

L'hévéa

Marc Seguin, Albert Flori,
Hyacinthe Legnaté, André Clément-Demange

La répartition taxonomique des plantes à latex dans le règne végétal est très dispersée. Parmi les 12 500 espèces à latex, qui appartiennent à 900 genres, 1 000 espèces, réparties dans 76 familles, produisent du caoutchouc, ou cis-polyisoprène (POLHAMUS, 1962). Au sein du genre *Hevea*, qui offre des conditions favorables à l'exploitation, l'espèce *Hevea brasiliensis* est la source quasi exclusive du caoutchouc naturel en raison de sa productivité et de la qualité de son caoutchouc.

Le caoutchouc naturel, sous forme de latex ou coagulé, est collecté et transporté vers une usine de séchage, qui produit des feuilles fumées ou des balles de caoutchouc granulé sec. Il est le plus souvent exporté vers les zones de transformation finale proches des marchés de consommation. La production mondiale s'élève à près de 6 millions de tonnes par an et provient de la zone intertropicale, où la culture couvre environ 8 millions d'hectares. Elle est assurée à plus de 90 % par l'Asie du Sud-Est et dominée par trois pays : la Thaïlande, l'Indonésie et la Malaisie. L'Afrique réalise 6 % de la production. En Amérique du Sud, le développement de la culture est limité par la maladie sud-américaine des feuilles, provoquée par le champignon *Microcyclus ulei*.

Le caoutchouc naturel représente le tiers de la production totale de caoutchouc. Il possède, par rapport au caoutchouc synthétique issu de la pétrochimie, des qualités spécifiques, telles que la résistance à l'échauffement.

L'industrie des pneus d'avion, par exemple, utilise uniquement du caoutchouc naturel, et l'industrie des pneumatiques en général consomme 70 % de la production, les 30 % restants étant employés dans une multitude de produits.

La botanique et les ressources génétiques

La botanique et la taxonomie

L'hévéa est un arbre à croissance rythmique et à ramification orthotrope, qui peut dépasser 30 mètres de hauteur et atteindre 3 mètres de circonférence dans son milieu naturel, le bassin amazonien. En plantation, les arbres greffés n'atteignent pas ces dimensions. C'est une essence tropicale de lumière, qui nécessite ensoleillement et humidité et tolère mal les altitudes supérieures à 600 mètres. Les feuilles comportent trois folioles de forme ovoïde, disposées à l'extrémité d'un long pétiole ; elles sont renouvelées chaque année par une défoliation-refoliation naturelle intervenant en saison sèche. C'est une plante monoïque préférentiellement allogame, dont les fleurs unisexuées, de couleur jaune, ont une dimension de quelques millimètres et sont groupées en racèmes. Le fruit de l'hévéa, dont la taille varie de 0,5 à 5 centimètres selon les espèces, est caractéristique du fruit des euphorbiacées, appelé tricoque, composé de trois loges contenant chacune une graine.

Au sein du genre *Hevea* (Willd.), bien défini, les espèces sont difficiles à différencier, ce qui a été à l'origine de beaucoup de confusions, de désaccords et de fluctuations entre les auteurs. Hormis pour l'espèce *H. brasiliensis*, les observations ont été réalisées dans des conditions souvent difficiles sur le terrain et sont généralement assez sommaires. SCHULTES (1990) présente la synthèse la plus récente et distingue dix espèces, dont trois sont subdivisées en quatre variétés. On ne connaît pas de barrière biologique à la recombinaison entre ces espèces. Les hybridations naturelles paraissent limitées en milieu forestier non perturbé, mais de nombreuses variations morphologiques intraspécifiques sont observées. Il conviendrait donc de parler d'un complexe d'espèces selon la définition de Pernès (PERNÈS, 1984) ; les neuf espèces sauvages apparentées faisant partie du pool génique primaire de l'espèce cultivée *H. brasiliensis*. Elles sont donc d'un grand intérêt pour les ressources génétiques de l'hévéa cultivé, d'autant qu'elles présentent des caractéristiques utiles telles que des résistances génétiques à certaines maladies (SCHULTES, 1977 ; SCHULTES, 1990).

La structure du génome

A l'exception d'un clone triploïde d'*H. guianensis* et de l'existence possible d'une race d'*H. pauciflora* à 18 chromosomes (BALDWIN, 1947), toutes les espèces du genre ont un nombre de chromosomes de $2n = 36$.

De fortes similitudes entre différentes paires de chromosomes suggèrent une duplication ancienne du stock chromosomique. A la méiose, on observe de temps en temps la formation de multivalents, et notamment de quadrivalents, ce qui indique un certain degré d'affinité entre paires de chromosomes homéologues. L'hévéa serait donc un genre amphidiploïde, c'est-à-dire un tétraploïde qui se comporte à la méiose comme un diploïde, résultant du croisement de deux espèces sauvages ancestrales diploïdes non identifiées (BOUHARMONT, 1960 ; ONG, 1985). Le nombre chromosomique de base serait donc égal à 9, ce qui semble plus proche du nombre chromosomique habituel des euphorbiacées, qui varie de 6 à 11 (ONG, 1985).

Cependant, l'analyse des ségrégations de marqueurs isoenzymatiques ou RFLP révèle une majorité de locus non dupliqués (SEGUIN *et al.*, 1996). Ainsi, l'hévéa pourrait être un amphidiploïde, dont les deux génomes homéologues auraient fortement divergé. Il n'est pas possible d'affirmer que les rares duplications observées dans le génome de l'hévéa (SEGUIN *et al.*, 1998) témoignent de l'origine polyploïde de l'hévéa. Ces duplications pourraient aussi provenir de remaniements chromosomiques postérieurs à la polyploïdisation. La même situation s'observe chez le manioc, une autre euphorbiacée à $2n = 36$ chromosomes (FREGENE *et al.*, 1997).

Une première approche de la caractérisation globale du génome nucléaire d'*H. brasiliensis* a été proposée (LOW et BONNER, 1985). L'étude de la cinétique de réassociation de courts fragments d'ADN marqué (300 nucléotides) indique la présence de 43 % d'ADN simple copie et de 32 % de séquences moyennement répétées (fréquence de répétition d'environ 1 000), le reste de l'ADN étant hautement répété ou palindromique. La cinétique de réassociation d'ADN simple copie permet d'estimer la taille globale du génome à $6 \cdot 10^8$ paires de bases. Cependant, une étude ponctuelle que nous avons menée par cytométrie en flux a conduit à une estimation de la taille du génome haploïde de l'hévéa de $2 \cdot 10^9$ paires de bases, identique chez les cinq espèces étudiées, *H. brasiliensis*, *H. benthamiana*, *H. guianensis*, *H. pauciflora* et *H. spruceana*. Cette valeur a également été obtenue par microdensitométrie chez *H. brasiliensis* et *H. camargoana* par BENNETT et LEITCH (1997).

Les ressources génétiques

LES PROSPECTIONS, LES INTRODUCTIONS ET LES COLLECTIONS

En 1747, Fresneau donne la première description de l'arbre « caoutchouc », qui sera plus tard nommé hévéa. D'abord produit de cueillette récolté par les *seringueiros* en Amérique du Sud, le caoutchouc naturel connaît son essor après la mise au point de la mastication et de l'imperméabilisation, puis la découverte de la vulcanisation en 1830 et le développement des plantations (SERIER, 1993).

En 1876, sur l'insistance de Marckham, qui avait déjà réussi le transfert du quinquina d'Amérique du Sud en Asie, Wickham, planteur britannique installé au Brésil, fait recueillir 70 000 graines près de Boim, à l'embouchure de l'Amazone et du Tapajós, en amont de Santarém (Etat du Pará, d'où l'appellation initiale d'arbre du Pará pour l'espèce *H. brasiliensis*). Il les convoie par bateau vers le jardin botanique de Kew, au Royaume-Uni, où seulement 4 % des graines germent après trois semaines de traversée. Plusieurs envois de plantules sont ensuite réalisés vers Ceylan et Singapour avec des succès divers. On considère que les 22 arbres plantés au jardin botanique de Singapour en 1877 sont ainsi à l'origine de la presque totalité des plantations d'hévéa dans le monde. Les variétés (clones de greffe) issues de sélection en Asie à partir de ces plants introduits à la fin du XIX^e siècle sont appelés de ce fait clones Wickham. Même s'il est probable que d'autres introductions de génotypes ont eu lieu par la suite, l'histoire n'a retenu que celle, exemplaire, de Wickham et l'on admet le rôle prépondérant de ce matériel dans la composition génétique des cultivars actuels.

Les clones Wickham se sont avérés très sensibles à *Microcyclus* en Amérique du Sud. D'importants efforts de sélection ont alors été déployés par les compagnies Ford et Firestone, au Brésil et au Guatemala, puis par les centres de recherche brésiliens afin d'obtenir des clones productifs et résistants (clones F, FB, FX, FDR, MDF, MDX, IAN, CNSAM). L'introgression chez *H. brasiliensis* de gènes de résistance totale provenant d'autres espèces du genre n'a pas été couronnée de succès, ce type de résistance étant facilement contourné par le pathogène. La stratégie actuelle vise à associer par croisements plusieurs composantes de la résistance partielle pour atteindre un niveau suffisant de résistance génétique durable à la maladie (RIVANO, 1992).

L'é étroitesse supposée de la base génétique du matériel Wickham introduit puis sélectionné en Asie et en Afrique, qu'illustre la forte sensibilité générale de ce matériel à *Microcyclus*, a conduit à organiser des prospections au sein de l'aire de répartition de l'espèce *H. brasiliensis*.

En Malaisie, le RRIM (Rubber Research Institute of Malaysia) a importé du Brésil, en 1951-1952 puis en 1966, des seedlings issus d'arbres sauvages de sept espèces du genre *Hevea*, ainsi que des clones sélectionnés par Ford (F, FB, FX) et par l'Instituto Agrônômico do Norte (IAN) au Brésil (ONG, 1987).

En 1974, l'Irca (Institut de recherches sur le caoutchouc, France), en coopération avec l'EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brésil), a réalisé une première prospection en Amazonie, dans les Etats de l'Acre (22 clones) et du Rondônia (20 clones), sous la forme de bois de greffe collectés en forêt sur des arbres jugés exceptionnels. A cette prospection viennent s'ajouter 18 clones de la prospection Firestone dans le Madre de Dios (MDF) péruvien.

