, Igépam, a été constitué en avril 1991. La création de cette structure, rattachée à Biotrop depuis janvier 1993, découle de l'évolution des programmes de recherche dans le domaine d'activité de la mission défense des cultures (MIDEC).

Domaines d'activité

La structure de ce laboratoire correspond à une double orientation :

- une implication dans une recherche thématique sur l'ingénierie génétique de la bactérie *Bacillus thuringiensis* ;
- le développement, en tant que laboratoire d'accueil, d'actions de recherche axées sur l'analyse moléculaire de parasites ou de pathogènes des cultures tropicales.

Depuis avril 1992, l'équipement lourd du laboratoire est totalement disponible et autorise une utilisation autonome de toutes les techniques modernes de biologie moléculaire. L'aménagement des locaux, désormais achevé, a une capacité d'accueil suffisante.

Ingénierie génétique

L'orientation stratégique des recherches sur *B. thuringiensis* est liée à la conduite du programme d'ingénierie génétique. L'objectif final est la création de bactéries recombi-

nantes et la participation en tant que fournisseur de gènes utiles à la production de plantes transgéniques résistantes aux ravageurs.

Le premier objectif, l'amélioration de biopesticides par ingénierie génétique, correspond à la fabrication de bactéries (biopesticides) utilisables au champ. Ce domaine d'activité nécessite la compréhension de deux mécanismes essentiels, la production de protéines insecticides sous forme cristallisée facilement formulables et utilisables, et une connaissance aussi profonde que possible du mode d'action, mécanisme lié au phénomène de résistance des ravageurs. Au travers de collaborations, l'étape primordiale a consisté à établir une collection de gènes de toxines clonés, qui comprend actuellement 6 gènes de toxines antilépidoptères, 1 gène de toxine anticoléoptères et 2 gènes de toxines antidiptères. Ces gènes, présents soit dans *Escherichia coli* soit dans *B. thuringiensis*, ont servi à produire chacune des toxines correspondantes à un très grand degré de pureté, permettant ainsi la purification de protéines pour la conduite de tests de toxicité sur insecte et la production d'antisérums spécifiques pour chacune des toxines. Un ensemble de vecteurs, pour l'expression simultanée chez *B. thuringiensis* de plusieurs gènes de toxines, a aussi été construit en priorité. De même, afin d'élargir le spectre d'hôtes de cette bactérie et pour tenter de développer des stratégies de gestion de la résistance par l'association de protéines à modes d'action différents, le laboratoire vient d'obtenir la production sous forme cristalline d'un gène d'inhibiteur de protéase. Cette étude, conduite entièrement au CIRAD, est complétée par celle du mode d'action, réalisée en collaboration avec l'université de Montréal (Canada) et avec l'Institut de recherche sur les biotechnologies de cette ville.

Le second objectif implique la participation du laboratoire au programme de transformation génétique des espèces tropicales cultivées. Des constructions contenant les différents gènes de toxines dans un vecteur plante sont indispensables à la réalisation concrète de la transformation sur différentes espèces sur lesquelles les systèmes de régénération *in vitro* sont maintenant disponibles.

La conduite des recherches en vue de l'utilisation des propriétés insecticides reconnues chez *B. thuringiensis* nécessite de nombreuses collaborations scientifiques. Elles sont établies en France, avec l'INRA et l'Institut Pasteur, elles se développent avec des partenaires internationaux, comme l'université de Montréal, le Research Institute for Plant Protection à Wageningen, l'université de Californie à Riverside (Etats-Unis), le NRI (Natural Resources Institute), en Grande-Bretagne, et encore le CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo), basé au Mexique.

Pathologie moléculaire

La fonction d'accueil est proposée aux départements pour l'analyse moléculaire des parasites et pathogènes. Chacun des départements doit fournir le personnel et les ressources nécessaires. Différents pathogènes des plantes sont étudiés :

- pour le CIRAD-CA, le clonage et le séquençage du *maize streak virus*, la variabilité de *Xanthomonas*, pathogène de la canne à sucre ;
- pour le CIRAD-CP, la diversité et l'identification de différentes espèces de *Phytophthora* du cacaoyer, et des *Fusarium* du palmier à huile ;
- pour le CIRAD-FLHOR, l'étude des souches de *Mycosphaerella* responsables de la cercosporiose des bananiers ;
- pour l'ORSTOM, la variabilité génétique du *rice yellow mottle virus*.

Annexes

Les activités par laboratoire	33
Laboratoire de culture <i>in vitro</i>	33
Laboratoire d'histologie	44
Laboratoire d'analyse du génome des espèces tropicales, Agétrop	45
Laboratoire d'ingénierie génétique et de pathologie moléculaire, Igé pam	53
Sigles et abréviations	55

Annexe 1

Les activités par laboratoire

Laboratoire de culture *in vitro*

Micropropagation et transformation du caféier

Le café est le deuxième produit, après le pétrole, en termes d'échanges économiques mondiaux. Avec 506 millions de tonnes produites sur 12 millions d'hectares par plus de trois millions d'exploitations, le café constitue pour les pays producteurs une source conséquente de revenu. *Coffea arabica*, autofertile, tétraploïde, qui représente les trois quarts de la production mondiale, est multipliée par graines. L'obtention et la distribution d'une nouvelle variété homozygote pour les caractères recherchés demande près de trente à quarante ans. *Coffea canephora*, dont la variété Robusta est la plus connue, est diploïde, allogame, principalement cultivée en Afrique (75 %) et en Asie (23 %), multipliée par bouturage horticole. La maîtrise de la micropropagation permet de multiplier en masse les hybrides F_1 ou F_2 combinant caractères agronomiques et résistance aux aléas parasitaires.

Contexte international

- Micropropagation et variations somaclonales analysées par DNA Plant Technology Corporation (Etats-Unis).
- Transformation génétique pour la résistance au scolyte du grain à CENICAFE, en Colombie.

