CIRAD-CP
Programme Hévéa

Rapport de mission en INDE
Du 19 au 27 mai 2003

Visite de l'Institut de recherche sur le caoutchouc
Etat du Kérala, Inde

Pascal Montoro, CIRAD-CP

CP_SIC 1618

Remerciements

Je tiens à remercier les agents du RRII pour l'excellent accueil qu'ils nous ont fait lors de cette visite. En particulier, le Dr Desalphine et le Dr Mathew respectivement Chairman du Rubber Board et directeur du RRII pour leur disponibilité et les discussions générales sur l'hévéaculture en Inde ; le Dr Thulaseedharan, responsable de la Division de Biotechnologie et correspondant du groupe Biotechnologie de l'Irrdb, qui a organisé ce séjour et la visite des différentes Division du RRII ; ainsi que les membres de son équipe : Mrs P. Kumari Jayasree, Dr Sushama, Dr P. Venkatachalam. Merci aussi au directeur adjoint de la station expérimentale, M. Jacob, pour sa disponibilité. Enfin, je remercie les différents responsables des Divisions avec qui j'ai pu interagir : Dr James Jacob, Dr Molly Thomas, Dr R. Krishnakumar, M. G.M. Joseph, Dr Baby Kuriakose, Dr Annakatty Joseph, Dr Shaj Philip, Dr Tharian George, Mrs Dr Y. Annamma Varghese, Dr T. Saha.

26 mai 2003

9h00	Visite du champ de boutures RRII105, PB 311, RRII208, RRIM 600
10h30	Exposé de Pascal Montoro
12h00	Exposé de Josiane Julien
12h30	Déjeuner avec les chercheurs de la Division de Biotechnologie
14h00	Discussion avec le Dr Thulaseedharan
15h00	Discussion avec M. Thanseen Ismail
16h00	Départ pour Kochi

27 mai 2003

Matin	Visite de Kochin
15h30	Vol Kochin – Mumbai

28 mai 2003

01h40	Vol Mumbai – Paris
11h00	Vol Paris - Montpellier

SOMMAIRE

		Pages
1.	Objectifs de la visite	1
2.	Présentation du RRII	1
3.	Division de biotechnologie	2
3.1.	Micropropagation	4
3.1.1.	Embryogenèse somatique	4
3.1.2.	Hybridation somatique	4
3.2.	Transformation génétique de l'hévéa	5
3.3.	Biologie moléculaire	5
4.	Visite des autres divisions du RRII	6
4.1.	Visite de la station expérimentale de Chethackal	6
4.2.	Visite de la division de Physiologie	6
4.2.1.	Discussion avec le Dr James Jacob	6
4.2.2.	Discussion avec le Dr Molly Thomas	6
4.2.3.	Discussion avec le Dr R. Krishnakumar	8
4.3.	Visite de la division de Botanie	8
4.4.	Visite de la division de Technologie	8
4.5.	Visite de la division Agronomie et sol	9
4.6.	Visite de la division Plant Physiology	9
4.6.1.	Présentation par le Dr Annakatty Joseph	9
4.6.2.	Présentation par le Dr Shaj Philip	9
4.7.	Visite de la division Economique	10
4.8.	Visite de la division Germplasm	10
4.9.	Visite de la division Genome Analysis	10
5.	Visite d'une Rubber Producer's Society, Pala, Kérala	10
6.	Conclusions générales et perspectives de collaborations	12
7.	Références	13

Résumé

Cette mission conjointe Cirad-Michelin au RRII (Rubber Research Institute of India) avait pour objectif d'évaluer le dispositif de recherche indien en matière de biotechnologie sur l'hévéa et de définir des thèmes potentiels de collaboration, en bilatéral, d'une part, et au plan international dans le cadre de l'IRRDB, d'autre part. Les recherches au RRII semblent d'une façon générale orientées vers la diminution des fréquences de saignée, la gestion du Tapping Panel Dryness (TPD), la tolérance aux stress abiotiques et la caractérisation du germplasm afin d'obtenir des clones adaptés au développement de l'hévéaculture dans le nord-est de l'Inde et de répondre à la pénurie latente de main d'œuvre.

