Les Actes du BRG, 6 (2006) 181-196
© BRG, 2006

Article original

Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire

Marie-France DUVAL[(1)*], Séverine BORY[(4)], Sandra ANDRZEJEWSKI[(2)], Michel GRISONI[(4)], Pascale BESSE[(4)], Sandrine CAUSSE[(2)], Céline CHARON[(5)], Michel DRON[(5)], Eric ODOUX[(6)], Maurice WONG[(2)]

[(1)] Cirad-Flhor, UPR Multiplication Végétative, Boulevard de la Lironde, TA 50/PS4, 34398 Montpellier Cedex 5, France
[(2)] Etablissement Vanille de Tahiti, Département Recherche et Développement, BP 912, Uturoa Raiatea, Polynésie Française
[(3)] Cirad-Amis, UMR Polymorphismes d'Intérêt Agronomique, Avenue Agropolis, TA 40/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France
[(4)] UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Station de Ligne-Paradis, Pôle de protection des plantes, 3P, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Réunion
[(5)] UMR 8618 IBP, Bât 630 Univ. Paris XI, 91405 Orsay Cedex, France
[(6)] Cirad-Flhor, UPR Qualité des Aliments Tropicaux, 73 rue Jean-François Breton, TA 50/16, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Abstract: Origin of the vanilla diversity observed in secondary dispersal areas. Vanilla cultivation confronts great difficulties due to the competition with biosynthetic vanillin and the recent increase in production, which results in large amounts of questionable quality beans. To improve the quality and the traceability of vanilla products, we need a better knowledge of the germplasm. *Vanilla* is a semi-epiphytic neo-tropical orchid asexually propagated and may have been domesticated from a relatively narrow basis. Three species are cultivated. *V. planifolia* G. Jackson, indigenous to Mexico, is the most important species for the production of vanilla and is mainly cultivated in the Indian Ocean. The origin of *V. tahitensis* J.W. Moore, cultivated in South Pacific Islands is still questioned. *V. pompona* Schiede is distributed in Central and South America. Today, wild populations are threatened with extinction in their centre of origin. The collection, conservation and evaluation of the germplasm are critical both in the centre of origin and in the secondary dispersal areas.

This project allowed the gathering of an important collection of cultivated vanilla and related species obtained through collection or exchange. AFLP markers were developed to study inter-specific diversity and adapted in La Réunion and French Polynesia to study intra-specific regional genetic diversity in *V. planifolia* and *V. tahitensis* respectively. Cytogenetics was used to establish ploidy levels in these two species.

* Correspondance et tirés à part : marie-france.duval@cirad.fr

Data analysis displayed a well structured diversity following the species division and separating neatly American species from other *Vanilla*. A species endemic to Brazil, *V. bahiana,* appeared as the closest species to cultivated vanillas. There was no support to the hypothesis of a hybrid interspecific origin for *V. tahitensis*, which appeared close to *V. planifolia*. Among the three cultivated species, *V. pompona* displayed the higher intra-specific variability, accordingly to its wider distribution. Diversity levels were low within the two main cultivated species *V. planifolia* and *V. tahitensis*. Variations in ploidy levels were established within both species.

The origin of the intra-specific variability is discussed. The genetic diversity is probably due to the accumulation of punctual mutations arising from a few original introductions. Differences in ploidy levels (2n=2x versus 2n=4x) could account for the variation observed between two known varieties of *V. tahitensis* while there was no genetic diversity found, thus enhancing the possible role of auto-polyploidisation to create diversity in *Vanilla*. Methodologies are developed to study epigenetic variation and will be applied to *V. planifolia* accessions.

Screening methodologies were also developed to evaluate the tolerance to CymMV virus. *V. pompona* and *V. tahitensis* were more tolerant, while *V. planifolia* accessions cover the whole tolerance range.

vanilla/ genetic diversity/ AFLP markers/ ploidy level/ tolerance to virus

Résumé : La culture de la vanille est actuellement confrontée à de grandes difficultés dues à la concurrence de la vanilline de biosynthèse, à l'augmentation de la production et à la qualité inégale des gousses. Pour améliorer la qualité et la traçabilité des produits, la diversité génétique existante doit être mieux connue. La collecte, la conservation et l'évaluation des ressources génétiques dans le centre d'origine et dans les zones de dispersion secondaire sont donc des priorités. Dans ce projet nous avons rassemblé une importante collection de vanilliers cultivés et apparentés. Des marqueurs AFLP ont été développés pour étudier la diversité génétique. L'analyse des données a montré une forte structuration de la diversité par espèce. La diversité intraspécifique des principales espèces cultivées, *V. planifolia* et *V. tahitensis*, est apparue faible et probablement due à l'accumulation de mutations somatiques ponctuelles à partir d'une base génétique étroite. Des variations intraspécifiques des niveaux de ploïdie sont confirmées dans le cas de *V. tahitensis*. L'autopolyploïdisation apparaît donc comme une voie probable de création de la diversité chez le vanillier. Des méthodologies de criblage pour la tolérance au *Cymbidium Mosaic Virus* et d'évaluation du potentiel aromatique des gousses vertes ont également été développées pour l'évaluation future des collections.

vanille / diversité génétique/ marqueurs AFLP/ ploïdie/ tolérance aux viroses

1. INTRODUCTION

Dans le genre *Vanilla* P. Mill, trois espèces rattachées à la branche américaine de la section *foliosae*, sous-section *lamellosae* [14] sont cultivées. *V. planifolia*

représente la majeure partie des vanilles commercialisées. Originaire du Mexique, cette espèce a été introduite dans l'Océan Indien, où sa culture s'est développée à partir du XIXe siècle. Bien que rattachée à la même branche américaine, *V. tahitensis* est connue et cultivée sous le nom de vanille de Tahiti dans l'Océan Pacifique depuis le XIXe siècle et son origine est controversée. Enfin *V. pompona*, ou vanillon est cultivée en Amérique Centrale et dans les Antilles.