Collaborations du CIRAD

- Micropropagation d'hybrides F_1 avec le CATIE, au Costa Rica (1 chercheur du CIRAD-CP), et le réseau Promecafé, en Amérique centrale.
- Transformation génétique avec Francereco (à Tours).
- Laboratoire de production industrielle, en Ouganda.

Activités de Biotrop

Le premier projet de recherche vise à optimiser le microbouturage par utilisation du milieu liquide en immersion temporaire. Il s'appuie sur la maîtrise de la micropropagation du caféier en milieu solide par culture de nœuds orthotropes et sur la conformité des plantes issues de culture *in vitro*, démontrée par des essais réalisés en champ depuis 1986, en Amérique centrale.

La technique sera valorisée en Ouganda grâce à un projet financé par la CCE, puis dans d'autres pays (Kenya, Burundi).

- Effet de la gibbérelline sur la multiplication et la croissance des vitroplants.
- Etude de l'induction racinaire en milieu liquide.
- Etude de faisabilité de la technique en vue d'une utilisation commerciale.

Le second projet est l'obtention de caféiers résistants à la mineuse des feuilles. Il s'appuie sur la maîtrise de l'embryogenèse somatique en milieu liquide et le transfert direct de gènes par biolistique.

- Poursuite des travaux avec le canon à particules sur suspensions cellulaires et embryons.
- Régénération des tissus bombardés.
- Evaluation du caractère transgénique par PCR.

Moyens disponibles

Personnel : 0,1 équivalent chercheur, 1,2 technicien, 1 doctorant

Financement : BCRD, CCE, ATP « Transformation génétique »

Micropropagation du cacaoyer

Produit dans toute la zone tropicale humide (2,4 millions de tonnes sur 5,3 millions d'hectares), le cacao est une culture de rente, exportée pour l'essentiel. D'un pays à l'autre, les structures de production sont très différentes : petits planteurs en Afrique (moins de 5 hectares), grandes exploitations au Brésil et en Equateur, importance identique de ces deux secteurs en Asie. Les enjeux de la culture — productivité, qualité, tolérance aux aléas climatiques — nécessitent l'obtention rapide d'un matériel végétal adapté aux conditions locales. Espèce allogame très hétérozygote, *Theobroma cacao* multipliée par bouturage horticole donne des plantes à port plagiotrope, dont la conduite agronomique est difficile. L'objectif est, par la maîtrise des techniques de micropropagation conforme, rapide et massive, de fournir des plantes orthotropes à partir des génotypes retenus par la sélection.

Contexte international

- Micropropagation rapide et conforme, université de Kerala (Inde), CATIE (Costa Rica), université de Pennstate (Etats-Unis).
- Conservation *in vitro* et clonage, université de Reading (Royaume-Uni).
- Transformation génétique : sociétés privées (Mars, Nestlé).

Collaborations du CIRAD

- Embryogenèse somatique avec Francereco (à Tours).
- Analyse des polyphénols avec l'université de Montpellier I.
- Université de Reading (Royaume-Uni) et Kerala Agricultural University (Inde).

Activités de Biotrop

MICROBOUTURAGE

Etude détaillée de la physiologie et du comportement du vitroplant pour optimiser la phase de multiplication *in vitro*.

- Physiologie du vitroplant issu de microbouturage.
- Etude de la composition minérale du milieu.
- Analyse de l'environnement gazeux et de la photopériode.

EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

Compréhension des processus biochimiques, cytologiques et physiologiques permettant la maîtrise de l'embryogenèse somatique à partir de pétales ou d'explants foliaires.

- Obtention de cals embryogènes issus de pétales.
- Suivi histologique et description des séquences conduisant à l'embryogenèse somatique.
- Identification des composés phénoliques, facteurs limitants possibles de l'embryogenèse somatique.

Moyens disponibles

Personnel : 0,6 équivalent chercheur, 1 technicien, 2 doctorants

Financement : BCRD

Micropropagation de l'hévéa

L'intérêt industriel de la culture de l'*Hevea brasiliensis* réside dans sa production de latex à haute teneur en caoutchouc. Les besoins de l'industrie sont à l'origine d'une demande soutenue qui nécessite une augmentation régulière de la production. L'hévéa-culture doit assurer une augmentation de la rentabilité des exploitations, directement liée à une amélioration, d'une part, des qualités individuelles des arbres et de leur homogénéité, d'autre part, des techniques d'exploitation. La disponibilité d'une technique de multiplication des clones entiers sur leurs propres racines s'avère donc indispensable. Deux techniques, l'embryogenèse somatique et le microbouturage, sont l'objet d'un effort continu de recherche par le CIRAD-CP.

Contexte international

- ☐ L'activité de recherche importante et soutenue, depuis 1970, des laboratoires de Chine et de Malaisie ne s'est pas concrétisée par une maîtrise de l'embryogenèse somatique.
- ☐ L'activité d'autres centres hévéicoles, en Inde, en Indonésie, en Thaïlande et au Vietnam, est irrégulière.
- ☐ Parmi les initiatives privées, Goodyear a fait appel à des moyens importants pour interrompre brusquement, après quatre années. Michelin, à Clermont-Ferrand, vient de lancer une recherche sur l'embryogenèse somatique.

L'équipe du CIRAD occupe aujourd'hui le premier rang en ce qui concerne les techniques de microbouturage et d'embryogenèse somatique.

Collaborations du CIRAD

- ☐ Dosages des hormones endogènes avec l'INRA (Orléans) et l'université Paris VI.
- ☐ Etude des systèmes racinaires avec l'INRA (Avignon).
- ☐ Etude des protéines extracellulaires avec l'université de Picardie.
- ☐ Etude des phénols et polyamines avec l'université Montpellier II.
- ☐ Fourniture de matériel végétal (fruits), acclimatation des vitroplants, essais en champ avec la station de Bimbresso de l'IDEFOR (Côte-d'Ivoire), l'HEVEGO, en Côte-d'Ivoire, le CATH et HEVEGAB, au Gabon.