La division de Biotechnologie a développé des procédés de micropropagation (bouturage *in vitro* et embryogenèse somatique) et de transformation génétique sur le clone RRII 105. Plus récemment, elle a initié des activités de biologie moléculaire en vue de produire du matériel végétal tolérant au TPD et au Phythophtora. De nouveaux projets sont en cours sur la biosynthèse du caoutchouc et la production de métabolites secondaires tel que l'inositol.

Depuis la mise en place en 1994 des essais d'évaluation des microboutures des clones RRII 105, PB 311, RRII 208 et RRIM 600, ce laboratoire a pu produire quelques dizaines de vitroplants issus d'embryogenèse somatique lesquels ont été plantés en 2000. Plus de 200 vitroplants auraient été produits en 2002. Toutefois, lors de la visite de la station expérimentale de Chethackal seulement une dizaine de vitroplants âgés de un an a pu être observé. La mise au point d'un procédé de transformation génétique se heurte à la difficulté de produire des plants normaux. Sur le plan des études moléculaires, les divisions de Biotechnologie et de Physiologie s'intéressent toutes deux à la régulation de l'éthylène et du stress oxydatif en liaison avec le développement du TPD.

Bien que nous ayons déterminé plusieurs thèmes potentiels de collaboration (évaluation et étude du fonctionnement des vitroplants, régulation de l'éthylène, imagerie cellulaire), aucun souhait de partenariat n'a été enregistré. Toutefois, les idées de préparer un projet Génomique et d'organiser une réunion commune bisannuelle pour les Groupes *Biotechnology*, *Physiology* et *Breeding* de l'IRRDB a été reçu avec intérêt étant donné la nécessité de développer des passerelles technologiques en faveur de la finalisation de ces recherches soit par la transgénèse ou le développement de marqueurs génétiques moléculaires à partir de gènes candidats.

1. Objectifs de la visite

Cette mission avait pour objectif initial de vérifier les informations recueillies au colloque IRRDB de 2001 sur la culture *in vitro* de l'hévéa au RRII (Rubber Research Institute of India), et d'obtenir des informations plus générales sur les programmes de recherche en micropropagation, transformation génétique et biologie moléculaire de l'hévéa au RRII afin d'avoir des éléments pour identifier des thèmes potentiels de collaborations bilatérales.

De plus, dans le cadre de ma fonction d'Officier de liaison pour les biotechnologies à l'IRRDB, j'ai pris l'opportunité de cette visite pour rencontrer mon correspondant au RRII, le Dr Thulaseedharan, afin de définir les projets de recherche sur lesquels le RRII souhaiterait collaborer sur un plan international dans le cadre de l'IRRDB.

Ainsi, lors de ce séjour j'ai tenté de rencontrer les acteurs et de visiter tous les laboratoires et essais en champ relatifs aux travaux en micropropagation par embryogenèse somatique (laboratoire, cellule d'acclimatation, pépinière et essais en champ) et en physiologie moléculaire sur le système laticifère et notamment les études sur le mécanisme d'action de l'éthylène au niveau de l'écorce.

2. Présentation du RRII (cf. Mathew, 2003)

Le RRII (Rubber Research Institute of India) dépend du Rubber Board lequel est sous la tutelle du Ministère du Commerce. Le Rubber Board est composé de six instituts (Development Rubber, Industry, Research, Training, Statistics et Marketing) dont le RRII qui est en charge de la partie recherche. Le RRII a été établi en 1955 et est constitué de huit divisions œuvrant dans 13 stations de recherche ou expérimentales. Le centre principal est localisé en périphérie de Kottayam en pleine zone de production traditionnelle de caoutchouc naturel.