Actuellement le commerce de la vanille est confronté à de grandes difficultés dues à la concurrence de la vanilline de biosynthèse et à la baisse des cours induite par l'augmentation de la production. La qualité de l'offre est de surcroît très diverse et ne répond pas toujours à l'attente des utilisateurs de vanille qui recherchent un approvisionnement régulier en gousses de bonne qualité organoleptique et ont une exigence de traçabilité.

Confrontés à cette situation, les producteurs ont entrepris des démarches pour valoriser la diversité et les qualités aromatiques spécifiques des vanilles cultivées dans les différentes régions de production. Ces variétés diffèrent selon des critères morphologiques, agronomiques et aromatiques reconnus mais sont souvent mal définies. L'origine de cette diversité apparue dans des zones de dispersion secondaire, Océan Indien pour *V. planifolia* et Océan Pacifique pour *V. tahitensis*, est mal connue. Plante à reproduction végétative importée sans son pollinisateur, le vanillier est resté improductif jusqu'à la découverte d'une technique de pollinisation manuelle en 1841. Les différents types observés peuvent donc résulter d'introductions successives, de l'accumulation de mutations somatiques ponctuelles, ou de l'intervention d'événements rares de recombinaison sexuée.

L'amélioration du matériel végétal a également été envisagée, et un programme de création variétale conduit par l'IRAM et l'IRAT dans les années 1950-70 à Madagascar a donné naissance à deux variétés commercialisées : Manitra am-potony et Tsy taitra. Cependant, les ressources génétiques utilisables pour l'amélioration du vanillier sont mal connues. Le pool génique primaire de *V. planifolia* est fortement menacé dans son aire d'origine par l'augmentation de la pression foncière et la destruction des biotopes (Soto Arenas 2003). La collecte, la conservation et la caractérisation des pools génétiques primaire et secondaire (espèces apparentées) qui pourraient être une source de caractères agronomiques intéressants est donc urgente.

Le projet en cours rassemble quatre organismes, le Cirad (UPR MV et UMR PVBMT), l'Etablissement Vanille de Tahiti (PF), l'Université de La Réunion (UMR PVBMT) et l'Institut de Biologie des Plantes (Université Paris-Sud) et a pour objectif l'analyse de la diversité inter et intra-spécifique du vanillier, au niveau génétique, épi-génétique et phénotypique. Dans ce but des marqueurs moléculaires et des méthodologies d'étude de caractères d'intérêt agronomique tel que la tolérance aux viroses ont été développés.

2. ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Matériel végétal

Pour la réalisation des études de diversité, une collection de ressources génétiques représentatives de la diversité du genre *Vanilla* a été établie. Les accessions ont été obtenues auprès d'Institutions publiques françaises (Muséum National d'Histoire Naturelle, Jardins des Plantes de Lyon, d'Auteuil, de Montpellier et de Nantes, Jardin du Sénat, EVT (Polynésie Française)) ou étrangères ((Kew Royal Botanical Garden (UK), Communauté du Pacifique Sud (Fidji), Université California Riverside (USA)), et de collections privées (Provanille, La Réunion, Exofleur, Eco Orquideas, Associations d'Orchidophiles). Enfin, des prospections ont été effectuées à La Réunion, à Madagascar, en Guadeloupe, en Guyane et au Brésil.

Tableau I : Échantillonnage utilisé pour l'étude de diversité interspécifique (Montpellier, 2004).

Id accessions	Espèce	Origine	Nombre
Espèces cultivées			
PL..	*V. planifolia*	Réunion	29
		Polynésie (1 Samoa, 2 Tahiti)	3
		Amérique Centrale	4
		autre (Jardins Botaniques…)	11
PO..	*V. pompona*	Polynésie	2
		Réunion	1
		autre (Jardins Botaniques…)	3
TA..	*V. tahitensis*	Polynésie	6
Hpl_ta3	*V.* hybride (*V. planifolia* X *V. tahitensis*)	Madagascar	1
Hpl_ph056	*V.* hybride (*V. planifolia* X *V. phaeanta*)	Guadeloupe	1
HFxT	*V.* hybride (*V. planifolia* X *V. tahitensis*)	Polynésie Française	1
Espèces apparentées			
AL…	*V. albida*	autre (Jardins Botaniques…)	2
AP…	*V. aphylla*	Thaïlande	1
BA…	*V. bahiana*	Brésil	6
EN…	*V. ensifolia*	Guyane	1
IM…	*V. imperialis*	Cameroun	1
PH…	*V. phalaenopsis*	autre (Jardins Botaniques…)	1
Vsp…	*V.* sp (dont 5 aphylles)	autre (Jardins Botaniques…)	23

Cette collection a fourni la base des essais et études effectués à Montpellier et à la Réunion (tabl. I et II-a). Les accessions étudiées à l'EVT (tabl. II-

b) proviennent de la collection maintenue localement. Des échanges entre les deux collections ont permis de relier les études de diversité.