Activités de Biotrop

L'objectif principal est l'analyse de la plus-value agronomique du matériel micropropagé — comparaison des vitroplants avec le matériel végétal greffé classique, sélection en champ des clones entiers les mieux valorisés par la micropropagation. La recherche des génotypes les plus adaptés à la culture *in vitro*, la mise au point d'une technique performante de production d'embryons somatiques en milieu liquide et l'optimisation de leur conditionnement pour tendre vers des graines artificielles sont prévues en parallèle.

- ☐ Recherche des génotypes les plus adaptés au microbouturage.
- ☐ Maîtrise des cultures embryogènes en suspension et de la régénération des embryons somatiques.

Moyens disponibles

Personnel : 3 équivalents chercheur, 3 techniciens

Financement : BCRD

Micropropagation et variations somaclonales du bananier

La qualité sanitaire des vitroplants de bananier permet une productivité élevée et une préservation du milieu par la réduction des traitements nématocides. Le bananier est actuellement l'espèce de grande culture la plus multipliée *in vitro* (environ 50 millions de vitroplants produits chaque année). L'engagement du CIRAD-FLHOR dans le développement de nouveaux itinéraires techniques, notamment aux Antilles, nécessite la maîtrise de l'ensemble de la filière, y compris la production de vitroplants. Le savoir-faire acquis par Biotrop pour la production de masse est valorisé par Vitropic, filiale du CIRAD. Le principal facteur limitant de la micropropagation du bananier est l'apparition de plants hors type ou variants somaclonaux. Une technique de gestion de la production des vitroplants, associée à une identification précoce des variants en phase d'acclimatation, permet désormais d'assurer un faible pourcentage de variants au champ.

L'objectif est maintenant de préciser l'origine de ces variations chez le cultivar Grande Naine pour garantir une meilleure maîtrise de la production de masse.

Contexte international

- De très nombreux laboratoires de recherche et de production dans le monde entier.
- Activité à caractère commercial.
- Universalité des problèmes de variation somaclonale.
- Recherche sur marqueurs moléculaires.

Collaborations du CIRAD (internes et externes)

- Essais en champ, en Martinique et Guadeloupe par le CIRAD-FLHOR ; au Cameroun par le CRBP ; au Costa Rica par le CORBANA.
- Vitropic, partenaire privilégié.
- Etude du métabolisme des gibbérellines à l'INRA (Orléans).

Activités de Biotrop

Caractérisation du métabolisme des gibbérellines des variants nains (variants les plus fréquents) et mise au point d'un test biologique permettant leur détection *in vitro* ; recherche des relations entre le type de bourgeonnement *in vitro* et les variations.

- Dosage des gibbérellines de vitroplants conformes et variants nains par spectrométrie de masse, en collaboration avec l'INRA (Orléans).
- Détermination des possibilités de renforcement des différences morphologiques *in vitro* entre variants nains et plants conformes à l'aide de tests biologiques principalement fondés sur la sensibilité particulière des variants nains à un apport de gibbérellines.
- Production de vitroplants issus d'un bourgeonnement contrôlé de type axillaire ou adventif et détermination de la conformité des plants produits.

Moyens disponibles

Personnel : 0,5 équivalent chercheur, 0,25 technicien, 1 doctorant

Financement : BCRD, CCE pour salaire et fonctionnement du doctorant

Transformation génétique du riz

Le riz, première céréale de consommation humaine, est produit principalement en Asie (près de 90 %), dans des conditions de culture inondée ou irriguée. Le CIRAD-CA a fait le choix d'améliorer le riz pluvial tropical (70 % du riz cultivé en Afrique et en Amérique latine) et le riz irrigué méditerranéen (2 millions d'hectares). Cette position est complémentaire de celle de l'IRRI (International Rice Research Institute) aux Philippines. Pour le CIRAD-CA, l'un des principaux objectifs de la sélection est le développement de variétés de riz génétiquement résistantes aux agressions biotiques. Dans ce cadre, les foreurs de tiges (genres *Chilo*, *Sesamia* et *Maliarpha*) sont une contrainte majeure.

Contexte international

Neuf universités ou instituts (Royaume-Uni, Suisse, Pays-Bas, Japon, Etats-Unis), financés en grande partie par la fondation Rockefeller, et quatre laboratoires privés (Belgique, Japon, Etats-Unis) sont parvenus à régénérer des plantes transgéniques de riz, essentiellement par transfert direct de gènes sur protoplastes et, depuis peu, par accélération de particules ou électroporation de tissus. Les gènes envisagés à court terme pour le transfert sont les gènes de résistance aux insectes (endotoxines et inhibiteurs d'enzymes digestifs), aux virus (*tungro* et RYMV par la stratégie capsid virale principalement), aux herbicides (des riz transgéniques ayant intégré le gène *bar* ont été obtenus aux Etats-Unis, en Suisse et au Japon), aux bactéries (phytoalexines, agents antimicrobiens et enzymes détoxificateurs), aux champignons (glucanases et chitinases), à la sécheresse (modification de l'architecture racinaire) et de qualité du grain (digestibilité des protéines, contenu en vitamines, composition en acides aminés).

Les gènes de *B. thuringiensis*, clonés et transférés au riz dans le système international de recherche, risquent d'être spécifiques des espèces asiatiques de ravageurs, donc inadaptés à la protection contre les ravageurs d'autres environnements.

Collaborations du CIRAD

- Etude de la séquence promoteur du gène de PLTP de riz codant pour une protéine de transfert des phospholipides avec le CNRS (Perpignan).
- Création de riz transgéniques résistants aux lépidoptères foreurs de tiges avec l'INRA (Versailles).
- Création de riz transgéniques résistants au *rice yellow mottle virus* (RYMV) avec le Scripps Research Institute (ILTAB), aux Etats-Unis.

Activités de Biotrop

Le projet de recherche vise l'obtention de riz transgéniques résistants aux lépidoptères par transfert de gènes d'endotoxines de *B. thuringiensis* (et éventuellement d'inhibiteurs de protéases). La méthode de transformation directe sur protoplastes par électroporation ou action du polyéthylène glycol a été privilégiée. Celle par accélération de particules sur suspensions cellulaires ou scutellum de l'embryon immature sera testée en parallèle.