La prospection internationale organisée en 1981 par l'IRRDB (International Rubber Research and Development Board), pour l'espèce *H. brasiliensis*, dans 16 districts et 60 localités des Etats de l'Acre (LINS *et al.*, 1981), du Rondônia (GONÇALVES, 1981) et du Mato Grosso (DE PAIVA, 1981) au Brésil, a permis de mettre en collection 9 800 génotypes sauvages au centre asiatique de Malaisie (ONG *et al.*, 1995) et 2 500 génotypes au centre africain de Côte d'Ivoire (CHAPUSET *et al.*, 1995). La localisation géographique des districts prospectés est donnée dans le tableau 1. Cette prospection a collecté essentiellement des graines, mais aussi 130 génotypes issus de bois de greffe récoltés sur des arbres jugés exceptionnels, appelés ortets. Des échanges entre les deux centres et une distribution de matériel génétique aux autres pays membres de l'IRRDB ont été réalisés. La plupart des génotypes ont été greffés et sont conservés sous forme de clones en collection vivante.

Après 1945, Schultes avait rassemblé, entre autres sur les sites de Calima et de Palmira, d'importantes collections de matériel prospecté en Colombie. En 1985, avec l'accord du gouvernement colombien, l'Irca a transféré, d'abord à la Guadeloupe puis en Côte d'Ivoire, 341 génotypes « SCH », issus de ces deux sites (NICOLAS, 1985).

Tableau 1. Code et origine des principales populations d'*H. brasiliensis* en collection.

Code	Prospection	Etat et pays d'origine	Lieu d'origine (districts)	Bassin fluvial (affluents de l'Amazone)
AC/T	IRRDB 1981	Acre, Brésil	Tarauaca	rio Juruá
AC/F	IRRDB 1981	Acre, Brésil	Feijo	rio Juruá
AC/S	IRRDB 1981	Acre, Brésil	Sena Madureira	rio Purus
AC/B	IRRDB 1981	Acre, Brésil	Brasília	rio Purus
AC/X	IRRDB 1981	Acre, Brésil	Xapuri	rio Purus
RO/A	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Ariquemes	rio Madeira
RO/C	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Calama	rio Madeira
RO/CM	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Costa Marques	rio Madeira
RO/J	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Jarù	rio Madeira
RO/JP	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Jiparana	rio Madeira
RO/OP	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Ouro Preto	rio Madeira
RO/PB	IRRDB 1981	Rondônia, Brésil	Pimenta Bueno	rio Madeira
MT/A	IRRDB 1981	Mato Grosso, Brésil	Aracatuba	rio Tapajós
MT/C	IRRDB 1981	Mato Grosso, Brésil	Juruena	rio Tapajós
MT/IT	IRRDB 1981	Mato Grosso, Brésil	Itauba	rio Tapajós
MT/VB	IRRDB 1981	Mato Grosso, Brésil	Vila Bella	rio Madeira
MDF	Firestone	Madre de Dios, Pérou	?	rio Madeira
SCH	Schultes coll. Calima et Palmira	Colombie	?	?
W	Wickham	Pará, Brésil	Santarém	rio Tapajós

L'Irca a également reçu du Brésil et introduit en Côte d'Ivoire en 1986, 23 clones CNSAM provenant de la collection de l'EMBRAPA à Manaus et comprenant des génotypes *H. pauciflora* et les seuls *H. brasiliensis* prospectés dans l'Etat brésilien de l'Amazonas (GONÇALVES *et al.*, 1983).

En conclusion, on peut considérer que l'espèce *H. brasiliensis* est bien représentée dans les collections vivantes, en Malaisie et en Côte d'Ivoire, par plusieurs milliers de génotypes. Cependant, l'aire de répartition de cette espèce a été échantillonnée de façon très hétérogène : les Etats de l'Amazonas et du Pará au Brésil, qui en constituent la plus grande part, ont été très peu prospectés. Il serait également nécessaire de réaliser une prospection des autres espèces du genre afin de créer un centre de conservation et d'étude de l'ensemble du genre *Hevea*. Les observations disponibles sur les collections Schultes et CNSAM montrent qu'il existe des génotypes d'espèces autres qu'*H. brasiliensis* dans ces collections.

LA CONSERVATION, LA MULTIPLICATION ET L'ÉCHANGE DES ACCESSIONS

A l'état naturel, l'hévéa se reproduit par graines. La mise au point du greffage par van Helten en 1918 a permis de développer la sélection clonale et de conserver les génotypes sous forme de collections vivantes, durables et relativement peu coûteuses à créer et à entretenir en jardins à bois de greffe. La multiplication s'effectue en pépinière par greffage sur des porte-greffe issus de graines.

Le délai maximal de transport est d'une semaine pour le bois de greffe et de trois semaines pour les graines (les graines sont dites récalcitrantes : la durée du pouvoir germinatif est faible). Au stade expérimental, la conservation du pollen ne dépasse pas un mois et les quantités récoltables sont très faibles ; on ne peut donc envisager de transfert génétique sous cette forme.

L'organisation de la diversité génétique

Ce chapitre fait le point des connaissances actuelles sur l'organisation de la diversité de l'hévéa. Il se fonde sur les acquis d'études antérieures et présente des résultats complémentaires issus d'analyses isoenzymatiques sur un plus grand nombre de génotypes. Ces données supplémentaires nous ont permis de développer, sur un nombre de génotypes suffisant, une démarche originale de comparaison entre variabilité morphoagronomique et diversité génétique de marqueurs neutres, par une analyse factorielle multiple.

Les recherches sur la diversité génétique de l'hévéa avaient pour objectifs de mieux connaître l'importance et l'organisation de la diversité et la relation entre variabilité agronomique et diversité génétique. Ces études visaient

à répondre aux problèmes des sélectionneurs, qui souhaitent définir une stratégie optimale de conservation des ressources génétiques, échantillonner au mieux les populations pour leur évaluation agronomique et choisir les plans de croisement et les géniteurs.

La variabilité agromorphologique

L'ÉVALUATION AGRONOMIQUE

L'évaluation agronomique du matériel issu de prospection a été conduite afin de constituer, avant toute recombinaison génétique, deux collections de taille réduite. L'une, appelée collection de travail, vise à concentrer rapidement les allèles d'intérêt agronomique en vue d'apprécier les possibilités de sortie clonale utilisable, notamment après croisement avec le matériel Wickham. Cette approche peut se satisfaire de la seule évaluation agronomique, mais le marquage génétique doit permettre d'apprécier la réduction de variabilité opérée par cette sélection intense et très directionnelle. L'autre devrait être construite selon le concept de *core collection*, c'est-à-dire en cherchant à maintenir la plus grande diversité possible dans un échantillon de taille réduite. Cette démarche nécessite la mise en œuvre de toutes les méthodes d'évaluation : agronomique, morphologique, isoenzymatique et moléculaire, pour les génomes nucléaire et cytoplasmique. Des recherches méthodologiques sont en cours, notamment sur l'hévéa, afin d'optimiser la sélection des génotypes tout en intégrant ces différents types d'information (HAMON *et al.*, 1998).

Un premier essai portant sur les 2 500 génotypes issus de la prospection de l'IRRDB dans les Etats de l'Acre (AC), du Rondônia (RO) et du Mato Grosso (MT) au Brésil, à raison d'un arbre par génotype, a permis de réaliser une première évaluation précoce globale de la production et de la croissance des arbres. La production moyenne de ce matériel sauvage est très faible, elle ne représente que 12 % de celle du clone témoin Wickham, GT1. De même, son taux de croissance est en moyenne inférieur à celui de GT1. L'aspect architectural des arbres se caractérise par une prédominance des clones filant en hauteur, avec peu ou pas de branches ; ce caractère correspondrait à une adaptation naturelle à l'environnement forestier, qui permet aux jeunes arbres d'accéder rapidement à la lumière. On trouve cependant une faible proportion de clones qui ont une production voisine de celle de GT1, une bonne vigueur ou une abondante ramification (CHAPUSET *et al.*, 1995 ; CLEMENT-DEMANGE *et al.*, 1997).

Du point de vue agronomique, il apparaît un gradient de différenciation d'est en ouest de l'aire de répartition des génotypes prospectés, comme l'illustre le premier plan de l'analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les valeurs moyennes de production, de croissance et d'architecture, par localité (Vi Cao, comm. pers. ; figure 1). Les génotypes du Mato Grosso se distinguent

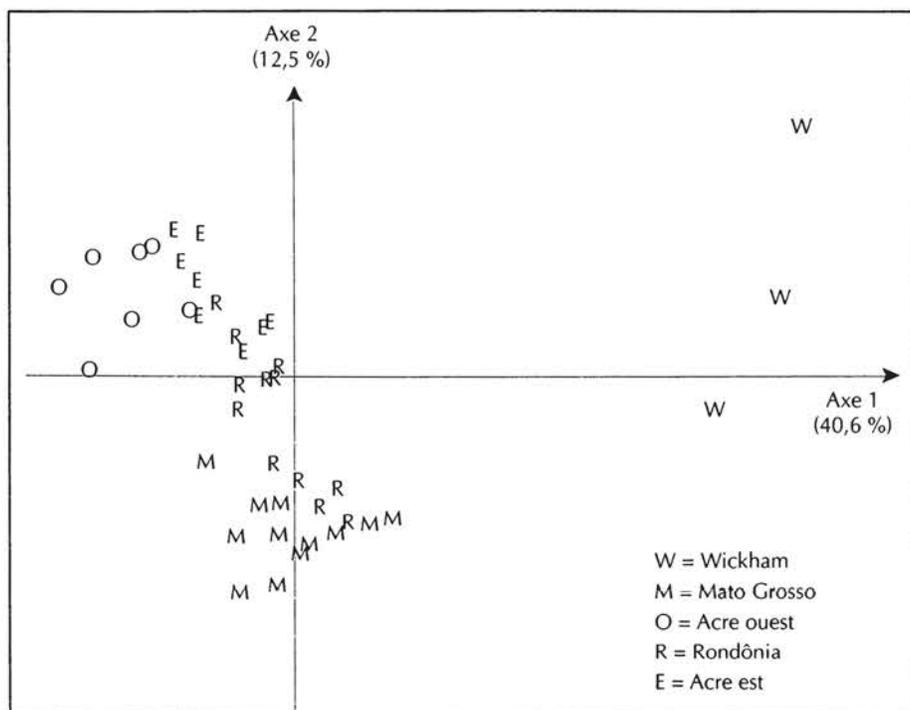


Figure 1. Variabilité agronomique du matériel amazonien et des clones Wickham. Plan 1-2 de l'ACP sur les valeurs moyennes de trois clones Wickham et de 41 localités de la collection de l'IRRDB, calculée sur 2 300 clones amazoniens.

notamment de ceux de l'Acre par une meilleure aptitude à la ramification et une production plus forte, mais ils semblent plus sensibles à *Colletotrichum*, champignon responsable d'une maladie foliaire.