Tableau II : Échantillonnages utilisés pour l'étude de diversité des variétés cultivées (Référence extérieure américaine : *V. babiana*) à l'UMR PVBMT (II-a) et à l'EVT (II-b).

Id accessions	Espèce	Type	Origine	Nombre
Accessions communes				
PL002	*V. planifolia*	Mexique	Réunion	
PL016		?	Samoa	
PL054			Guadeloupe	3
TH181	*V. tahitensis*		Polynésie Française	
TP183			Polynésie Française	2
PO167	*V. pompona*		Exofleur	1
BA071	*V. babiana*		Brésil	1
II- a. Accessions étudiées à l'UMR PVBMT (Réunion)				
PLc….	*V. planifolia*	Classique	Réunion	159
PLm….		Mexique	Réunion	15
PL ….		indéterminé	Réunion	24
PLx….		indéterminé	Autres (Jardins botaniques…)	45
	V. planifolia			243
T….	*V. tahitensis*		Réunion	2
			Madagascar	1
			Polynésie Française	8
			PNG	1
			Autres (Jardins botaniques…)	7
	V. tahitensis			19
PO…	*V. pompona*		Réunion	8
			Madagascar	2
			Guadeloupe	6
			Polynésie Française	2
			Autres (Jardins botaniques…)	7
	V. pompona			27
BA…	*V. babiana*		Brésil	15
Hy	Hybrides		Madagascar	2
II-b. Accessions étudiées à l'EVT (Polynésie Française)				
PL…	*V. planifolia*			8
divers	*V. tahitensis*			27
PO…	*V. pompona*			5
BA071	*V. babiana*			1
	Hybride			1

2.1.2. Cytogénétique

2.1.2.1. Cytométrie de flux

Les mesures de cytométrie de flux ont été réalisées à l'Institut des Sciences du Végétal (ISV-CNRS) à Gif-sur-Yvette, sur cytomètre Epics ELITE ESP (Beckman-Coulter). Les échantillons ont été broyés et dosés dans du tampon Bergounioux. L'étalon interne pois classiquement utilisé a du être remplacé par un étalon blé du fait de la fusion partielle du pic 2C pois avec le pic 2C

vanille. Les noyaux correspondant aux différents pics observés ont été triés et observés au photomicroscope droit Reichert Polyvar.

2.1.2.2. Comptages chromosomiques

La mise au point méthodologique a été réalisée au laboratoire Ecologie Systématique Évolution (ESE) de l'Université Paris XI. Après prétraitement à la colchicine, les racines ont été fixées dans une solution d'éthanol-acide acétique, puis hydrolysées dans du HCl 1N à 60 °C et colorées dans du réactif de Schiff. Les comptages sont effectués après écrasement des racines entre lame et lamelle dans du carmin acétique.

2.1.3. Marqueurs moléculaires

2.1.3.1. AFLPs

Les AFLPs ont été réalisées en deux étapes :

Une première étape a été réalisée à Biotrop (Montpellier) pour étudier la diversité interspécifique et les relations entre les espèces cultivées et apparentées. Le kit commercial AFLP™ Core Reagent Kit d'INVITROGEN a été utilisé suivant le protocole de Vos *et al.* [17]. Après double restriction enzymatique par *EcoRI* et *MseI*, ligation d'adaptateurs et pré-amplification, cinq couples d'amorces à trois nucléotides (E-AAC/M-CTT, E-AGG/M-CAC, E-AGG/M-CAG, E-AGG/M-CTA et E-ACG/ M-CAC) ont été sélectionnés pour analyser 97 accessions représentant la diversité des *Vanilla* (tabl. I).

La deuxième étape avait pour objectif de mettre l'accent sur la diversité intra-spécifique dans les espèces *V. planifolia* à La Réunion et *V. tahitensis* en Polynésie. Les techniques AFLP ont donc été transférées (protocole de Vos *et al.* (1995)) et adaptées respectivement à l'UMR PVBMT et à l'EVT en fonction des conditions locales.

À l'UMR PVBMT le protocole a été adapté pour une utilisation sur un séquenceur capillaire ABI-PRISM 3100. Six couples d'amorces ont été employés pour analyser un échantillon de 306 accessions de *Vanilla* cultivées et proches (dont 243 *V. planifolia)* (tabl. II-a).

À l'EVT, la méthode a été modifiée pour être compatible avec une révélation par coloration au nitrate d'argent, effectuée suivant le protocole de Creste *et al.* [6]. Neuf couples d'amorces à trois nucléotides spécifiques ont été sélectionnés avec une restriction *SacI/MseI* (S-AAC/M-CAG, S-AAC/M-CAT, S-AAG/M-CTG, S-ACA/M-CAT, S-ACA/M-CTT, S-ACC/M-CTA, S-ACG/M-CTG, S-ATC/M-CAT et S-ATG/M-), ce dernier protocole permettant l'obtention d'un moins grand nombre de bandes avec une meilleure netteté de profil. Quarante deux accessions, majoritairement des *V. tahitensis*, ont été étudiées (tabl. II-b).