- Compréhension et optimisation de l'embryogenèse à partir de tissus somatiques, de microspores et de protoplastes en vue du transfert direct de gènes.
- Mise au point d'une méthode de transfert de gènes sur protoplastes.

Mise au point d'une méthode de transfert de gènes sur scutellum d'embryons immatures par accélération de particules.

Moyens disponibles

Personnel : 1 équivalent chercheur, 1 doctorant

Financement : BCRD, ATP « Transformation génétique »

Embryogenèse somatique et transformation génétique du bananier

Le génie génétique présente un intérêt potentiel très important pour l'amélioration des bananiers, en raison de la difficulté d'une amélioration conventionnelle chez cette plante (stérilité et polyploïdie) et de l'absence de gènes connus de résistance à certains pathogènes (virus). C'est un complément au programme d'amélioration génétique classique du CIRAD-FLHOR, principalement axé sur l'amélioration des bananiers diploïdes fertiles.

Contexte international

Des organismes de recherche, publics — TBRC et université de Taiwan, QDPI (Australie), Volcani Center (Israël), South China Academy of Tropical Crops, université de Cuba — ou privés — ILTAB et Monsanto aux Etats-Unis — sont déjà engagés ou projettent de s'impliquer dans la transformation des bananiers.

Le CIRAD entretient des contacts avec plusieurs de ces organismes et certains ont émis des souhaits de collaboration. La maîtrise du système de régénération sur les bananiers de grande culture ne semble à l'heure actuelle effective qu'à l'université de Taiwan, et, plus récemment, au CIRAD.

Collaborations du CIRAD

Le programme CIRAD de transformation est partie intégrante du programme STDIII sur l'amélioration génétique des bananiers auquel participent, pour la biotechnologie, l'université Paris XI, l'université de Leuven (Belgique) et le CATIE (Costa Rica).

Activités de Biotrop

Le projet est de développer une technique de transfert de gènes chez les bananiers cultivés. Trois objectifs successifs sont programmés :

- la maîtrise de l'embryogenèse somatique à partir de suspensions cellulaires sur diploïdes comme système modèle, mais surtout sur triploïdes cultivés, en particulier le cultivar Grande Naine. De nouveaux systèmes de micropropagation attrayants du point de vue économique sont une retombée attendue, sous réserve de la conformité du matériel végétal produit ;
- le développement, à l'aide de gènes marqueurs, de systèmes de transformation directe, soit par microparticules soit par le polyéthylène glycol ;
- la transformation pour la résistance par le gène de protéine de capsid virale du CMV, qui servira de modèle. Plusieurs vecteurs sont disponibles, notamment à l'INRA. A plus long terme, d'autres transferts sont envisagés : capsid du *bunchy top*, résistances aux charançons et nématodes...

- Test en champ de la conformité des plants produits par embryogenèse somatique.
- Optimisation des étapes de multiplication des suspensions, mise au point de la maturation et de la germination des embryons.
- Premiers essais de transformation, expression transitoire.

Moyens disponibles

Personnel : 1,2 équivalent chercheur, 1,2 technicien, 1 doctorant

Financement : CCE-STDIII, BCRD, ATP « Transformation génétique »

Embryogenèse somatique et transformation génétique des agrumes

Les particularités du régime de reproduction des agrumes (apoximie partielle, autoincompatibilité...) ainsi que l'hétérozygotie élevée des cultivars limitent considérablement les progrès génétiques par recombinaison sexuée. Le recours au transfert de gènes est prioritairement retenu afin d'améliorer ponctuellement des cultivars d'élite. La très forte capacité embryogène des cals nucellaires et des protoplastes isolés à partir de ces cals privilégie la transformation directe de tels protoplastes par l'électroporation ou la méthode au polyéthylène glycol.

Contexte international

L'importance économique des agrumes et leur variabilité *in vitro* sont à l'origine d'importants programmes, déjà anciens, de génie génétique (fusion de protoplastes et création de cybrides) en Israël, au Japon et aux Etats-Unis. Dans ces trois pays, des résultats souvent spectaculaires ont été acquis. Les systèmes de transformation par *Agrobacterium* et par électroporation de protoplastes sont abordés par les mêmes équipes, ainsi qu'en Espagne (IVIA) et en Italie (Istituto sperimentale per l'agrumicoltura).

Collaborations du CIRAD

Des liens sont établis avec l'INRA (Bordeaux), le CREC (Citrus Research and Education Center) de Floride, l'université de Cukurova, en Turquie, pour identifier et isoler des gènes d'intérêt agronomique.

Activités de Biotrop

L'objectif est la maîtrise de la régénération et de la transformation des agrumes. Sur *Citrus deliciosa* (mandarine commune), ces méthodes ont été acquises et transférées à Montpellier à la suite d'un stage effectué au CREC de Floride. Des améliorations dans le taux de conversion des embryons sont toutefois nécessaires.

- Contrôle de l'embryogenèse somatique à l'aide de différentes sources carbonées.
- Transformation des protoplastes avec des gènes marqueurs.
- Fusion des protoplastes entre mandarine et limettiers.
- Cryoconservation des cals embryogènes de diverses espèces d'agrumes pour la constitution d'une banque de génotypes.

Moyens disponibles

Personnel : 0,2 équivalent chercheur, 1 technicien, 1 doctorant

Financement : BCRD

Bananes, ananas, agrumes : appui technique direct et formation

Le CIRAD-FLHOR, pour développer ses programmes et pour répondre à des demandes de ses partenaires, sollicite Biotrop pour réaliser des activités d'appui technique et de formation.

Appui technique direct et formation

- Introduction et diffusion de ressource génétique ananas (vitrothèque).
- Production de vitroplants de bananier pour expérimentation et indexation.
- Mise au point d'une technique de micropropagation sur agrumes.
- Microgreffage d'agrumes.
- Formation de partenaires du CIRAD-FLHOR aux techniques de micropropagation (accueil du personnel à Biotrop ou missions d'appui).