LA MORPHOLOGIE FOLIAIRE

Une première étude de la structure génétique de la prospection de l'IRRDB dans les Etats de l'Acre, du Rondônia et du Mato Grosso a été réalisée par une analyse biométrique de la morphologie des unités de croissance et des feuilles. Les observations sont phénotypiques et 34 % de la variance est due aux effets de l'environnement et aux erreurs. La plus grande part de la variabilité génétique (42 %) se situe entre les génotypes d'une même localité de prospection, tandis que les différences entre Etats ou entre districts apparaissent faibles. Néanmoins, l'Acre se distingue des deux autres Etats (NICOLAS *et al.*, 1988).

La diversité biochimique et moléculaire

La diversité génétique d'un échantillon des collections d'*H. brasiliensis* a été caractérisée à l'aide des marqueurs biochimiques et moléculaires. Les effectifs

utilisés dans ces études sont donnés dans le tableau 2. Les autres espèces du genre *Hevea* étant quasiment absentes des collections, il n'a pas été possible d'aborder l'étude de leur diversité. Un ou deux génotypes des quatre espèces *H. benthamiana*, *H. guianensis*, *H. pauciflora* et *H. spruceana* ont pu être caractérisés par les isoenzymes ou les RFLP, ce qui a permis d'identifier des allèles absents de l'espèce *H. brasiliensis*.

Tableau 2. Nombre de clones, par population et par type de marqueur, utilisés dans les études de diversité génétique.

Populations	isoenzymes	RFLP	
		nucléaires	ADNmt
Wickham	203	73	28
Hybrides (Wickham × Amazoniens)	81	0	21
Pérou (MDF)	14	0	12
Colombie (SCH)	48	0	83
Brésil EMBRAPA-Irca 1974	55	0	30
Brésil IRRDB 1981	486	92	220
Total	887	165	395

LES ISOENZYMES

L'analyse isoenzymatique a mis en évidence 14 locus polymorphes, à l'aide de 12 systèmes isoenzymatiques, chez *H. brasiliensis* (CHEVALLIER, 1988 ; CHEVALLIER *et al.*, 1988 ; SEGUIN *et al.*, 1995a).

Le premier niveau d'analyse a porté sur la variabilité intergénotype, c'est-à-dire entre les clones. L'analyse de diversité la plus précise, en terme d'échantillonnage des populations, a été réalisée sur 486 clones de la collection de l'IRRDB, qui proviennent de 16 districts des trois Etats du Brésil. Les génotypes ont été caractérisés pour 8 locus polymorphes, sans données manquantes, et 25 allèles ont été révélés.

Le premier axe de l'AFC réalisée sur les données d'allèles représente 20 % de la variabilité totale (figure 2). Il révèle une séparation en deux groupes de clones : le premier groupe rassemble presque exclusivement la quasi-totalité des génotypes de quatre districts — trois districts du Mato Grosso (MT/A, MT/I et MT/C) et un du Rondônia (RO/PB) — ; le second groupe est constitué des génotypes appartenant aux douze districts restants — cinq du Rondônia, les cinq de l'Acre et le district MT/VB du Mato Grosso.

Le second axe, qui représente 10 % de la variabilité, montre une structuration intra-Etat avec la différenciation d'un troisième groupe constitué des deux districts les plus à l'ouest de l'Acre, AC/T et AC/F (figure 2). Comme pour les données morphoagronomiques, la variabilité génétique est faible entre les

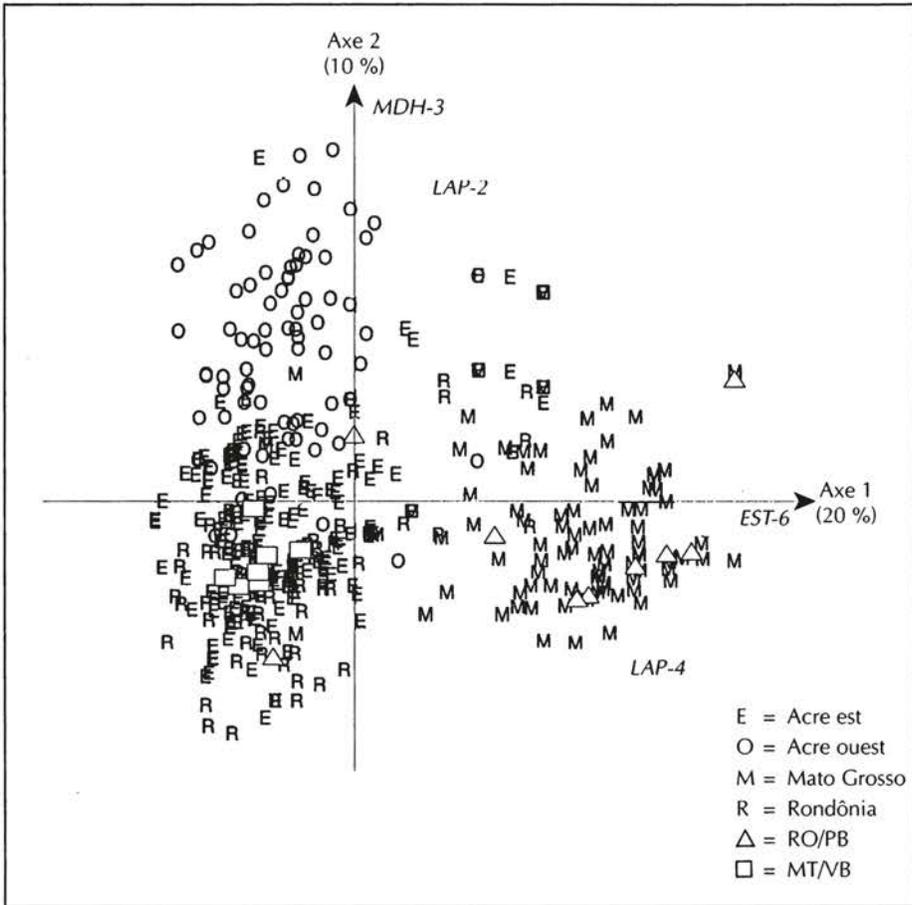


Figure 2. Diversité génétique du matériel amazonien révélée par les isoenzymes. Plan 1-2 de l'AFC sur les données de présence-absence de 25 allèles de 8 locus, chez 486 clones de la collection de l'IRRDB. MDH-3, LAP-2, LAP-4, EST-6 : allèles contribuant le plus fortement aux deux premiers axes.

groupes ou les origines et forte à l'intérieur des groupes. Malgré cette part relativement faible de diversité intergroupe — 30 % de l'inertie totale sur le premier plan de l'AFC —, la différenciation génétique en trois groupes apparaît très clairement.

Cette structuration en trois groupes avait également été mise en évidence dans une étude portant sur un échantillon plus réduit de génotypes, mais pour 11 locus isoenzymatiques (BESSE *et al.*, 1994 ; SEGUIN *et al.*, 1996). Cette étude ne comprenait pas le district RO/PB, mais incluait la population Wickham. La population Wickham se révèle génétiquement proche du groupe Mato Grosso. Elle présente un haut niveau d'hétérozygotie et de polymorphisme, très inférieur, cependant, à celui des populations amazoniennes, dont la richesse allélique est plus grande. Aucun allèle n'est spécifique de la collection Wickham, ni de l'un ou l'autre des trois Etats de la prospection amazonienne. La diversité

génétique des clones Wickham a par ailleurs permis de mettre au point une méthode isoenzymatique d'identification variétale (LECONTE *et al.*, 1994).

Le second niveau d'analyse concerne la diversité entre populations de génotypes, les populations étant définies en fonction de leur localisation. Le niveau de subdivision dépend de la finesse d'analyse souhaitée, mais surtout de l'effectif des génotypes étudiés par population.

La diversité interpopulation a été caractérisée en utilisant la distance de Nei (1978) sur les fréquences alléliques de 8 locus isoenzymatiques. La figure 3 montre l'arbre UPGMA construit pour seize districts du Brésil, une population du Pérou (MDF), deux collections de Colombie (populations Schultes) et la population Wickham, soit 590 génotypes au total. Pour les populations brésiliennes, cette analyse par population aboutit aux mêmes conclusions que l'analyse factorielle sur les génotypes pris individuellement. On retrouve le regroupement des districts en trois sous-ensembles : l'ouest de l'Acre ; l'est de l'Acre, le Rondônia et le district MT/VB ; le Mato Grosso et le district RO/PB.

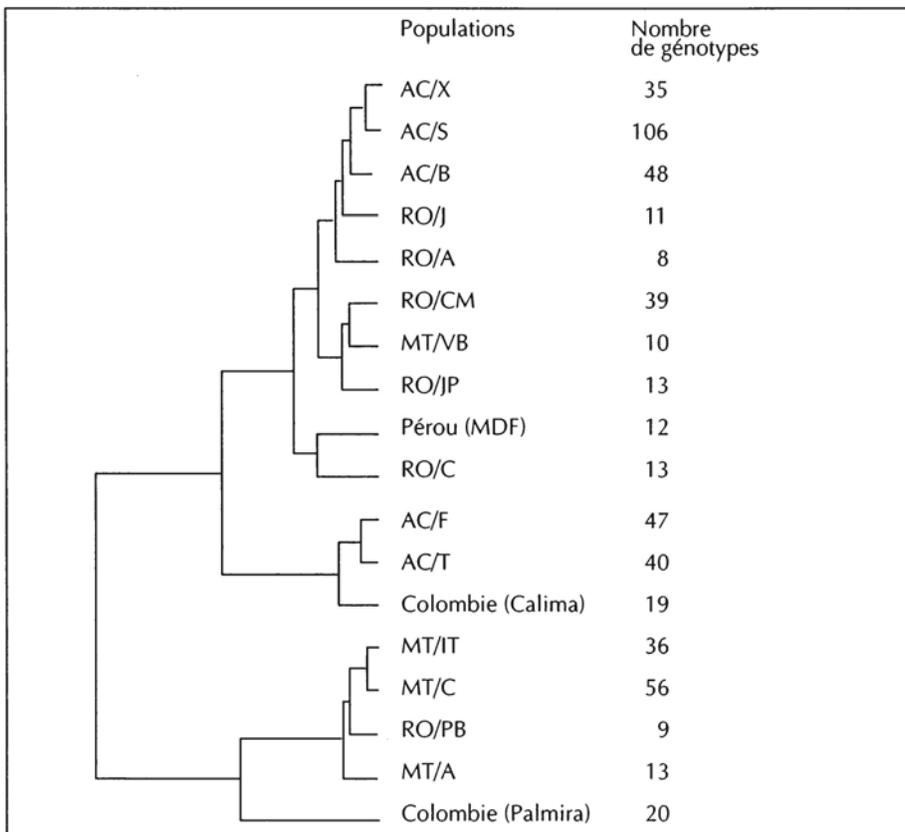


Figure 3. Distances génétiques entre populations de clones amazoniens. Arbre UPGMA construit à partir de la distance de Nei (1978) calculée sur les fréquences alléliques par population, pour 8 locus enzymatiques.