2.1.3.2. Analyse des données

Les bandes obtenues ont été codées en présence/absence et les données utilisées pour calculer des dissimilarités entre accessions avec l'indice de Sokal et Michener. Des représentations arborées de la diversité ont été construites par la méthode du Neighbor Joining sur la matrice des dissimilarités et testées par bootstrapping en utilisant le logiciel DARWIN [12].

Du fait de l'utilisation de différents couples d'amorces et des méthodes de révélation employées, les marqueurs obtenus sont différents pour chacune des localisations et trois analyses séparées ont été conduites.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Structure de la diversité du genre

Une grande cohérence a été observée dans toutes les représentations de la diversité obtenues dans le projet (fig. 1, 2 et 3) avec une forte structuration de la diversité.

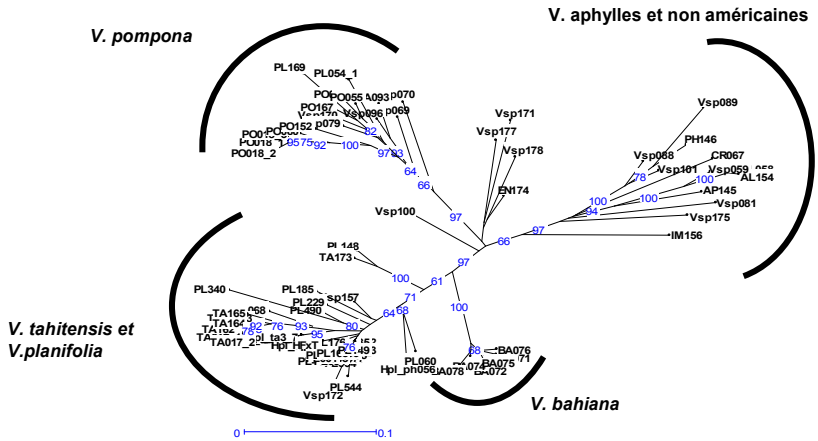

Figure 1 : Représentation de la diversité d'un échantillon de 97 accessions de vanilles cultivées et apparentées (Montpellier, 2004). Arbre construit par Neighbour Joining à partir de la matrice des distances de Sokal et Michener (337 variables, 1 000 bootstraps).

Dans la première étude de diversité interspécifique (tabl. I), le nombre de marqueurs obtenus varie de 52 pour le couple E-ACG/M-CAC à 83 pour E-AGG/M-CTA avec un total de 337 bandes codées pour cinq couples d'amorces.

Le dendrogramme obtenu montre une nette séparation des espèces américaines versus non américaines et structure la diversité en quatre groupes

(fig. 1). Un premier groupe, le plus éloigné par rapport à *V. planifolia* (d = 0,19), différencie les vanilles non américaines et associe les vanilles aphylles, *V. albida* et certaines *Vanilla* sp. avec une valeur de bootstrap de 97 %. Le second rassemble les *V. pompona* et quelques espèces indéterminées avec une forte valeur de bootstrap (97 %). Un troisième groupe, le plus proche des *V. planifolia*, est formé avec des accessions de *V. bahiana*, très proches et réunies à 100 %. Le dernier groupe réunit avec une valeur de bootstrap de 64 % les *V. planifolia*, les *V. tahitensis* et les hybrides.

Les études faites dans les deux régions de dispersion secondaire pour mieux appréhender la variabilité inter- et intra-spécifique des espèces cultivées concernaient quatre espèces : *V. planifolia, V. tahitensis, V. pompona* et l'espèce sud-américaine *V. bahiana.*

À l'UMR PVBMT l'échantillon comportait 306 accessions (tabl. II-a). Six couples d'amorces ont été utilisés et un nombre de marqueurs variant entre 77 et 241 a été obtenu avec une moyenne de 141 par couple d'amorces pour un total de 985 marqueurs analysés.

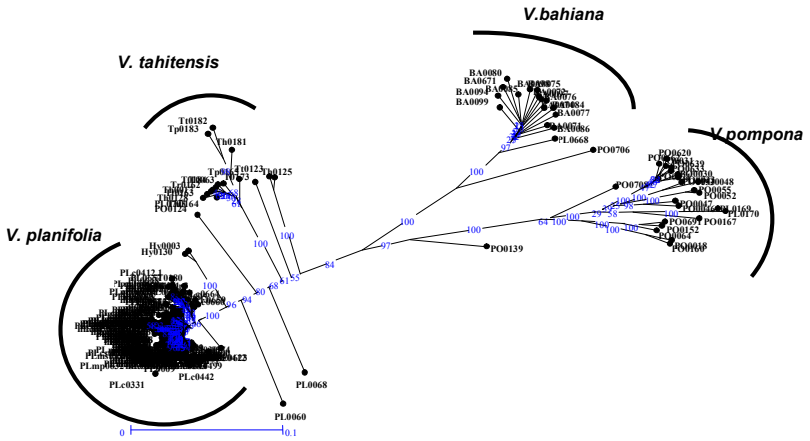

Figure 2 : Représentation de la diversité d'un échantillon de 306 accessions de vanilles cultivées. (UMR PVBMT, 2005). Arbre construit par Neighbor Joining à partir de la matrice des distances de Sokal et Michener (985 variables, 500 bootstraps).