Ces actions ne constituent pas un programme de recherche. Elles répondent à des besoins immédiats du département ou des partenaires extérieurs, difficilement réalisables par une autre structure que Biotrop. Leur programmation est réalisée à court ou moyen terme.

Moyens disponibles

Personnel : 0,2 équivalent chercheur, 1,4 technicien

Financement : ressources propres du département, INIBAP (indexation bananier)

Canne à sucre : conservation des ressources génétiques

Le CIRAD-CA assure à Montpellier un service de quarantaine internationale. Certains des clones qui y transitent sont intégrés dans une vitrothèque au moyen de la culture de bourgeons axillaires suivie d'un stockage des vitroplants à basse température.

Activités de Biotrop

Les recherches actuelles visent la mise au point de techniques de conservation à long terme :

- cryoconservation de cals embryogènes ;
- cryoconservation d'apex ;
- stabilité du génome, sur la base des marqueurs moléculaires.

La collection *in vitro* de Montpellier alimente des collections similaires sur les stations du CIRAD en Guadeloupe et à la Réunion. On préserve ainsi du matériel d'intérêt pour des études génétiques et des têtes de clone potentielles pour une introduction et une multiplication rapide par micropropagation.

Moyens disponibles

Personnel : 0,1 équivalent chercheur, 2 techniciens

Financement : BCRD

Laboratoire d'histologie

Développement de nouvelles méthodes histocytologiques

Les activités histocytologiques sont en étroite complémentarité avec les actions de recherche relevant du laboratoire de culture *in vitro* qui sont développées par les départements. Par la diversification de ses activités, l'histologie se trouve à la charnière de la culture *in vitro* et de l'ingénierie génétique. Outre la mise au point d'une panoplie de plus en plus large de colorations spécifiques du matériel *in vitro*, de nouvelles techniques, comme l'hybridation *in situ* ou l'immunocytochimie, sont d'un intérêt évident pour l'analyse du génome ou l'ingénierie génétique.

Activités de Biotrop

Le projet scientifique du laboratoire est l'acquisition de toutes les nouvelles méthodes susceptibles d'approfondir les connaissances développées dans les trois autres laboratoires de l'unité.

- Pour le suivi de l'établissement et de l'évolution des suspensions cellulaires embryogènes ou des protoplastes, gamme de colorations spécifiques, aisées et rapides à mettre en œuvre sur les noyaux, les parois, les ARN, les réserves du cytoplasme, les substances polyphénoliques.
- Dans le cadre des essais de transformation, visualisation du gène GUS au niveau cellulaire.
- Utilisation de la cytométrie en flux pour déterminer le niveau de ploïdie des plantes régénérées.
- Méthodes de détection par immunofluorescence ou immunocytochimie pour la détection *in vitro* de récepteurs des endotoxines de *B. thuringiensis* dans l'intestin moyen des larves d'insectes.
- Hybridation *in situ* sur chromosomes métaphasiques.
- Mise au point de colorations rapides et de l'utilisation de marqueurs fluorescents soit pour suivre l'acquisition par des suspensions cellulaires de caractères embryogènes soit pour caractériser les blocages qui se produisent.

Moyens disponibles

Personnel : 1,2 équivalent chercheur, 2 techniciens

Financement : BCRD

Laboratoire d'analyse du génome des espèces tropicales, Agétrop

Diversité génétique et cartographie du génome du sorgho

Le sorgho est une céréale qui a un rôle fondamental dans l'alimentation de l'homme et du bétail. Particulièrement adapté aux zones tropicales semi-arides, où la pluviométrie atteint environ 800 mm en saison des pluies, le sorgho est à la base de l'alimentation des populations rurales en Afrique de l'Ouest (entre les 7° et 14° degrés de latitude N). L'exploitation de la variabilité et l'amélioration variétale ont mis en œuvre des sélections initialement de type massal, puis généalogique. Axés tout d'abord sur la productivité, les critères de sélection intègrent aujourd'hui la qualité du grain, afin d'obtenir une meilleure diffusion des variétés améliorées en milieu paysan.

Contexte international

Huit équipes (6 aux Etats-Unis, 1 en Australie et 1 en Italie) ont déjà lancé un programme de cartographie chez le sorgho, pour comparer l'organisation du génome de diverses plantes ou analyser différents caractères morphologiques, de résistance à la sécheresse ou au mildiou.

Sept équipes utilisent des descendances F_2 de croisements intraspécifiques ou interspécifiques. Les sondes gDNA et cDNA les plus utilisées proviennent du maïs, du sorgho, mais aussi du riz et de l'avoine. Les cartes obtenues vont de 400 à 1 756 cM. Une seule équipe prévoit l'utilisation de lignées recombinantes et de marqueurs RAPD pour cartographier la résistance à la sécheresse.

Collaborations du CIRAD

- Cette étude fait partie d'un projet CCE-STDIII auquel participent deux pays européens (Belgique et Allemagne) et deux pays africains (Burkina Faso et Mali).
- Le laboratoire est intégré dans le réseau mil-sorgho soutenu par la fondation Rockefeller.
- Echanges de sondes mil et sorgho avec le Cambridge Laboratory de Norwich (Royaume-Uni).

Activités de Biotrop

ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Faisant suite à l'étude de la diversité des sorghos cultivés à partir de marqueurs morphologiques, isozymiques et moléculaires (RFLP à partir d'ADN génomique), il est prévu d'analyser la diversité des ADN cytoplasmiques en élargissant la collection à des formes cultivées mieux ciblées et à des formes sauvages.

CARTOGRAPHIE DU GÉNOME

L'objectif de ce projet est de cartographier les composantes de la qualité du grain (caractère de type QTL) en vue de fournir dans les cinq ans à venir des marqueurs pré-

coces de sélection. Des sondes de maïs (gDNA), de sorgho (cDNA) et probablement de blé (cDNA) seront utilisées.