La population péruvienne est regroupée en premier avec un district du Rondônia (RO/C). Les deux populations colombiennes (SCH) paraissent génétiquement très éloignées l'une de l'autre. La première, Calima, se rapproche des deux districts de l'ouest de l'Acre ; la seconde, Palmira, est plus proche du groupe Mato Grosso que des autres populations, mais possède des allèles spécifiques, caractéristiques d'autres espèces qu'*H. brasiliensis*, qui la distinguent nettement.

L'étude isoenzymatique a été réalisée en identifiant les allèles à chaque locus grâce à la connaissance du déterminisme génétique des zymogrammes. Cela a permis d'aborder l'analyse de la diversité génétique de l'hévéa à l'aide de la génétique des populations. Le calcul des F statistiques de Wright montre ainsi que 75 % de la diversité du matériel brésilien se situe au niveau intrapopulation, et donc que 25 % de la variabilité correspond à la différenciation entre les districts. Lorsque l'on considère les trois groupes génétiques identifiés sur l'AFC comme des unités populationnelles, la part de diversité intragroupe atteint 80 %.

De plus, les populations constituées par les districts prospectés présentent toutes un écart à la panmixie avec un déficit d'hétérozygotes, les valeurs de l'indice de fixation F_{IS} étant comprises entre 0,10 et 0,60. Compte tenu de l'étendue géographique des districts, il est probable que ce déficit n'est pas dû à une différenciation intradistrict en sous-populations, mais plutôt à des croisements préférentiels entre arbres voisins liés au faible taux de dissémination du pollen et des graines. Les données passeport étant disponibles pour la collection amazonienne de l'IRRDB jusqu'à l'échelon de la localité de prospection dans chaque district, il serait possible d'aborder cette question, sous réserve d'analyser un plus grand nombre de génotypes.

LES RFLP NUCLÉAIRES

L'étude par RFLP a été réalisée sur un nombre plus restreint de génotypes : 73 Wickham et 92 amazoniens provenant des quinze districts de prospection, le district RO/PB n'étant pas représenté. En revanche, elle a porté sur un plus grand nombre de locus que pour les isoenzymes. Le déterminisme génétique des profils RFLP n'ayant pas été établi, le nombre exact de locus polymorphes n'est pas connu. Une même sonde peut en effet révéler deux locus ou davantage. Vingt-cinq sondes ayant été utilisées, le nombre de locus polymorphes ne doit cependant pas être très éloigné de 25. La cartographie du génome de l'hévéa a montré que l'on révèle généralement un seul locus avec ce type de sonde génomique (SEGUIN *et al.*, 1996 ; 1998).

Les résultats obtenus grâce aux RFLP soulignent l'enrichissement génétique apporté par les populations amazoniennes et l'existence d'une structuration génétique forte en fonction de l'origine des prospections. De plus, par rapport aux isoenzymes, en permettant l'accès à une plus grande part du génome, les RFLP nucléaires apportent une information spécifique : ils révèlent une

différenciation très marquée des cinq districts de l'Acre, qui forment un groupe génétique distinct. En revanche, les RFLP ne mettent pas en évidence l'individualisation du groupe de l'ouest de l'Acre, révélé par les isoenzymes.

Dans l'ensemble, l'étude par les RFLP nucléaires confirme et renforce les observations réalisées avec les isoenzymes. On retrouve, en particulier, la même partition de la diversité en intra et intergroupe, avec également 30 % de la variabilité sur le premier plan de l'AFC correspondant à la différenciation en groupes (BESSE *et al.*, 1994 ; SEGUIN *et al.*, 1995b ; 1996). Avec les deux types de marqueurs, le premier axe des AFC correspond à la différenciation du groupe de trois districts du Mato Grosso, ce groupe apparaissant comme le plus proche de la population Wickham.

LES RFLP CYTOPLASMIQUES

Les génomes cytoplasmiques ont le plus souvent une hérédité uniparentale (REBOUD et ZEYL, 1994 ; MOGENSEN, 1996), qui interdit la recombinaison génétique, et une vitesse d'évolution propre à chaque génome (WOLFE *et al.*, 1987 ; PALMER et HERBON, 1988). L'étude de la diversité mitochondriale et chloroplastique est donc complémentaire de celle du génome nucléaire.

L'étude du génome mitochondrial (ADNmt) a porté sur 395 génotypes. Un fort polymorphisme a été révélé par les RFLP (LUO et BOUTRY, 1995 ; LUO *et al.*, 1995). On retrouve, comme à l'échelle nucléaire, la divergence des populations de l'Acre ainsi qu'une séparation entre les génotypes de l'ouest de l'Acre (districts AC/T et AC/F) par rapport à ceux de l'est (AC/B, AC/S et AC/X) comme avec les isoenzymes. Les génotypes du Pérou (MDF) se regroupent préférentiellement avec les génotypes du district RO/C du Rondônia, comme avec les isoenzymes.

En revanche, les populations du Mato Grosso et du Rondônia sont hétérogènes et ne se regroupent pas en fonction de leur origine. De même, les populations colombiennes (SCH) apparaissent très polymorphes et ne s'individualisent pas. De plus, à la différence des isoenzymes et des RFLP nucléaires, la diversité de l'ADNmt est pratiquement nulle au sein des clones Wickham, qui présentent tous, sauf le clone GT1, un même type mitochondrial spécifique. Le clone cultivé GT1, mâle-stérile, présente un type mitochondrial unique très différent du type Wickham dominant.

La diversité du génome chloroplastique (ADNcp) a également été étudiée par les RFLP, avec des sondes d'ADNcp de féverole, sur 217 des 395 génotypes précédents. Comme pour beaucoup d'autres espèces, l'ADNcp présente, chez l'hévéa, un polymorphisme très faible. Deux types chloroplastiques seulement ont été trouvés, contre 126 types mitochondriaux détectés sur le même échantillon de clones. Le type minoritaire, présent chez 37 génotypes, est caractéristique des trois districts de l'est de l'Acre, auxquels s'ajoutent trois des six génotypes du district RO/C présents dans l'étude (LUO *et al.*, 1995).

L'ORGANISATION DE LA DIVERSITÉ BIOCHIMIQUE ET MOLÉCULAIRE

Il apparaît donc clairement que l'apport des marqueurs moléculaires a été considérable pour la caractérisation des ressources génétiques de l'hévéa. Ils ont permis de révéler l'importance de la diversité d'*H. brasiliensis*. Les différents types de marqueur utilisés ont donné des résultats globalement concordants sur l'organisation de cette diversité, qui se structure en fonction de l'origine géographique des génotypes. De l'ensemble de ces études, il est possible de dégager les conclusions suivantes.

Sur la base des similarités génétiques entre les génotypes ou les populations, six groupes génétiques ont été identifiés au sein du matériel d'*H. brasiliensis* étudié (Seguin *et al.*, 1996) :

- le groupe 1 rassemble deux districts de l'ouest de l'Acre et la population Calima de Colombie ;
- le groupe 2 correspond aux trois districts de l'est de l'Acre ;
- le groupe 3 comprend six districts du Rondônia, le district MT/VB du Mato Grosso et la population MDF du Pérou ;
- le groupe 4 réunit trois districts du Mato Grosso et le district RO/PB du Rondônia ;
- le groupe 5 est constitué de la collection Palmira de Colombie ;
- le groupe 6 correspond à la population Wickham.

La localisation géographique des populations et des groupes génétiques est présentée sur la figure 4.

Ces groupes génétiques rassemblent des populations géographiquement proches. De plus, la relation entre la distance géographique et la distance génétique ne se retrouve pas seulement à l'intérieur d'un même groupe, mais également entre les groupes. Ainsi, la différenciation moléculaire du groupe 6 (Wickham) tient essentiellement à l'existence d'un type mitochondrial particulier, mais au niveau nucléaire, ce groupe apparaît proche du groupe 4, le plus proche géographiquement. La place des populations Schultes de Colombie est plus difficile à discuter faute de données passeport précises.

Cette organisation de la diversité d'*H. brasiliensis* apparaît très clairement liée au réseau hydrographique du bassin amazonien (tableau 1 ; figure 4), qui détermine les flux de gènes, et donc la similarité génétique, entre populations ou groupes de populations. Pour les populations brésiliennes, dont les données passeport sont disponibles et précises, on peut associer à chaque groupe un bassin fluvial (figure 4) : au groupe 1, le rio Juruá ; au groupe 2, le rio Purus ; au groupe 3, le rio Madeira et ses prolongements — le rio Guaporé au Brésil et le rio Madre de Dios au Pérou — ; au groupe 4, le rio Tapajós.

De même, certaines similarités entre les groupes peuvent s'expliquer par des flux géniques suivant les rivières ou les fleuves. Ainsi, la proximité entre la population RO/C et le groupe 2 est liée au rio Abuna, affluent du rio Madeira, et celle du groupe 4 et du groupe 6, au rio Tapajós.