Depuis les premières recommandations sur l'utilisation du clone RRII 105 en 1978, les chercheurs du RRII ont sélectionné 5 autres clones (série 400) hauts producteurs et à forte croissance qui sont en fin d'évaluation. Suite aux travaux sur les systèmes d'exploitation, la saignée remontante et un système de saignée à fréquence réduite (D6 au lieu de D3) sont en cours d'évaluation pour augmenter la production en caoutchouc naturel et pour palier le manque de main d'œuvre. En effet, 80% de la production proviennent de petites exploitations d'en moyenne 0,5 hectare appartenant à des investisseurs qui utilisent une main d'œuvre importante.

En 2002, la production indienne était de 640 300 tonnes pour une consommation de 679 000 tonnes. Le gouvernement indien avait la volonté que l'Inde soit autosuffisante en caoutchouc naturel, il souhaite favoriser le développement de l'hévéaculture dans les états du Nord-Est de l'Inde. Dans cette zone l'évaluation des clones a permis de classer le clone RRIM 600 comme tolérant à la sécheresse, le clone PB 235 tolérant aux faibles températures ; ces deux clones étant plus adaptés à ces conditions non traditionnelles que le clone RRII 105.

3. Division de biotechnologie

Cette division a été créée en 1986, et est dirigée par le Dr Thulaseedharan qui est de plus le correspondant indien pour le groupe biotechnologie de l'Irrdb. Cette division est composée de 7 chercheurs, 1 assistante, 1 technicienne et 3 étudiants en thèse de doctorat inscrits à l'université Mahatma Gandhi de Kottayam ou à l'université du Kérala (Figure 1A). Les activités de ce groupe concernent la mise au point de procédé de micropropagation et de transformation génétique, et la caractérisation de gènes d'intérêt (Tableau 1).

Tableau 1. Activités de la division de biotechnologie

Noms	Domaines d'activité	Sujets de recherche
Dr. A. Thulaseedharan	Molecular Biology Micropropagation Genetic transformation	Tissue specific promoters, Molecular mechanism of latex biosynthesis and disease and drought tolerance, Differential gene expression.
Mrs. Kumari Jayasree P.	Micropropagation	Embryogenèse somatique à partir d'anthère Transformation génétique
Dr. Sushamakumari S.	Micropropagation	Embryogenèse somatique à partir d'inflorescence immature Culture de protoplaste Transformation génétique
Dr. P. Venkatachalam	Molecular Biology	Caractérisation de marqueurs moléculaires du Tapping Panel Dryness Caractérisation de marqueurs moléculaires de la résistance au Phythophtora Caractérisation des gènes impliqués dans la biosynthèse de caoutchouc et de leurs séquences de régulation
Mrs. R.G. Kala	Micropropagation, Genetic transformation, Biochemistry	
Mrs. R. Jayasree	Genetic transformation	Haploid plant production through microscopic and ovule culture
Mrs. Rekha K.	Micropropagation Genetic transformation,	In vitro fertilisation, endosperm culture
Mrs. Sobha S.	Genetic transformation, Micropropagation Biochemistry.	Somatic embryogenesis

Ce laboratoire d'environ 150 à 200 m^2 est divisé en deux unités, l'une pour la biologie cellulaire et l'autre pour la biologie moléculaire. Les équipements de ces unités permettent aux chercheurs d'avoir une autonomie pour les expériences de préparation de protoplastes, d'embryogenèse somatique, de transformation génétique par *Agrobactérium*, pour la préparation des constructions pour la transformation ainsi que le clonage de gènes. Pour ce qui est du séquençage, il font appel à des partenaires universitaires à Kottayam.

Tableau 2. Equipement du laboratoire de la division de biotechnologie

Equipements	Qté
Machine PCR	1
Electrophorèse	1
Lyophilisateur	1
Hotte à flux laminaire	4
Congélateur à –20°C	1
Centrifugeuse réfrigérée	1
Incubateur pour cultures de tissus	1
Salle de culture	30 m^2

Figure 1. (A) Equipe de la division de Biotechnologie. (B, C) Essai planté en 1994 de 4 clones (RRII 105, RRII 208, RRIM 600, PB 311) issus de microbouturage. (D, E, F) Essai planté en 2002 de vitroplants du clone RRII 105 issus d 'embryogenèse somatique.