- En collaboration avec le Mali et le Burkina Faso, mise en place des essais nécessaires en contre-saison et suivi des descendances pour l'obtention des lignées recombinantes.
- Tri de sondes d'une banque cDNA de grains de sorgho en germination, et éventuellement de grains de blé en cours de maturation.
- Tri de sondes polymorphes (maïs, sorgho, blé) chez les parents du croisement à analyser.

Moyens disponibles

Personnel : 0,5 équivalent chercheur, 1 technicien, 1 doctorant

Financement : CCE-STDIII

Cartographie du génome de la canne à sucre

L'amélioration variétale de la canne à sucre est rendue difficile par sa génétique complexe. Les espèces du genre *Saccharum* sont toutes hautement polyploïdes. Les variétés modernes dérivent de croisements interspécifiques réalisés au début du siècle à Java et en Inde. Elles sont aneuploïdes avec souvent plus de 100 chromosomes, qui proviennent, en majorité (plus de 80), de *Saccharum officinarum* (la canne « noble ») et, dans une moindre mesure, de *S. spontaneum*. Les stratégies d'hybridation en vue de l'amélioration génétique sont floues et les plans de croisement sont déterminés essentiellement par des contingences de floraison et de fertilité pollinique. D'autre part, on manque de critères de sélection, faute de connaissances sur l'hérédité des caractères.

Contexte international

Un groupe de 10 organisations de recherche et associations de professionnels sur la canne à sucre représentant six nations (Brésil, Etats-Unis, Australie, Afrique du Sud, Colombie, Maurice) a constitué en 1991 le Consortium international pour les biotechnologies de la canne à sucre. Ce groupe finance diverses universités américaines pour mener des projets sur l'analyse de la diversité moléculaire, la cartographie des génomes de *S. spontaneum* et de *S. officinarum* et le marquage de caractères agronomiques.

Deux équipes ont entrepris la cartographie du génome d'un clone sauvage *S. spontaneum*. L'une, composée de Brésiliens (Copersucar) et d'Américains (Hawaiian Sugar Planters Association), conduit cette étude à l'université de Cornell. Elle a d'ores et déjà construit une carte qui comporte 212 marqueurs RFLP. L'autre est localisée au CIBR, en Californie, et a placé 230 marqueurs RAPD sur la carte.

Collaborations du CIRAD

- Echanges de chercheurs avec le BSES (Bureau of Sugar Experiment Stations) d'Australie.
- Analyse moléculaire des hybrides intergénériques et interspécifiques réalisés par la WICSBS (West Indies Central Sugar Cane Breeding Station) de la Barbade.

Activités de Biotrop

L'utilisation des marqueurs moléculaires chez la canne à sucre privilégie l'analyse du génome de *S. spontaneum* tel qu'il est représenté dans les variétés modernes. Le projet mise sur l'homologie entre les génomes de la canne à sucre et du maïs. L'étude d'une première variété, SP 70 1006, a permis de répartir 94 marqueurs en 25 groupes de coségrégation, dont 18 correspondent probablement à des chromosomes de *S. spontaneum*. Un échange de sondes permettra de comparer les résultats du CIRAD à ceux de l'université de Cornell. La priorité actuelle est la poursuite du marquage des chromosomes de *S. spontaneum* avec un nombre restreint de marqueurs : la PCR ciblée sur quelques locus par chromosome devrait permettre de transférer progressivement les analyses vers les sites mêmes de sélection.

- Extension et densification de la carte RFLP avec l'étude d'une deuxième variété, R 570.
- Premiers essais ciblés de PCR pour marquer quelques locus.

Analyse conjointe (avec le BSES australien) de nouvelles descendances interspécifiques.

Moyens disponibles

Personnel : 1,6 équivalent chercheur, 1 doctorant

Financement : BCRD

Diversité génétique et cartographie du génome du cacaoyer

La culture du cacaoyer a une grande importance économique pour les pays en développement. Cependant, avec la chute des cours, c'est la haute qualité du cacao qui est de plus en plus recherchée par les pays producteurs, et qui est ainsi devenue prioritaire dans les critères de sélection des programmes d'amélioration développés au CIRAD. Au cours des prochaines années, les activités de marquage moléculaire viendront en appui à l'amélioration génétique de la qualité du cacao.

Contexte international

Un petit nombre d'équipes travaille sur le marquage moléculaire du cacaoyer.

- Identification des clones de cacaoyer et analyse de la diversité de petites populations, essentiellement à l'aide de marqueurs RAPD, par le Scottish Crop Institute.
- Cartographie du génome par RAPD, à l'université de Pennsylvanie (Etats-Unis).
- Test de la diversité révélée par une sonde de rDNA sur un nombre limité de clones, par la Purdue University (Etats-Unis).
- Cartographie du génome à l'aide de marqueurs RFLP, à Francereco (Tours).

Collaborations du CIRAD

- Collaboration avec l'IDEFOR-DCC (Côte-d'Ivoire) pour la cartographie du génome.
- Collaboration interne, avec le laboratoire de technologie du CIRAD-CP à Montpellier, et avec Trinidad (1 chercheur du CIRAD-CP affecté au Cocoa Research Unit).
- Echanges de sondes avec Francereco.

Activités de Biotrop

ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Elle sera axée plus spécifiquement sur le groupe Criollo, caractérisé par une qualité élevée du cacao.

- Etude de la diversité au niveau de l'ADN nucléaire et cytoplasmique sur 200 clones d'origine variée.
- Comparaison de la diversité révélée par RFLP et RAPD sur un échantillon de clones plus réduit (une centaine de clones).

CARTOGRAPHIE DU GÉNOME

Le projet vise à mettre en évidence les gènes majeurs (ou QTL) impliqués dans les principaux caractères de qualité, nombreux et souvent complexes. Après l'établissement d'une première carte du génome d'au moins 200 marqueurs, l'analyse des caractères de qualité se fera sur l'une des descendances déjà mises en place ou en cours d'installation.

- Localisation des marqueurs RFLP déjà sélectionnés ou en cours de tri.
- Recherche, à partir d'une banque génomique, des séquences de type microsatellites.