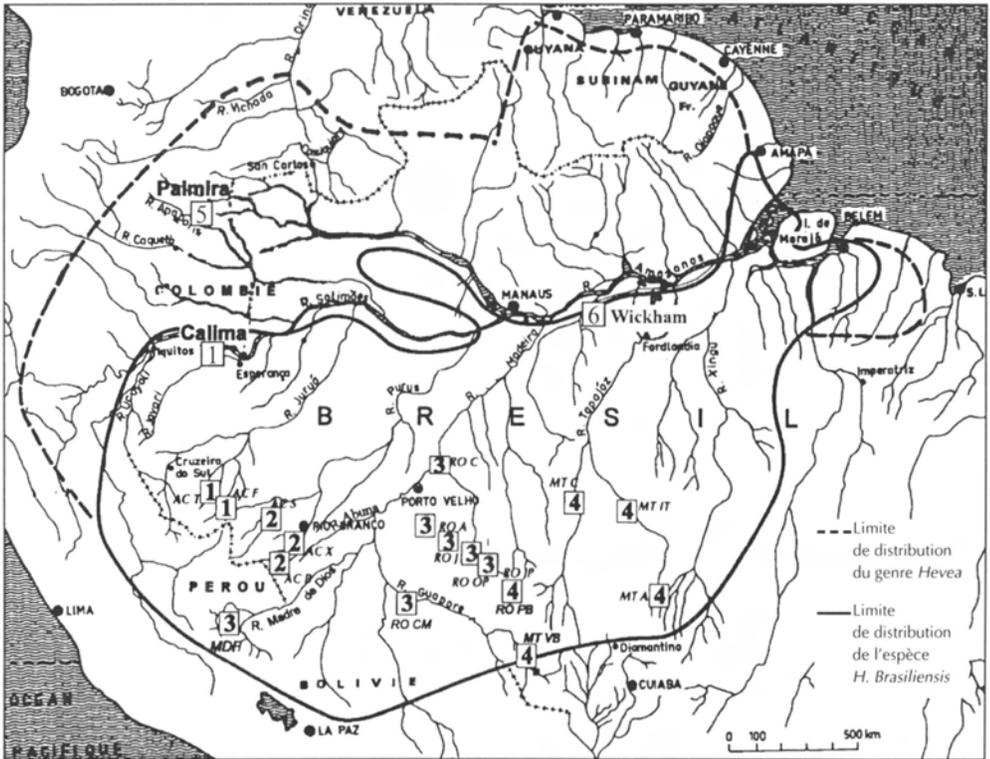


Figure 4. Correspondance entre origine géographique et similarité génétique chez *Hevea brasiliensis*. Les numéros 1 à 6 correspondent aux groupes génétiques identifiés par les marqueurs moléculaires. Le lieu exact de collecte n'est pas connu pour les clones prospectés par E. Schultes en Colombie (collections de Calima et de Palmira).

Cette situation justifierait que l'on désigne les groupes génétiques de l'hévéa par le nom du fleuve correspondant. Mais, pour simplifier la présentation, nous désignerons les groupes par leurs numéros de 1 à 6. Le district RO/PB fait un peu exception : localisé sur un affluent du rio Madeira, il se rattache au groupe 4, du rio Tapajós, et non au groupe 3 (figures 2 et 3). La zone prospectée dans ce district est en fait proche de la limite entre les deux bassins fluviaux (figure 4) et l'on peut admettre qu'une dissémination importante se fasse via le bassin du rio Tapajós. La diversité des clones cultivés Wickham est réduite comparée à celle des ressources génétiques amazoniennes, notamment du point de vue cytoplasmique. La diversité nucléaire du groupe Wickham apparaît néanmoins plus forte que ne le laissait prévoir l'histoire de la domestication de l'hévéa en Asie.

Ces conclusions découlent de l'ensemble des études de diversité par marqueurs, ce qui ne veut pas dire que tous les types de marqueur ont donné exactement les mêmes résultats, chaque étude apportant en réalité des informations spécifiques. Plusieurs facteurs permettent d'expliquer les différences observées avec les différents types de marqueur.

Il n'est pas surprenant que des marqueurs génétiques de nature différente apportent des informations différentes, qui ne sont pas pour autant contradictoires. Ainsi, les marqueurs cytoplasmiques, du fait de leur hérédité uniparentale (REBOUD et ZEYL, 1994 ; MOGENSEN, 1996), permettent de mieux révéler des flux migratoires dont la trace disparaît rapidement au niveau nucléaire à la suite de la recombinaison génétique entre populations indigènes et immigrantes (PALMER, 1987 ; CROZIER, 1990). Pour l'hévéa, par exemple, c'est le cas de la similarité entre le district RO/C et le groupe génétique 2 révélée spécifiquement par les marqueurs chloroplastiques. Il existe donc des flux géniques, probablement liés à la flottaison des graines suivant le cours du rio Apuna, depuis les districts AC/X et AC/S du groupe 2 jusqu'au nord du Rondônia, mais ces migrations seraient peu intenses et la divergence génétique entre les deux groupes s'est maintenue.

La vitesse d'évolution varie beaucoup selon le génome ou le type de séquence considérés (WOLFE *et al.*, 1987 ; PALMER et HERBON, 1988). Avec une évolution très lente, il est peu probable qu'apparaisse une mutation associée à une différenciation récente en sous-populations. Inversement, une évolution moléculaire très rapide conduit au phénomène d'homoplasie, ou de convergence évolutive : un même caractère, une même forme d'un marqueur, a une probabilité élevée d'apparaître indépendamment dans plusieurs populations isolées et n'est donc pas caractéristique d'une population. Cela dépend donc aussi du temps de divergence impliqué dans la différenciation des unités étudiées, populations ou espèces. Pour l'hévéa, ce phénomène pourrait expliquer l'organisation complexe des types mitochondriaux entre les groupes 3 et 4, pourtant bien différenciés sur le plan nucléaire. Cependant, cette situation peut aussi traduire l'existence de flux migratoires, faibles mais divers, entre ces deux groupes et il n'est pas possible de conclure. La vitesse d'évolution trop rapide expliquerait également pourquoi aucune structuration n'a été observée au sein de la collection de l'IRRDB dans une étude portant sur les variations de longueur du gène codant pour les ARN ribosomiques (BESSE, 1993 ; BESSE *et al.*, 1993).

Enfin, et c'est sans doute un facteur déterminant dans nombre d'études de diversité moléculaire, la qualité des résultats dépend du niveau d'échantillonnage de la diversité. Les différences de résultats obtenus avec les isoenzymes ou les RFLP chez l'hévéa ne proviennent pas d'une différence de nature. On peut considérer que les deux types de marqueurs sont neutres à l'égard de la sélection, qu'ils correspondent au même type de séquence nucléaire et qu'ils ont une vitesse d'évolution similaire en moyenne. En revanche, ces différences peuvent s'expliquer par le mode d'échantillonnage des populations — le nombre et la représentativité des génotypes étudiés —, ou du génome, c'est-à-dire le nombre de locus étudiés et leur répartition sur l'ensemble du génome. Le fait que les groupes 1 et 2 ne se distinguent pas dans l'étude par les RFLP, est probablement dû à un effectif trop faible des génotypes originaires de l'Acre, comme le suggère l'ACP sur les isoenzymes

réalisée sur le même échantillon (figure 5). Parallèlement, l'absence de divergence entre les groupes 2 et 3 avec les isoenzymes viendrait de ce que l'on n'a pas détecté de locus ou d'allèle marqueur de cette différenciation, les marqueurs isoenzymatiques obtenus chez l'hévéa, peu nombreux, ne couvrant pas suffisamment l'ensemble du génome.

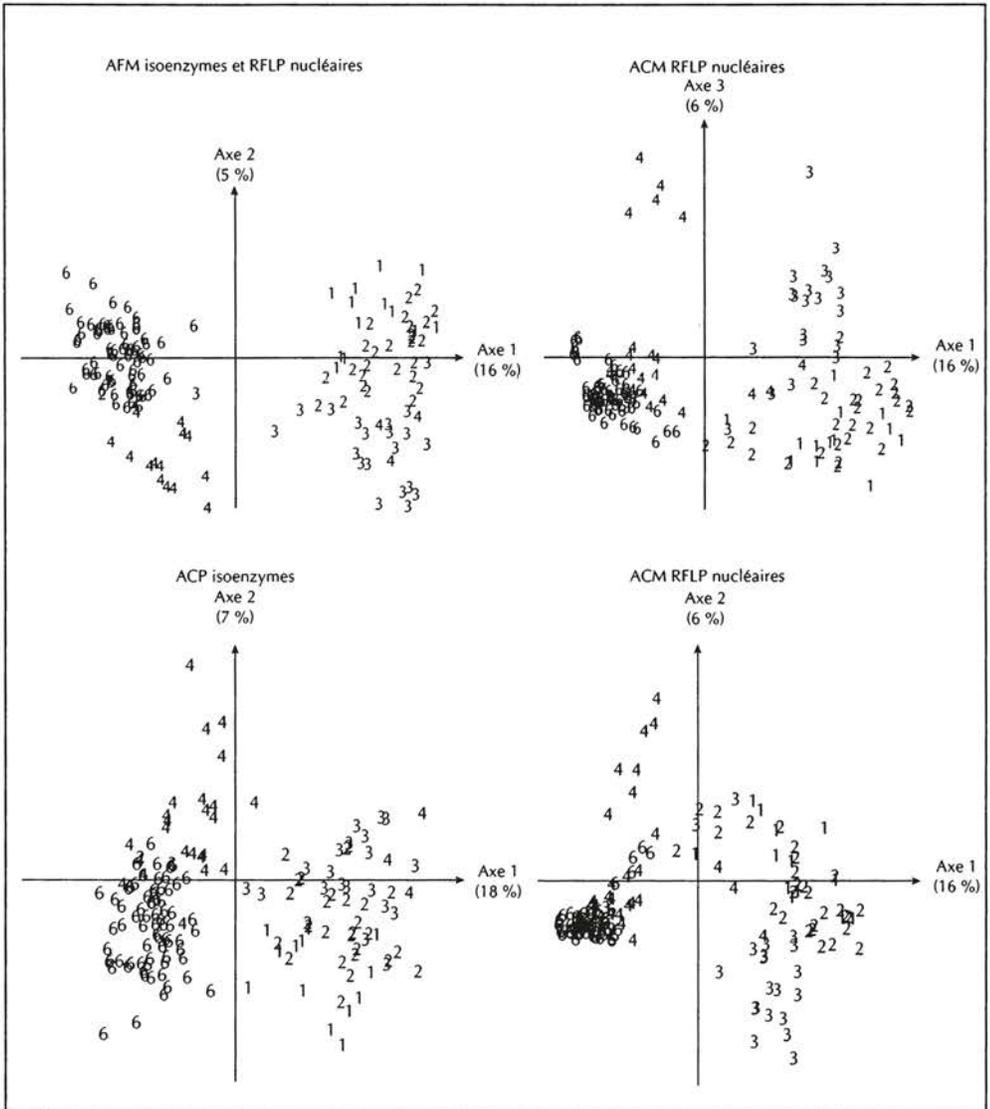


Figure 5. Comparaison par AFM de la diversité révélée par les isoenzymes et par les RFLP nucléaires. Analyse de 72 clones Wickham et de 89 clones amazoniens de la collection de l'IRRDB. Représentation graphique des premiers axes de l'AFM et des analyses partielles (ACP isoenzymes et ACM RFLP). Les numéros 1 à 6 correspondent aux groupes génétiques identifiés par les marqueurs moléculaires.