3.1. Micropropagation

3.1.1. Embryogenèse somatique

Les premiers travaux en culture *in vitro* ont porté sur le microbouturage. Ainsi dès 1994, plusieurs dizaines de plants ont été plantés sur le centre de Kottayam à partir de matériel issu de 4 clones (RRII 105, RRII 208, RRIM 600, PB 311). Aucune information précise n'a été acquise lors de la visite de cet essai (Figure 1B, 1C). Dès 1990, Mrs Dr P. Kumari Jayasree a tenté de développer un procédé d'embryogenèse somatique à partir de tégument interne de graine immature. Pour faire face aux problèmes de brunissement des cultures et des faibles taux de régénération obtenus par cette voie, des travaux ont été conduits dès 1996 à partir de cultures d'anthères ce qui permet de s'affranchir du brunissement du matériel végétal. Depuis la mise au point d'un procédé de base sur le clone RRII 105 (Tableau 3), un programme sur les 5 nouveaux clones de la série RRII 400 a été démarré.

Un essai d'évaluation des vitroplants a été mis en place en 2002 sur la Station expérimentale de Chethackal située à 50 km de Kottayam à partir de 215 plants. Quelques dizaines de vitroplants ont pu être observés sur la station et montrent un retard de développement par rapport aux plants contrôlés greffés (Figure 1D, 1E, 1F). D'après le Dr Thulaseedharan, ce retard est rattrapé après 6 mois de plantation. Toutefois, ce matériel semble toujours plus fragile que les greffés.

Tableau 3. Séquences et conditions de culture du procédé d'embryogenèse somatique

Séquences	**Phase 1** **Induction du cal**	**Phase 2** **Induction de l'embryogenèse**	**Phase 3** **Induction du cal friable embryogène**	**Phase 4** **Germination**
Durée (jours)	45-50	50	50	30
Nombre de cycle	1	1	1	1
Milieu hormonal	2,4-D (2mg) Kinétine (1 mg)	NAA (0.2mg) Kinétine (0.7mg)	NAA (0.2mg) Kinétine (0.7mg)	TDZ (1.25mg) BA (0.5-1 mg)
Autres composantes		Charbon actif (2mg/L)	Charbon actif (2mg/L)	Charbon actif (2mg/L) + hydrolysat de caséine + glutamine
Gélifiant	Phytagel (2.2%)	Phytagel (2.2%)	Phytagel (2.2%)	Phytagel (2.2%)
Cal obtenu	Cal jaune crème compact	Cal portant structures globulaires compactes	Cal embryogène friable jaune avec massifs de proembryons	
Observations			Cal entretenu pendant 4-5 ans par repiquage tous les 50-60 jours sur le même milieu	80-90% de développement avec les embryons normaux
Remarques			Diminution capacité embryogène après 3 ans	Effet cytokinine pendant germination

3.1.2. Hybridation somatique

Mrs Dr Sushama a initié le programme d'hybridation somatique en 1987 et a plus particulièrement travaillé sur la voie d'embryogenèse à partir d'inflorescence immature. L'isolement de protoplastes a été réalisé à partir de cultures embryogènes en suspension dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Davey de l'université de Nottingham. Les travaux ont ensuite porté sur l'optimisation de la formation à la fois des cals primaires à partir des inflorescences et des micro-colonies. Il a été montré que

les régénérations d'embryons somatiques à partir de micro-colonies de cal sont obtenues plus rapidement qu'à partir des cultures suivant la voie directe d'embryogenèse somatique. L'établissement de culture en suspension est obtenu à partir de cals formant des amas embryogènes entretenus pendant 6 mois sur le milieu d'induction de cal friable embryogène.