Moyens disponibles

Personnel : 0,4 équivalent chercheur, 1 technicien, 1 doctorant

Financement : BCRD

Diversité génétique et cartographie du génome de l'hévéa

Hevea brasiliensis est un arbre cultivé important pour le développement des régions tropicales humides, non seulement parce que c'est la seule source exploitable de caoutchouc naturel (latex), mais également parce que sa culture est favorable à la protection des sols et que les plantations fournissent du bois d'œuvre ou du bois de feu en fin d'exploitation. L'hévéa est cultivé sur près de 9 millions d'hectares, essentiellement en Asie du Sud-Est, et représente une culture de remplacement pour l'Afrique tropicale et l'Amérique latine.

L'amélioration génétique a pour objectif la création de variétés (clones de greffe) à haut rendement en latex et résistantes aux maladies. Les problématiques principales des sélectionneurs concernent :

- l'exploitation rationnelle des ressources génétiques ;
- la connaissance du déterminisme et de la variabilité génétique des caractères en sélection ;
- l'identification de marqueurs de sélection précoce.

Contexte international

Une seule équipe, au Rubber Research Institute of Malaysia (RRIM), développe également les RFLP sur hévéa, avec pour but majeur la cartographie du génome. Ces recherches sont menées en liaison avec le Cambridge Laboratory de Norwich (Royaume-Uni).

Collaborations du CIRAD

Les études de diversité génétique seront conduites, jusqu'en 1996, dans le cadre d'un projet CCE-STDIII, en collaboration avec la station CIRAD de Guyane, l'université catholique de Louvain-la-Neuve, en Belgique, l'IDEFOR (département plantes à latex) de Côte-d'Ivoire et l'IRA du Cameroun.

Activités de Biotrop

ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

Elle a pour but d'évaluer et de caractériser des collections de clones sauvages issus de prospections dans trois Etats de l'Amazonie, aire d'origine de l'espèce. Les analyses par RFLP de l'ADN nucléaire sont complémentaires de celles sur l'ADN mitochondrial réalisées à Louvain-la-Neuve (Belgique). Les recherches seront ultérieurement orientées vers des méthodes rapides de criblage moléculaire développées à grande échelle et *in situ*, et élargies aux huit autres espèces du genre.

- Analyse de données et comparaison de la diversité au niveau des isoenzymes, de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial.
- Analyse par RFLP nucléaire d'autres espèces du genre *Hevea*.
- Mise au point de protocoles simplifiés pour l'analyse de la diversité : évaluation des RAPD.

CARTOGRAPHIE DU GÉNOME

L'objectif est d'aborder l'analyse du déterminisme génétique des caractères quantitatifs et, plus particulièrement, de la résistance horizontale au champignon *Microcyclus ulei*.

La cartographie d'un grand nombre de marqueurs et leur liaison avec des QTL seront complétées par la recherche de sondes microsatellites à isoler spécifiquement chez l'hévéa.

- En collaboration avec le RRIM de Malaisie : crible de banques gDNA, cDNA et de marqueurs RAPD.
- Cartographie des marqueurs polymorphes sur les populations F_2 ou F_1 .
- Constitution d'une banque nucléaire pour l'obtention de sondes microsatellites.

Moyens disponibles

Personnel : 1,8 équivalent chercheur, 1 technicien

Financement : BCRD, CCE-STDIII

Diversité génétique et cartographie du génome du bananier

L'amélioration génétique des bananiers triploïdes repose, dans une première étape, sur un brassage génétique de bananiers diploïdes sauvages ou domestiqués. Comme pour beaucoup d'autres espèces tropicales, les connaissances sur la génétique des bananiers sont succinctes. L'utilisation de marqueurs moléculaires cartographiés aidera à mieux comprendre le déterminisme génétique des caractères (en particulier, la résistance à la cercosporiose) et apportera des marqueurs précoces de sélection. L'origine des bananiers triploïdes consommés est encore mal connue ; des études de diversité génétique faites à l'aide de marqueurs morphophysiologiques et moléculaires sont développées afin de comprendre l'organisation génétique au sein du genre *Musa*.

Contexte international

□ L'université de Géorgie (Etats-Unis) travaille sur la diversité génétique des différentes espèces du genre *Musa* au niveau de l'ADN chloroplastique et nucléaire.

Collaborations du CIRAD

□ L'INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain), basé à Montpellier, coordonne les actions de recherche et apporte son soutien financier aux programmes.

□ Collaboration avec le Queensland Department of Primary Industry (Australie) pour l'étude de la diversité génétique d'environ 200 clones provenant de prospections récentes de Papouasie-Nouvelle-Guinée. Biotrop a la charge des tests.

Activités de Biotrop

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE

L'étude de la diversité génétique sera poursuivie par l'analyse de 400 génotypes diploïdes et triploïdes à l'aide de marqueurs RFLP (sondes génomiques).

CARTOGRAPHIE DU GÉNOME

Une première carte moléculaire de 90 marqueurs a été établie sur une descendance implantée en Guadeloupe et une deuxième carte est en cours de construction à partir d'une autre descendance de 200 individus implantée au Cameroun. Des marqueurs de type isozyme, RFLP (sondes génomiques) et RAPD ont été jusqu'à présent localisés.

L'objectif est d'obtenir une carte aussi saturée que possible afin de pouvoir localiser avec précision les gènes majeurs impliqués dans les caractères à sélectionner. Une nouvelle approche sera développée sur cette espèce par la localisation de séquences de type microsatellite, qui permettra d'utiliser la PCR pour révéler le polymorphisme.

- Etude de la diversité génétique des diploïdes et triploïdes.
- Localisation de sondes RFLP sur la descendance implantée au Cameroun.
- Production et séquençage de sondes microsatellites.

Moyens disponibles

Personnel : 0,5 équivalent chercheur, 0,7 technicien, 1 doctorant

Financement : BCRD, INIBAP, CCE-STDIII.