Le dendrogramme de la diversité (fig. 2) montre une forte structuration en espèces, cohérente avec celle obtenue dans la première étude. Quatre groupes correspondant aux quatre espèces étudiées sont observés avec des valeurs de bootstraps de 100 %. Quelques accessions se trouvent en position intermédiaire : deux *V. pompona* entre ce groupe et le groupe des *V. bahiana* pourraient être des hybrides, aucune barrière reproductive n'existant entre ces deux espèces dont les aires de répartition se recouvrent partiellement, et les deux hybrides *V. planifolia* X *V. tahitensis* qui se trouvent logi-

quement entre les deux groupes des espèces parentes. Deux *V. planifolia* non rattachées à un cultivar précis et trois *V. tahitensis* apparaissent détachées de leurs groupes respectifs.

Après vérification morphologique, certaines accessions mal identifiées ont également pu être reclassées.

La représentation obtenue à partir des 42 accessions étudiées à l'EVT (tabl. II-b, fig. 3) présente la même structure avec des valeurs de bootstrap également très fortes (97 % à 100 %) .

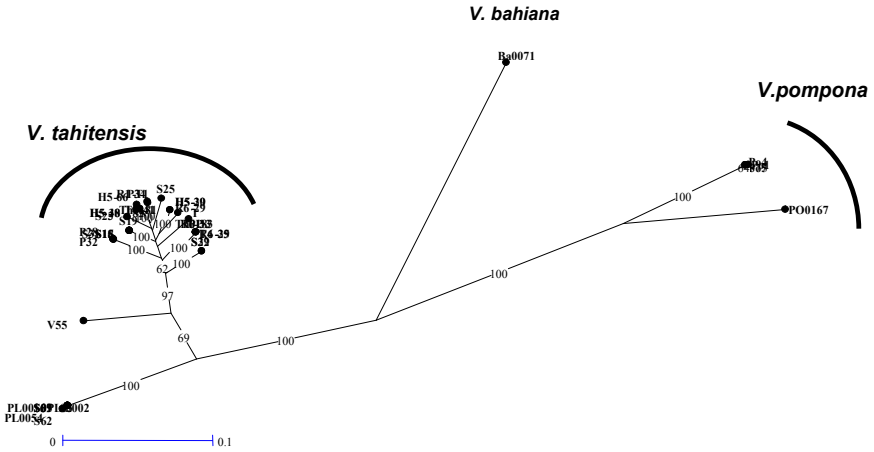

Figure 3 : Représentation de la diversité de 42 accessions de vanilles cultivées (EVT, 2005). Arbre construit par Neighbour Joining à partir de la matrice des distances de Sokal et Michener (540 variables, 1 000 bootstraps).

2.2.2. Origine des Vanilla tahitensis

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'origine de *V. tahitensis*, espèce présente uniquement dans les îles du Pacifique. Portères (1954) suggère une origine hybride entre *V. planifolia* et *V. pompona,* ou une variation de *V. planifolia*. Cette dernière hypothèse, soutenue par Lubinsky [9] et Soto-Arenas [15], est supportée par une étude récente réalisée à l'aide de marqueurs RAPD [3]. Dans un premier essai d'étude de la diversité par microsatellites [4], les quelques couples d'amorces fonctionnelles déterminées sur *V. planifolia* ont permis l'amplification des accessions de *V. tahitensis* mais n'ont pas été transférables sur *V. pompona*. Cet éloignement des *V. pompona* est confirmé par les présentes études, avec des dissimilarités moyennes calculées entre les espèces *V. tahitensis* et *V. pompona* trois fois supérieures à celles calculées entre *V. tahitensis* et *V. planifolia* (fig. 1, 2 et 3). Ces données supportent donc l'hypothèse d'une variation de *V. planifolia.*

2.2.3. Diversité intraspécifique des espèces cultivées

Les niveaux de diversité intraspécifique observés sont très variables.

Le groupe *V. pompona* présente une forte variabilité (fig. 2, indice de dissimilarité moyen de Sokal et Michener de 0,21) avec des forts bootstraps intra-groupe. Cette grande diversité est à rapprocher de la grande dispersion de cette espèce dans sa zone d'origine [5], [16].

Le groupe *V. bahiana* présente une diversité moindre (indice moyen de 0,13) avec une distribution restreinte au Nordeste brésilien [13].

La diversité est faible chez *V. planifolia* (indice moyen de 0,04, fig. 2). Le dendrogramme construit uniquement sur les accessions de *V. planifolia* (fig. 4) montre une figure en étoile avec la plupart des bootstraps inférieurs à 60 et aucune structuration de la diversité intraspécifique. Les niveaux de différenciation observés à La Réunion sont de l'ordre de la mutation ponctuelle aléatoire, comme en témoigne le nombre important d'allèles rares détectés. Cette diversité génétique observée ne montre aucun lien avec la diversité morphologique des deux types majeurs rencontrés sur l'île, Classique et Mexique.