La diversité moléculaire et la variabilité morphoagronomique : comparaison par analyse factorielle multiple

L'analyse factorielle multiple (AFM) a été élaborée pour analyser simultanément et comparer des variables, qualitatives ou quantitatives, organisées en groupes de même nature. Cette méthode est donc bien adaptée à l'analyse simultanée de données moléculaires, qualitatives, de différents types (isoenzymes, RFLP...) ou de données agronomiques, quantitatives. Le principe de l'AFM est présenté dans cet ouvrage (PERRIER *et al.*, 1999) et plus en détail dans ESCOPIER et PAGES (1988).

LA COMPARAISON ENTRE ISOENZYMES ET RFLP NUCLÉAIRES

Nous avons mis en œuvre l'AFM, en premier lieu, pour obtenir une mesure de la relation entre les différents marqueurs moléculaires utilisés chez l'hévéa. Une première analyse par AFM a ainsi porté sur 161 génotypes (89 clones brésiliens de la collection de l'IRRDB et 72 clones Wickham) caractérisés par deux groupes de variables moléculaires : les isoenzymes (44 allèles pour 11 locus) et les RFLP nucléaires (113 bandes pour 25 sondes génomiques).

Les résultats de l'AFM sont donnés dans le tableau 3 et la figure 5. Les valeurs de corrélation correspondent aux corrélations entre les coordonnées des points (génotypes d'hévéa) sur les axes des analyses factorielles. Le nombre d'axes à prendre en compte dépend en partie de leur valeur propre. Pour l'AFM, une valeur propre du premier axe supérieure à 1 indique que plus d'un groupe de variables y contribuent ou, en d'autres termes, qu'il existe un axe d'inertie commun aux groupes de variables (ESCOPIER et PAGES, 1988). En revanche, pour les axes suivants de l'AFM, la valeur propre n'est pas un critère suffisant et le choix de retenir un axe ou non dépend, comme pour toute ACP, de l'interprétation biologique que l'on peut apporter (ESCOPIER et PAGES, 1988). La qualité de la représentation et la contribution d'un axe partiel à un axe de l'AFM sont également des paramètres à prendre en compte comme pour l'interprétation d'une ACP classique.

Les deux premiers axes de l'AFM témoignent de la forte similitude entre les structurations révélées par les deux types de marqueurs, alors que ce sont essentiellement les RFLP qui contribuent au troisième axe de l'AFM (tableau 3). Le premier axe de l'AFM correspond à l'opposition entre les groupes 4 et 6 (rio Tapajós), d'un côté, et les groupes 1, 2 et 3, de l'autre. Cette opposition apparaît très nettement sur le premier axe des deux analyses partielles (figure 5). Le deuxième axe de l'AFM oppose les groupes 3 et 4 aux groupes 1, 2 et 6. Cette opposition se manifeste au second rang pour les isoenzymes et au troisième pour les RFLP (tableau 3b ; figure 5). Elle est moins marquée avec les RFLP comme en témoignent les valeurs de corrélation, de qualité de la représentation et de contribution (tableau 3b). Bien qu'il ait une

Tableau 3. AFM sur les isoenzymes et les RFLP nucléaires pour 161 clones d'hévéa. a : valeurs propres et part d'inertie des premiers axes des analyses factorielles ; b : corrélation, qualité de la représentation et contribution des axes des analyses partielles (ACP et ACM) aux deux premiers axes de l'AFM.

a

Analyse factorielle	Facteurs (n° axe)	Valeur propre	Inertie (%)
AFM	1	1,9	16
	2	0,6	5
	3	0,5	4
ACP isoenzymes	1	8,1	18
	2	3,2	7
	3	2,5	6
ACM RFLP	1	20	16
	2	7,4	6
	3	7,2	6

b

Analyse factorielle	Facteurs (n° axe)	Axe 1 de l'AFM			Axe 2 de l'AFM			Axe 3 de l'AFM		
		corrélation	qualité	contribution	corrélation	qualité	contribution	corrélation	qualité	contribution
ACP isoenzymes	1	0,97	0,94	0,50	0,05	0	0	0,08	0	0,01
	2	0,04	0	0	0,87	0,75	0,53	0,08	0	0
	3	0,03	0	0	0,14	0,02	0	0,58	0,34	0,22
ACM RFLP	1	0,97	0,93	0,50	0,04	0	0	0,09	0	0,02
	2	0,01	0	0	0,17	0,03	0,02	0,80	0,64	0,49
	3	0	0	0	0,73	0,53	0,34	0,07	0	0

valeur propre inférieure à 1, ce deuxième axe de l'AFM, qui correspond à un axe d'inertie commun aux deux types de marqueurs, est à retenir. Le troisième axe de l'AFM correspond à l'opposition entre le groupe 3 et le groupe 4. Cette opposition est clairement mise en évidence par les RFLP (deuxième axe de l'analyse des correspondances multiples, ACM), mais n'apparaît pas nettement sur le troisième axe de l'ACP des isoenzymes, qui présente une corrélation et une contribution plus faibles (tableau 3b).

Ces éléments de structuration se retrouvent sur le premier plan des analyses partielles — ACP isoenzyme et ACM RFLP séparées — mais de façon moins marquée. De plus, l'AFM montre que la corrélation entre les deux types de marqueur est très forte pour la part la plus significative et la plus structurée de leur variabilité.

LA COMPARAISON ENTRE ISOENZYMES ET CARACTÈRES MORPHOAGRONOMIQUES

L'application de l'AFM a ensuite été étendue à la comparaison entre diversité moléculaire et variabilité phénotypique. L'analyse a porté sur 171 génotypes amazoniens de la collection de l'IRRDB pour 51 allèles isoenzymatiques (13 locus) et 26 variables morphoagronomiques (production, croissance, architecture), sans données manquantes.

Les résultats de l'AFM sont donnés dans le tableau 4 et la figure 6. Le premier axe de l'AFM a une valeur propre de 1,2 — supérieure à 1 mais peu élevée —,

Tableau 4. AFM sur les données isoenzymatiques et morphoagronomiques pour 171 clones d'hévéa. a : valeurs propres et part d'inertie des premiers axes des analyses factorielles ; b : corrélation, qualité de la représentation et contribution des axes des analyses partielles (ACP) au premier axe de l'AFM.

a				
Analyse factorielle	Facteurs (n° axe)	Valeur propre	Inertie (%)	
AFM	1	1,2	10,5	
	2	0,9	8,3	
ACP isoenzymes	1	5,6	11	
	2	3,9	7,6	
ACP morphoagronomique	1	12,7	49	
	2	2,2	8,5	

b				
Analyse factorielle	Facteurs (n° axe)	Fonction corrélation	Axe 1 de l'AFM	
			qualité	contribution
ACP isoenzymes	1	0,67	0,45	0,56
	2	0	0,01	0,01
ACP morphoagronomique	1	0,81	0,67	0,57
	2	0,03	0,00	0

ce qui signifie que la corrélation entre les deux groupes de variables est faible. Elle n'est cependant pas nulle en raison du caractère particulier des génotypes du groupe 4, très nettement différenciés par les isoenzymes (axe 1 de la figure 6) et dont les valeurs de production ont tendance à être supérieures à la moyenne. Le second axe de l'AFM ne doit pas être pris en compte dans cette analyse car il ne permet pas de dégager une interprétation claire de la relation entre les deux groupes de variables.

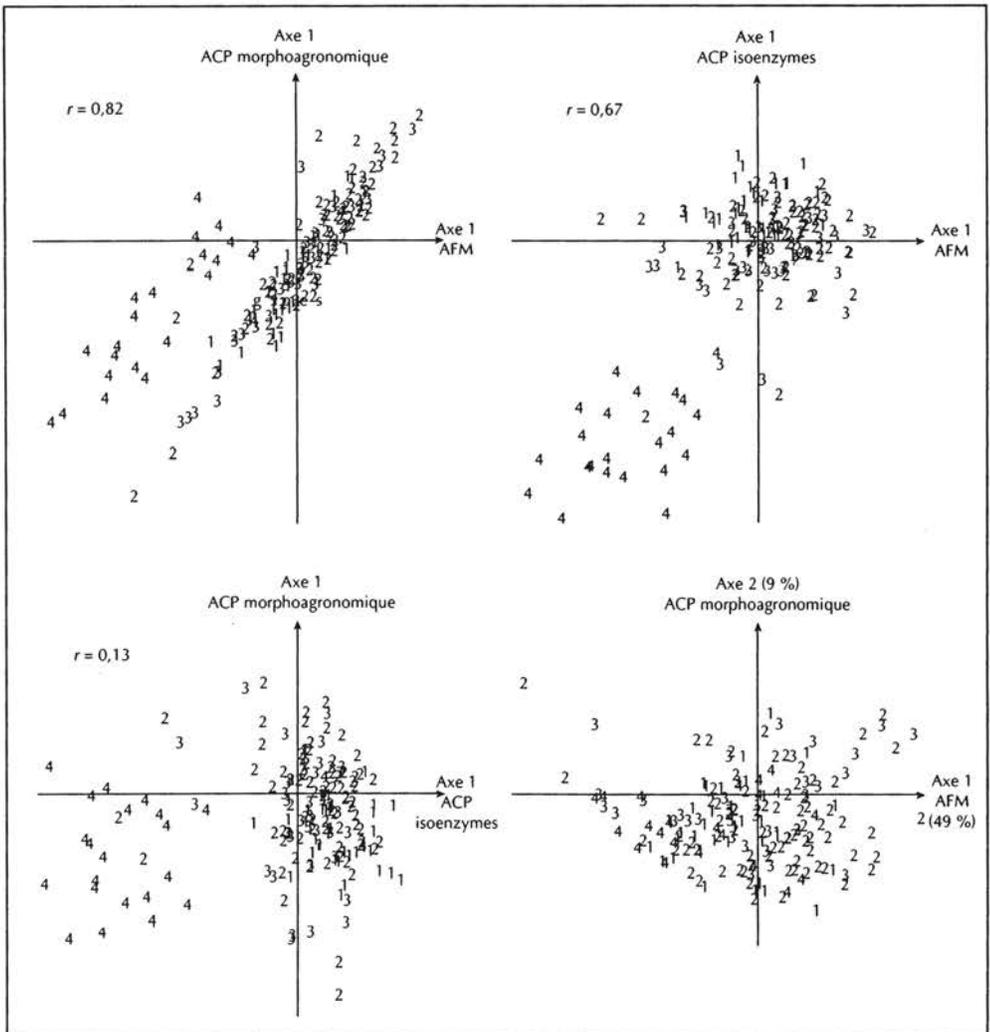


Figure 6. Comparaison par AFM de la diversité des isoenzymes et de la variabilité morphoagronomique chez 183 clones amazoniens de la collection de l'IRRDB. Représentation graphique des premiers axes de l'AFM et des analyses partielles (ACP). Les numéros 1 à 6 correspondent aux groupes génétiques identifiés par les marqueurs moléculaires.