Laboratoire d'ingénierie génétique et de pathologie moléculaire, Igé pam

Les gènes de toxines de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis est l'agent de lutte biologique le plus utilisé à l'heure actuelle, avec une part de 90 à 95 % du marché des biopesticides. Cette bactérie présente l'avantage de posséder un spectre d'hôte suffisamment étroit pour assurer une innocuité aux organismes vivants non cibles et une diversité de types de toxines suffisamment importante pour permettre une activité efficace sur plusieurs ordres d'insectes. Ceux pouvant être contrôlés par les toxines de *B. thuringiensis* se rangent notamment parmi les lépidoptères et les coléoptères dont l'impact en agriculture est extrêmement important. De nouvelles souches, récemment caractérisées, présentent une activité contre les nématodes. *B. thuringiensis* est employé en lutte biologique contre les ravageurs des cultures sous forme de produits épandables selon des moyens classiques. Cette bactérie sert également de source de gènes pour les constructions destinées à l'obtention de plantes transgéniques résistantes aux insectes, un autre mode de contrôle des ravageurs. De nombreux travaux ont été réalisés sur la spécificité des toxines de *B. thuringiensis*, et les recherches actuelles portent essentiellement sur la compréhension du mode d'action au niveau cellulaire et moléculaire ainsi que sur le mécanisme de développement de résistance par les populations d'insectes cibles.

Contexte international

De nombreux laboratoires privés et publics ont lancé des programmes internationaux de recherche sur *B. thuringiensis*. Du fait du grand intérêt commercial des produits à base de *B. thuringiensis* et du développement rapide du marché, ce microorganisme est intensivement étudié à différents niveaux : compréhension des mécanismes de résistance des insectes, mode d'action, ingénierie des toxines et optimisation des techniques de production et d'utilisation.

Collaborations du CIRAD

- Echanges de gènes avec l'INRA (Versailles).
- Etude de l'expression de gènes d'inhibiteurs de protéases dans *B. thuringiensis* avec l'INRA (Montpellier).
- Echanges de bactéries et d'anticorps avec l'Institut Pasteur.
- Analyse du mode d'action des toxines de *B. thuringiensis* avec l'université de Montréal (Canada), ainsi qu'avec l'Institut de recherche en biotechnologie de cette ville.
- Etude des vecteurs d'expression de *B. thuringiensis* et mutagenèse des toxines avec l'université de Californie (Etats-Unis).

Activités de Biotrop

AMÉLIORATION DES BIOPESTICIDES PAR INGÉNIERIE GÉNÉTIQUE

L'objectif final est l'extension de l'activité insecticide de *B. thuringiensis* à des ravageurs normalement non affectés par les souches naturelles. Cela nécessite la compré-

hension du mode d'action des toxines, des phénomènes de spécificité, la production des toxines dans un corps d'inclusion parasporal.

CRÉATION DE PLANTES TRANSGÉNIQUES RÉSISTANTES AUX INSECTES

L'action de recherche sur *B. thuringiensis* est impliquée dans la création de plantes transgéniques résistantes aux ravageurs en collaboration étroite avec différents programmes pour l'approvisionnement en gènes de toxines et la réalisation des constructions nécessaires à la transformation des plantes.

- Modification du gène de toxine cryIC en vue de l'expression d'un gène étranger et de la production de la protéine correspondante dans un « cristal ».
- Détermination de la séquence minimale nécessaire à la cristallisation.
- Clonage et séquençage de deux gènes non dénommés de toxines de 34 kDa et 40 kDa.
- Production de toxines pour la détermination de la sensibilité des ravageurs à *Bacillus thuringiensis*.

Moyens disponibles

Personnel : 1 équivalent chercheur, 1 technicien, 1 doctorant

Financement : BCRD

Annexe 2

Sigles et abréviations

ATP	Action thématique programmée
BCRD	Budget civil de la recherche et du développement
BSES	Bureau of Sugar Experiment Stations, Australie
BSFT	Laboratoire de biotechnologie des symbioses forestières tropicales (CIRAD-ORSTOM)
CATH	Centre d'appui technique à l'hévéaculture, Gabon
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica
CCE	Commission des communautés européennes
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, Mexique
CENICAFE	Centro Nacional de Investigaciones de Café, Colombie
CIBR	California Institute of Biological Research, Etats-Unis
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CNRS	Centre national de la recherche scientifique, France
CRBP	Centre régional bananiers et plantains, Cameroun
CREC	Citrus Research and Education Center, Etats-Unis
EPIC	Etablissement public industriel et commercial
FELDA	Federal Land Development Authority, Malaisie
IDEFOR	Institut des forêts, Côte-d'Ivoire
ILTAB	International Laboratory for Tropical Biotechnology, Etats-Unis
INIBAP	International Network for the Improvement of Banana and Plantain, France
INRA	Institut national de la recherche agronomique, France
IRA	Institut de la recherche agronomique, Cameroun
IRRI	International Rice Research Institute, Philippines
IVIA	Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Espagne
MICAP	Mission connaissance et amélioration des plantes (CIRAD)
MIDEC	Mission défense des cultures (CIRAD)
NRI	Natural Resources Institute, Royaume-Uni
ORSTOM	Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération, France
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PROMECAFE	Programa Cooperativo para la Protección y Modernización de la Caficultura (IICA), Guatemala

QDPI	Queensland Department of Primary Industries, Australie
QTL	<i>Quantitative trait locus</i>
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RRIM	Rubber Research Institute of Malaysia, Malaisie
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>
SMH	Société de microbouturage de l'hévéa, France
SSR	<i>Simple sequence repeat</i>
Socfindo	Socfin Indonesia, Indonésie
TBRC	Taiwan Banana Research Center, Taiwan
WICSBS	West Indies Central Sugar Cane Breeding Station, Barbade



Centre
de coopération
internationale
en recherche
agronomique
pour le
développement

**Département
de gestion,
recherche,
documentation
et appui
technique**

2477,
avenue du Val
de Montferrand
BP 5035
34032 Montpellier
Cedex 1
France