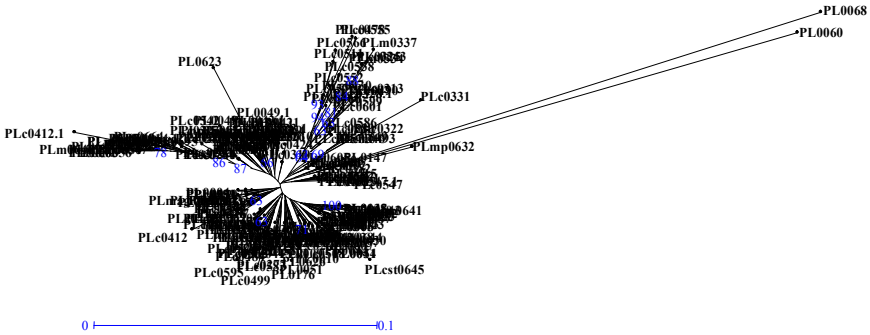

Figure 4 : Représentation de la diversité des 243 *V. planifolia* observées (UMR PVBMT). Arbre construit par Neighbour Joining à partir de la matrice des distances de Sokal et Michener (563 variables, 500 bootstraps).

Ces résultats accréditent les données historiques indiquant que le pool génétique secondaire du vanillier à la Réunion a vraisemblablement été constitué à partir d'une seule introduction.

D'autres accessions de *V. planifolia*, en provenance d'autres zones de culture (Madagascar, Martinique, Guadeloupe, Polynésie, Guatemala…) et/ou de divers Jardins Botaniques ont été étudiées. Elles présentent toutes les mêmes caractéristiques génétiques que les vanilliers de la Réunion, à l'exception de deux accessions de *V. planifolia* originales, l'une du Costa Rica, l'autre d'un Jardin Botanique.

Les observations cytogénétiques (tabl. III) ont montré l'existence de trois classes de valeurs pour les masses nucléaires en cytométrie de flux : 5,06-5,11 pour la majorité des accessions, 10,38 et 7,59.

Tableau III : Observations cytogénétiques.

		Cytométrie de flux		Comptages chromosomiques	
Espèce	**Étalon**	**Nombre d'accessions**	**Masse moyenne (pg)**	**Nombre de cellules observées**	**Nombre de chromosomes**
Polynésie française					
V. tahitensis var. de type « Tahiti »	blé	26	5,36	36	22-30
V. tahitensis var. de type « Haapape »	pois	14	10,30	35	38-58
V. tahitensis hybride F1 "ReaRea"X"Haapape »	blé	1	8,14	12	32-42
V. planifolia (PF+Orsay)	pois	4	5,06	10	22-30
Réunion					
V. planifolia	blé	10	5,11	non observé	
V. planifolia	blé	3	10,38	non observé	
V. planifolia	blé	1	7,59	non observé	

Les accessions de *V. tahitensis* étudiées montrent également une diversité intraspécifique très modérée. Une partie des *V. tahitensis* est fortement groupée avec un indice de dissimilarité moyen de 0,05 (fig. 2) et 0,056 (fig. 3). Trois accessions originales révélées (fig. 2) proviennent de Madagascar et de Jardins Botaniques. L'indice moyen remonte à 0,13 en incluant ces trois types. La plupart des cultivars Polynésiens ont cependant pu être séparés par leurs profils génétiques (EVT) à l'exception notable des deux cultivars les plus répandus, « Tahiti » et « Haapape » qui présentent des profils génétiques identiques.

Là encore les observations en cytométrie de flux ont montré l'existence de trois classes de valeurs pour les masses nucléaires : 5,36 pg pour un nombre d'accessions majoritaire ; 10,30 pg pour un tiers des accessions étudiées et 8,14 pg dans le cas de l'hybride obtenu au SDR entre le cultivar « Rea Rea » (masse nucléaire de 5,36 pg) et un cultivar de type « Haapape » (10,30 pg).

Malgré une grande variabilité du nombre de chromosomes, phénomène déjà rapporté par Nair et Ravindran [10], les comptages chromosomiques effectués à l'EVT ont également mis en évidence trois classes pour les accessions de *V. tahitensis* : 20-30 pour la plupart des cultivars dont les types « Tahiti » et « Rea Rea »; 38-59 pour les cultivars « Haapape » et « Ofe-Ofe » ; 32-42 pour l'hybride « Rea Rea » X « Haapape ».

On observerait donc trois niveaux de ploïdie chez *V. tahitensis*, hypothèse confirmée par le statut intermédiaire de l'hybride entre « Rea Rea » et « Haapape ». Dans le cas des deux cultivars « Tahiti » et « Haapape », morphologiquement différents, les seules différences génétiques observées concernent la masse des noyaux et le nombre de chromosomes, ce qui supporte l'hypothèse d'une origine autopolyploïde de « Haapape » (2n = 4x).

Trois niveaux de ploïdie seraient également observés chez *V. planifolia*, et l'existence d'un intermédiaire d'origine inconnue suggère l'occurrence de cas rares de reproduction sexuée entre di- et tétraploïdes.

L'autopolyploïdisation apparaît donc comme une des voies de diversification des vanilles dans ces régions.

Pour expliquer la variabilité morphologique observée entre des cultivars pour lesquels aucune diversité génétique n'a été trouvée, des variations épigénétiques seront également recherchées. Dans ce but le protocole MSAP (Methyl Sensitive Amplified Polymorphism), basé sur le polymorphisme de restriction observé lors de l'utilisation d'endonucléases sensibles ou non sensibles à l'état de méthylation des cytosines [1], a été adapté pour le séquenceur capillaire ABI-PRISM 3100.