Les résultats de l'AFM suggèrent donc qu'il existe une relation entre la diversité des marqueurs neutres et la variabilité phénotypique chez l'hévéa. Cette relation peut paraître en contradiction avec la faible valeur de corrélation entre les premiers axes des deux analyses partielles (figure 6). Compte tenu de l'effectif, cette corrélation de 0,13 est en fait significative à 10 %. Ainsi l'AFM fait apparaître une relation difficile à identifier sur les analyses séparées. Les données morphoagronomiques sont peu précises car il s'agit de mesures monoarbre, sans répétitions. C'est pourquoi, une différenciation n'apparaît avec ces données que lorsque l'on travaille sur de grands effectifs et en valeurs moyennes, à l'échelle de la population (figure 1). La relation entre diversité moléculaire et variabilité phénotypique apparaîtrait sans doute plus forte si l'on disposait d'une meilleure évaluation des caractères morphoagronomiques. Un examen attentif de l'ACP morphoagronomique (figure 6) montre que les clones du groupe 4 sont, parmi des génotypes d'autres groupes, plutôt situés d'un même côté du premier axe ; cette répartition ne peut être retenue comme significative d'après cette seule analyse partielle.

Conclusion et perspectives

L'analyse fine de la diversité génétique de l'hévéa avec différents outils, tant moléculaires que phénotypiques, a conduit à une bonne connaissance de l'organisation génétique de cette espèce. L'apport des marqueurs moléculaires a été déterminant. Les résultats obtenus indépendamment par différentes techniques convergent vers une image claire de la structuration génétique, qui peut être considérée comme quasiment définitive, au moins pour les populations du Brésil les plus étudiées.

Une forte corrélation a été trouvée entre les différents outils moléculaires. Pour les populations amazoniennes, la relation établie entre diversité nucléaire et diversité mitochondriale est particulièrement intéressante. Elle prouve que la différenciation entre les populations, si elle n'est pas très forte, est bien réelle et que des flux géniques entre les populations existent mais restent peu intenses. Le bassin amazonien ne présente pas de barrière géographique à la migration, mais l'immensité de la zone considérée et la dispersion limitée des graines conduisent à un maintien de la structuration génétique héritée de la fragmentation de la forêt au pléistocène selon le modèle des refuges forestiers (HAFFER, 1982 ; PRANCE, 1987).

Les relations de similarité génétique entre populations d'hévéa, révélées par les marqueurs cytoplasmiques et nucléaires, montrent que les flux de gènes sont déterminés principalement par le réseau hydrographique. La dispersion des graines d'hévéa se ferait suivant les cours d'eau, soit sous l'action de l'homme (SEIBERT, 1948), soit par flottaison naturelle des graines comme cela se produit pour d'autres espèces amazoniennes d'arbre (GOULDING, 1993). Une même

structuration de la diversité, en fonction du réseau hydrographique, a d'ailleurs été trouvée chez une autre espèce pérenne amazonienne : le palmier à huile américain *Elaeis oleifera* (BARCELOS, 1998).

Les différents types de marqueurs moléculaires ont donné des résultats dans l'ensemble concordants, ce que confirme l'AFM, mais chacun apporte des informations spécifiques. L'hérédité maternelle des marqueurs cytoplasmiques permet de mieux apprécier les flux géniques entre populations — entre le groupe 2 et le district RO/C, par exemple — ou les effets de fondation, comme pour la populations Wickham, quasiment monomorphe sur le plan mitochondrial.

Certaines différenciations entre groupes n'ont été clairement révélées que par les isoenzymes ou les RFLP. Sur le plan nucléaire, cela est imputable à des différences dans le niveau d'échantillonnage des populations (nombre de génotypes analysés) ou du génome (nombre de marqueurs utilisés). Il serait donc utile de caractériser la diversité des ressources génétiques de l'hévéa en utilisant des marqueurs cartographiés et distribués sur l'ensemble du génome. Le développement des marqueurs microsatellites (LESPINASSE, 1993 ; SEGUIN *et al.*, 1997) permet d'envisager une telle étude sur un échantillon suffisant de génotypes. L'intégration de tous les marqueurs sur une carte synthétique est en cours (LESPINASSE *et al.*, 1999)

Il est intéressant de noter l'existence d'une relation entre diversité moléculaire et variabilité agronomique chez l'hévéa. La corrélation est cependant beaucoup plus faible qu'entre les différents marqueurs moléculaires eux-mêmes et l'AFM s'est avérée utile pour la faire apparaître sur un sous-échantillon de génotypes. Il serait nécessaire de poursuivre l'étude de la relation entre les deux niveaux de variabilité — génétique et phénotypique — sur des données phénotypiques plus précises, recueillies sur un large échantillon de génotypes. Il serait également intéressant d'appliquer l'AFM en utilisant l'analyse factorielle sur tableau de distances (AFTD), ce qui permettrait de mieux raisonner le choix des indices de distance, les distances du χ^2 (en AFC ou en ACM) et euclidienne (en ACP) n'étant pas forcément les plus adaptées.

Nos résultats indiquent que la différenciation des populations d'hévéa est assez forte pour toucher l'ensemble des génomes et concerne un grand nombre de gènes, qu'il s'agisse de marqueurs neutres ou de gènes déterminant des caractères phénotypiques. En conséquence, dans l'état actuel de nos connaissances, la prise en compte de la structuration d'*Hevea brasiliensis* en six groupes génétiques sera très utile pour définir une stratégie d'échantillonnage de la diversité génétique de cette espèce.

Annexe

Matériel végétal

Les génotypes retenus dans cette étude sont des clones d'hévéa de la collection internationale de l'IDEFOR (Institut des forêts), en Côte d'Ivoire. L'origine géographique des populations de clones est précisée dans le tableau 1. Tous ces clones ont été évalués au champ pour les caractères de production de latex, de croissance en épaisseur et d'architecture, mais dans des essais différents (CHAPUSET *et al.*, 1995). L'essai le plus important comprend 2 500 clones de la prospection de l'IRRDB de 1981, sans répétitions (1 arbre par clone). Les marqueurs moléculaires ont été appliqués à des échantillons de la collection, de taille et de recouvrement variables. Les effectifs utilisés dans ces différentes études sont résumés dans le tableau 2.

Méthodes de révélation de la diversité

Les protocoles utilisés pour l'étude de la diversité génétique et agronomique sont décrits par CHAPUSET *et al.* (1995) pour l'évaluation morphoagronomique sur 26 variables, par LEBRUN et CHEVALLIER (1990) pour les isoenzymes, par BESSE (1993) et BESSE *et al.* (1994) pour les RFLP nucléaires avec 25 sondes génomiques et par LUO *et al.* (1995) pour les RFLP cytoplasmiques, ADNmt et ADNcp.

La technique des isoenzymes utilise 12 systèmes enzymatiques, qui permettent de révéler jusqu'à 14 locus polymorphes dans l'espèce *H. brasiliensis* (CHEVALLIER, 1988 ; CHEVALLIER *et al.*, 1988 ; SEGUIN *et al.*, 1995a ; 1995b). Plusieurs centaines de génotypes ont été caractérisés par les isoenzymes (tableau 2) à l'aide de ces 12 systèmes, mais avec un nombre variable de données manquantes selon les génotypes ou les séries de manipulations. C'est pourquoi l'analyse des données n'a porté que sur 8 à 13 locus isoenzymatiques selon le dispositif. Pour avoir un effectif de génotypes suffisant, il a souvent été nécessaire de réduire le nombre de locus pour limiter ou éliminer les données manquantes.

Pour les RFLP nucléaires, 25 sondes homologues correspondant à des séquences uniques ou peu répétées dans le génome de l'hévéa (banque génomique *Pst*I) ont été utilisées. Ces sondes ont été couplées à deux enzymes de restriction, *Eco*RI et *Sst*I (BESSE *et al.*, 1994 ; SEGUIN *et al.*, 1995a). Pour les RFLP cytoplasmiques, les sondes proviennent de banques de féverole (LUO *et al.*, 1995).

Analyse de données

Le traitement des données a été réalisé principalement par l'analyse factorielle, dont l'intérêt est discuté dans cet ouvrage (PERRIER *et al.*, 1999). De plus, l'interprétation des résultats est plus facile avec une analyse factorielle qu'avec les méthodes arborées lorsque l'on travaille sur un grand nombre d'individus.

Les données agronomiques, quantitatives, ont été traitées par ACP. Les données de présence/absence de bandes RFLP ont été traitées par AFC sur tableau disjonctif complet, ce qui revient à une analyse des correspondances multiples (ACM). Les données d'allèles isoenzymatiques ont été codées, 0 pour l'absence, 1 pour la présence à l'état hétérozygote et 2 pour la présence à l'état homozygote, pour chaque génotype. Ces données ont été traitées par AFC ou par ACP dans l'AFM (PERRIER *et al.*, 1999). Pour les

AFC, n'ont été retenus comme variables actives que les bandes ou les allèles de fréquence comprise entre 2 et 98 %, dans l'échantillon total. En AFM, tous les allèles ont été retenus quelle que soit leur fréquence.

L'analyse de la diversité a également été menée à l'échelle de la population, par analyse en classification ascendante hiérarchique (CAH) en utilisant, pour les isoenzymes, la distance de Nei (1978) sur les fréquences alléliques et, pour les données agronomiques, quantitatives, la distance de Manhattan sur les moyennes par population. Les arbres ont été construits par la méthode UPGMA. L'étude de l'organisation du matériel génétique en sous-populations a été complétée par les calculs de F statistiques, qui permettent d'évaluer l'écart à la panmixie et de quantifier le rapport des diversités intra et interpopulations.

Références bibliographiques

- BALDWIN J.J.T., 1947. Hevea: a first interpretation. *Journal of Heredity*, 38 : 54-64.
- BARCELOS E., 1998. Etude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* Cortès et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). Thèse de doctorat, ENSAM, Montpellier, France, 138 p.
- BENNETT M.D., LEITCH I.J., 1997. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: 583 new estimates. *Annals of Botany*, 80 : 169-196.
- BESSE P., 1993. Identification des clones cultivés et analyse de la diversité génétique chez *Hevea brasiliensis* par RFLP. Thèse de doctorat, université Paris XI, Orsay, France, 114 p.
- BESSE P., SEGUIN M., LEBRUN P., CHEVALLIER M.H., NICOLAS D., LANAUD C., 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 : 199-207.
- BESSE P., SEGUIN M., LEBRUN P., LANAUD C., 1993. Ribosomal DNA variations in wild and cultivated rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Genome*, 36 : 1049-1057.
- BOUHARMONT J., 1960. Recherches taxonomiques et caryologiques chez quelques espèces du genre *Hevea*. Congo, INEAC, 64 p.
- CHAPUSET T., LEGNATE H., DOUMBIA A., CLEMENT-DEMANGE A., NICOLAS D., KELI J., 1995. Agronomical characterisation of the 1981 germplasm in Côte d'Ivoire: growth, production, architecture and leaf disease sensibility. *In* : IRRDB symposium on physiological and molecular aspects of the breeding of *Hevea brasiliensis*. Brickendonbury, Royaume-Uni, IRRDB, p. 112-122.
- CHEVALLIER M.H., 1988. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isoenzymes markers. *Journal of Natural Rubber Research*, 3 : 42-53.
- CHEVALLIER M.H., LEBRUN P., NORMAND F., 1988. Approach of the genetic variability of germplasm using enzymatic markers. *In* : Colloque exploitation, physiologie et amélioration de l'hévéa, J.L. Jacob et J.C. Prévôts éd., Montpellier, France, Cirad-Irca, p. 365-376.
- CLEMENT-DEMANGE A., SEGUIN M., LESPINASSE D., LEGNATE H., CHAPUSET T., NICOLAS D., 1997. Germplasm, genetic improvement and marker assisted selection of the rubber tree. *In* : Seminar-workshop on the biochemical and molecular tools for exploitation diagnostic and rubber tree improvement. Cirad-Orstom-University of Mahidol (sous presse).
- CROZIER R., 1990. From population genetics to phylogeny uses and limits of mitochondrial DNA. *Australian Systematic Botany*, 3 : 111-124.
- ESCOFIER B., PAGES J., 1988. Analyses factorielles simples et multiples. Paris, France, Dunod, 241 p.
- FREGENE M., ANGEL F., GOMEZ R., RODRIGUEZ F., CHAVARRIAGA P., ROCA W., TOHME J., BONIERBALE M., 1997. A molecular map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*, 95 : 431-441.

- GONÇALVES P.S., 1981. Expedição internacional à Amazônia no Território Federal de Rondônia para coleta de material botânico de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Manaus, Brésil, EMBRAPA-CNSPD, 60 p.
- GONÇALVES P.S., DE PAIVA J.R., DE SOUZA R.A., 1983. Retrospectiva e actualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea* spp.) no Brasil e em países asiáticos. Manaus, Brésil, EMBRAPA-CNSPD, Documentos nº 2, 69 p.
- GOULDING M., 1993. Les forêts inondables d'Amazonie. Pour la science, 187 : 70-77.
- HAFFER J., 1982. General aspects of the refuge theory. In : Biological diversification in the tropics, G.T. Prance éd., New York, Etats-Unis, Columbia University Press, p. 6-26.
- HAMON S., DUSSERT J., DEU M., HAMON P., SEGUIN M., GLASZMANN J.C., GRIVET L., CHANTEREAU J., CHEVALLIER M.H., FLORI A., LASHERMES P., LEGNATE H., NOIROT M., 1998. Effects of quantitative and qualitative principal component score strategies on the structure of coffee, rice, rubber tree and sorghum core collections. Genetics, Selection, Evolution, 30 (suppl. 1) : 237-258.
- LEBRUN P., CHEVALLIER M.H., 1990. Starch and polyacrylamide gel electrophoresis of *Hevea brasiliensis*, a laboratory manual. Montpellier, France, Cirad-Irca, 55 p.
- LECONTE A., LEBRUN P., NICOLAS D., SEGUIN M., 1994. Electrophoresis: application to *Hevea* clone identification. Plantations, recherche, développement, 1 : 28-36.
- LESPINASSE D., 1993. Recherche de marqueurs en vue d'une cartographie génétique chez *Hevea brasiliensis*. Mémoire de DEA, ENGREF, Paris, France, 66 p.
- LESPINASSE D., RODIER-GOUD M., GRIVET L., LECONTE A., LEGNATE H., SEGUIN M., 1999. A saturated genetic linkage map of rubber-tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, micro-satellite, and isozyme markers. Theoretical and Applied Genetics (sous presse).
- LINS A.C.R., SILVA G.P., NICOLAS D., ONG S.H., MELO C.C., SANTOS M.R., 1981. Report of the Acre team in the 1981 joint IRRDB-Brazil *Hevea* germoplasm expedition. Manaus, Brésil, EMBRAPA-CNSPD, 24 p.
- LOW F.C., BONNER J., 1985. Characterisation of the nuclear genome of *Hevea brasiliensis*. In : International rubber conference 1985. Kuala Lumpur, Malaisie, IRRDB, p. 127-136.
- LUO H., BOUTRY M., 1995. Phylogenetic relationships within *Hevea brasiliensis* as deduced from a polymorphic mitochondrial DNA region. Theoretical and Applied Genetics, 91 : 876-884.
- LUO H., VAN COPPENOLLE B., SEGUIN M., BOUTRY M., 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and phylogenetic relationships in *Hevea brasiliensis*. Molecular Breeding, 1 : 51-63.
- MOGENSEN H.L., 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. American Journal of Botany, 83 : 383-404.
- NEI M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89 : 583-590.
- NICOLAS D., 1985. Acquisition of *Hevea* material derived from Colombian Schultes collections. In : International rubber conference 1985. Kuala Lumpur, Malaisie, IRRDB.

NICOLAS D., CHEVALLIER M.H., CLEMENT-DEMANGE A., 1988. Contribution to the study and evaluation of new germplasm for use in *Hevea* genetic improvement. In : Colloque exploitation, physiologie et amélioration de l'hévéa, J.L. Jacob et J.C. Prévôts éd., Montpellier, France, Cirad-Irca, p. 335-352.

ONG S.H., 1985. Chromosome morphology at the pachytene stage in *Hevea brasiliensis*: a preliminary report. In : International rubber conference 1985. Kuala Lumpur, Malaisie, IRRDB, p. 3-12.

ONG S.H., 1987. Utilization of *Hevea* genetic resources in the RRIM. Malaysian Applied Biology, 16 : 145-155.

ONG S.H., OTHMAN R., BENONG M., 1995. Status report on the 1981 *Hevea* germplasm collection. In : IRRDB symposium on physiological and molecular aspects of the breeding of *Hevea brasiliensis*. Brickendonbury, Royaume-Uni, IRRDB, p. 95-105.

DE PAIVA J.R., 1981. I coleta de material sexuado a assexuado nos seringais nativos do Estado do Mato Grosso. Manaus, Brésil, EMBRAPA-CNSPD, 26 p.

PALMER J.D., 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. American Naturalist, 130 : S6-S29.

PALMER J.D., HERBON L.A., 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. Journal of Molecular Evolution, 28 : 87-97.

PERNES J., 1984. Gestion des ressources génétiques des plantes. Paris, France, ACCT, 212 p.

PERRIER X., FLORI A., BONNOT F., 1999. Les méthodes d'analyse des données. In : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées, P. HAMON *et al.* éd., Montpellier, France, Cirad, collection Repères, p. 43-76.

POLHAMUS L.G., 1962. Rubber: botany, production and utilization. Londres, Royaume-Uni, Leonard Hill, 449 p.

PRANCE G.T., 1987. Biogeography of neotropical plants. In : Biogeography and Quaternary history in tropical America, I.C. Whitmore et G.T. Prance éd., Oxford, Royaume-Uni, Clarendon Press, p. 46-65.

REBOUD X., ZEYL C., 1994. Organelle inheritance in plants. Heredity, 72 : 132-140.

RIVANO F., 1992. La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa : étude en conditions naturelles et contrôlées des composantes de la résistance partielle à *Microcyclus ulei*. Thèse de doctorat, université Paris XI, Orsay, France, 260 p.

SCHULTES R.E., 1977. Wild *Hevea*: an untapped source of germplasm. Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka, 54 : 227-257.

SCHULTES R.E., 1990. A brief taxonomic view of the genus *Hevea*. Kuala Lumpur, Malaisie, MRRDB, 57 p.

SEGUIN M., BESSE P., LEBRUN P., CHEVALLIER M.H., 1995a. *Hevea* germplasm characterization using isozymes and RFLP markers. In : Population genetics and genetic conservation of forest trees, P. Baradat *et al.* éd., Amsterdam, Pays-Bas, SPB Academic Publishing, p. 129-134.

SEGUIN M., BESSE P., LESPINASSE D., LEBRUN P., RODIER-GOUD M., NICOLAS D., 1995b. Characterization of genetic diversity and *Hevea* genome mapping by biochemical and molecular markers. In : IRRDB symposium on physiological and molecular aspects of the breeding of *Hevea brasiliensis*. Brickendonbury, Royaume-Uni, IRRDB, p. 19-30.

SEGUIN M., BESSE P., LESPINASSE D., LEBRUN P., RODIER-GOUD M., NICOLAS D., 1996. *Hevea* molecular genetics. Plantations, recherche, développement, 3 : 77-88.

SEGUIN M., LESPINASSE D., RODIER-GOUD M., LEGNATE H., TROISPOUX V., PINARD F., CLEMENT-DEMANGE A., 1998. Genome mapping in connection with resistance to the South American leaf blight in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). In : IIIrd ASAP conference on agricultural biotechnology. Bangkok, Thaïlande, Biotech, volume 1.

SEGUIN M., RODIER-GOUD M., LESPINASSE D., 1997. Mapping SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) facilitated and enhanced by heteroduplex formation and template mixing. In : Plant and animal genome V, D. Bigwood *et al.* éd., Washington, Etats-Unis, USDA, poster n° 61, p. 66.

SEIBERT R.J., 1948. The use of *Hevea* for food in relation to its domestication. Annals of the Missouri Botanical Garden, 35 : 117-121.

SERIER J.B., 1993. Histoire du caoutchouc. Paris, France, Desjonquières, 273 p.

WOLFE K.H., LI W.H., SHARP P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84 : 9054-9058.