3. ÉTUDE D'UN CARACTÈRE D'INTÉRÊT AGRONOMIQUE : LA TOLÉRANCE AUX VIROSES

Le Cymbidium mosaic virus (CymMV) est un *Potexvirus* (*Flexiviridae*) très fréquent sur les orchidées ornementales cultivées [18], [19]. C'est aussi le virus le plus souvent rencontré sur vanilliers. A la Réunion, le CymMV est associé sur *V. planifolia* a des symptômes sévères entraînant le dépérissement des lianes [2], [8] alors que des symptômes modérés ont été décrits sur *V. tahitentis* dans le Pacifique [7], [11]. Afin d'élucider l'expression du pouvoir pathogène du CymMV sur vanilliers, nous avons précisé le degré de variabilité moléculaire du virus puis quantifié l'incidence d'une souche virale connue sur différents génotypes authentifiés de vanilliers.

3.1. Matériel et méthodes

La caractérisation moléculaire des souches de CymMV a été réalisée par séquençage direct de produits de RT-PCR à partir de trente souches isolées de vanilliers d'origines géographiques variées. Des données complémentaires ont été obtenues dans les bases de données nucléotidiques pour 50 souches isolées d'orchidées ornementales. L'étude a porté sur deux gènes viraux, l'un codant pour la protéine de capside (CP), l'autre pour la polymérase (*Pol*).

La comparaison de la tolérance des vanilliers au CymMV a été réalisé pour 11 accessions de vanilliers cultivés (8 accessions de *V. planifolia*, 1 *V. tahitensis*, 1 *V. pompona* et 1 hybride *V. planifolia* x *V. tahitensis*). Pour chaque accession, 24 jeunes vitro-plants sevrés ont été plantés en février 2005 sous ombrière puis 16 d'entre eux ont été inoculés mécaniquement avec un isolat réunionnais de CymMV. Les plants ont été suivis pendant dix mois pour l'expression de symptômes, la croissance en longueur et en diamètre, l'émission de feuilles. Le titre en virus a été déterminé par RT-PCR quantitative en août 2005 et en février 2006.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Variabilité moléculaire du Cymbidium mosaic virus (CymMV)

L'analyse des séquences, concordante pour les deux régions du génome analysées (CP et *Pol*), aboutit à la distinction de deux groupes de souches de CymMV baptisés A & B (fig. 5). Cette dichotomie pourrait traduire l'origine duale des souches de CymMV propagées à travers le monde. Toutes les souches de CymMV de vanilliers de l'Océan Indien appartiennent au groupe B. Néanmoins, aucune relation particulière n'a été décelée entre les groupes et l'origine géographique ou l'espèce de l'orchidée hôte. Les souches des deux groupes sont indiscernables au niveau des protéines déduites des séquences nucléotidiques. D'éventuelles caractéristiques biologiques spécifiques à chacun des deux groupes restent à déterminer.

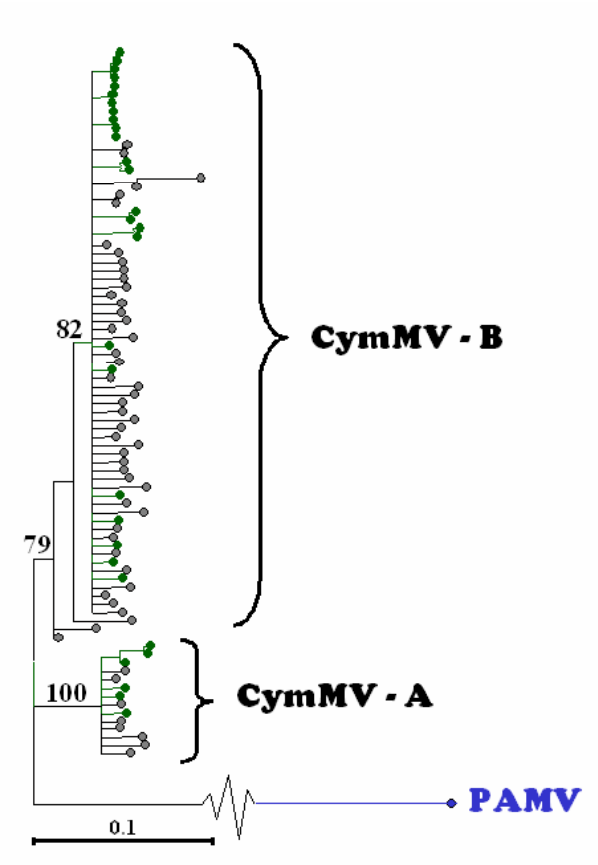

Figure 5 : Ségrégation des souches de CymMV révélée ici par les séquences de CP. Souches isolées de vanillier en vert. PAMV = *Potato aucuba mosaic virus.*

3.2.2. Criblage des vanilliers pour la tolérance au CymMV

Cet essai a confirmé la très bonne efficacité de l'inoculation mécanique du CymMV (+ de 93 % de plants infectés), sauf dans le cas de *V. pompona* (50 %), dont l'apparente résistance à l'inoculation résulterait de la coriacité de son épiderme.

Au champ, l'infection par le CymMV est souvent silencieuse et ne produit qu'occasionnellement des symptômes foliaires tels que stries chlorotiques ou taches nécrotiques. Huit mois après inoculation aucun des plants de l'essai n'a manifesté de symptômes attribuables au CymMV. En revanche, l'inoculation précoce par le CymMV a eu un effet dépressif hautement significatif sur la croissance en longueur des vanilliers (-44 %), le nombre de feuilles émises (-22 %) et le diamètre des tiges (-16 %). La réduction de croissance varie selon les accessions, *V. tahitensis* et *V. pompona* étant peu

affectées, alors que les accessions de *V. planifolia* couvrent toute la gamme de sensibilité.

Les titres en virus déterminés par RT-PCR quantitative sont très élevés (de l'ordre de 5.10^{11} copies du gène de CP par gramme de feuille), en accord avec le fort pouvoir invasif des *Potexvirus,* et relativement homogènes entre les plants (CV < 6 %). Aucune différence sensible n'a été constatée entre les accessions. Le CymMV paraît donc avoir un pouvoir pathogène direct modéré sur les trois espèces étudiées. Les pathologies sévères observées sur le terrain pourraient résulter de la fragilisation des plants sous l'effet d'un complexe de facteurs de stress dont le CymMV ne serait qu'un des éléments.

Les vitesses de croissance de *V. tahitensis* et *V. pompona* ont été plutôt moins affectées par le virus, mais ce caractère de tolérance au CymMV ne différencie pas nettement ces deux espèces de *V. planifolia*. À l'avenir, les sources de tolérance au CymMV pourront aussi être recherchées chez les espèces apparentées aux trois espèces cultivées.

4. REMERCIEMENTS

Ces études ont été financées par le Bureau des Ressources Génétiques (AP 2003-2004). Les auteurs remercient Franc-Christophe BAURENS, Spencer BROWN, Olivier CATRICE et Sonja SILJAK-YAKOVLEV pour l'accueil des membres de l'équipe dans leurs laboratoires, et Xavier PERRIER et Jean-Pierre JACQUEMOUD-COLLET pour l'aide qu'ils ont apportée aux analyses et à l'utilisation du logiciel DARWIN.

RÉFÉRENCES

[1] Baurens F.C., *et al.,* Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome Plant Molecular Biology Reporter, 2003. 21(December 2003): p. 339-348.

[2] Benezet H., *et al.,* Les virus du vanillier à la Réunion. Phytoma, la défense des végétaux, 2000. 526: p. 40-42.

[3] Besse P., *et al.,* RAPD genetic diversity in cultivated vanilla : *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* et *V. pompona*. Plant Science, 2004. 167: p. 379-385.

[4] Bory S., Diversité des vanilliers cultivés, in Ressources Phytogénétiques et Interactions Biologiques. 2004, USTL II: Montpellier.

[5] Bouriquet G., Le vanillier et la vanille dans le monde. Editions Paul Lechevalier ed. Encyclopédie Biologique, ed. M.d.H. Naturelle. Vol. XLVI. 1954, Paris: Editions Paul Lechevalier. 746.

[6] Creste S., Tulmann Neto A., Figueira A., Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamid sequencing gels by silver staining. Plant Molecular Biology Reporter, 2001. 19: p. 299-306.

[7] Grisoni M., *et al.,* Nature, incidence and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. Plant disease, 2004. 88(2): p. 119-124.

[8] Leclercq Le Quillec F., Riviere C., Lagorce A., Spread of cymbidium mosaic potexvirus and potyviruses in vanilla plants grown in shade houses in Reunion Island. Fruits (Paris), 2001. 56(4): p. 249-260.

[9] Lubinsky P., Conservation of wild vanilla. 2003.

[10] Nair R.R., Ravindran P.N., Somatic association of chromosomes and other mitotic abnormalities in *Vanilla planifolia* (Andrews). Caryologia, 1994. 47(1): p. 65-73.

[11] Pearson M.N., *et al.,* Vanilla viruses in the South Pacific. Plant Pathology, 1993. 42(1): p. 127-131.

[12] Perrier X., Flori A., Bonnot F., Les méthodes d'analyse des données, in Diversité génétique des plantes tropicales cultivées, S.M. Hamon P, Perrier X, Glasszmann J.C, Editor. 1999, Cirad: Montpellier, France. p. 43-76.

[13] Pignal M., Deux vanilles du Brésil : *Vanilla palmarum* Lindley et *Vanilla bahiana* Hoehne. L'Orchidophile, 1994(110): p. 23-25.

[14] Portères R., Le genre Vanilla et ses espèces, in Le vanillier et la vanille dans le monde, Bouriquet G., Editor. 1954, Editions Paul Lechevalier: Paris. p. 94-290.

[15] Soto-Arenas M., Vanilla, in Genera Orchidacearum: Orchidoideae, Vanilloideae, Pridgeon A.M., *et al.,* Editors. 2003, Oxford University Press: Oxford. p. 321-334.

[16] Stehlé H., Le Vanillier et sa culture. I. Histoire - Botanique - Géographie - Ecologie du vanillier. Fruits, 1952. 7(2): p. 50-56.

[17] Vos P., *et al.,* AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research, 1995. 23: p. 4407-4414.

[18] Wong S.M., *et al.,* Cymbidium mosaic potexvirus RNA: Complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis - Brief report. Archives of Virology, 1997. 142(2): p. 383-391.

[19] Zettler F.W., *et al.,* Viruses of orchids and their control. Plant Disease, 1990. 74(9): p. 621-626.