3.2. Transformation génétique de l'hévéa

Une collaboration avec le Pr Dandekar, université de Davis aux USA, département de pomologie, a été initiée, il y a plusieurs années, sur la tolérance au *Tapping Panel Dryness*. L'hypothèse de départ était de réguler la biosynthèse de l'éthylène afin de favoriser la biosynthèse des cytokinines et de réduire la production de radicaux libres qui avait été reliée au symptôme d'encoche sèche, ainsi ce projet comporte le clonage et la caractérisation des gènes codant pour l'ACC synthase, l'isopentényl transférase, la superoxyde dismutase et la sorbitol deshydrogénase.

Le Dr Sushama semble la plus impliquée dans le programme de transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens*. Des cals ont été transformés avec des constructions comportant des séquences sens et antisens du gène *acs* (ADNc partiel correspondant à un domaine conservé de l'ACC synthase) lesquelles avaient été produites dans le laboratoire du Pr Dandekar. Des plantes transgéniques seraient en cours de régénération mais la discussion a montré qu'il y avait un taux important d'embryons transgéniques anormaux produits, ce qui expliquerait le peu de progression sur ce projet en comparaison avec les résultats présentés à la réunion IRRDB 2001.

Etant donné leur degré de maîtrise dans la régénération à partir de protoplastes, voie qui permet la fusion somatique et la transformation directe par électroporation de protoplastes, j'ai proposé que le développement de marqueurs moléculaires génétiques cytoplasmiques soit inscrit dans leurs objectifs afin qu'ils puissent réaliser le criblage du matériel obtenu,. et précisé que Marc Seguin avait une expérience dans le domaine de la cartographie du génome cytoplasmique.

3.3. Biologie moléculaire

La partie biologie moléculaire a été réalisée initialement dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Dandekar. Le Dr Thulaseedharan a souhaité dès son arrivée dans le groupe être autonome en terme d'activité de clonage et d'analyse moléculaire. Pour cela, il a recruté en 1998 un biologiste moléculaire, le Dr P. Venkatachalam, qui encadre aujourd'hui la thèse de doctorat de M. Thanseem Ismaïl.

Cette équipe a produit 2 banques d'ADNc à partir d'ARNm de feuille et de latex (dans un vecteur λZAP) et développe des technologies telles que les marqueurs RAPD, l'analyse en expression différentielle (*Differential display*), le clonage de gène par PCR-Inverse. Suite à des travaux sur la caractérisation du TPD par analyse de marqueurs moléculaires RFLP et RAPD, les sujets de recherche semblent maintenant se focaliser sur la caractérisation des gènes de biosynthèse du caoutchouc (REF, HMGR, FDPS et autres à identifier) et la production de métabolites secondaires tel que l'inositol

Les travaux sur l'éthylène sont arrêtés dans cette équipe et toutes les activités ont été transférées dans la division de Physiologie.

4. Visite des autres divisions du RRII

4.1. Visite de la station expérimentale de Chethackal

La station expérimentale de Chethackal est la plus importante du RRII (Figure 2). Créée en 1966, elle comprend 300 hectares où se partagent les essais des programmes de sélection, d'agronomie et de physiologie :

- Quelques essais de cultures associées entre l'hévéa, le caféier, l'ananas, la vanille, le cacaoyer, le tek, etc. y sont menés (Figure 2A).

- Essais de réduction de fréquence de saignées tendent à montrer un maintien de la capacité de production à 1400 kg/ha/an pour une saignée en D6 stimulée.

- Essais d'irrigation.

- Essais de protection de sol avec un couvert végétal contre l'érosion du à l'écoulement des eaux de pluie sur de fortes pentes. Mise en place d'un système de quantification de l'érosion (Figure 2B, 2E).

- Essais sur la qualité du matériel végétal au *planting*. Effet de la préparation de matériel végétal en pépinière (développement de racines adventives en petits polybags, allongement de la racine principale en grand polybag, pas de racine adventive sans polybag), période de planting (juin optimal).

- Evaluation des clones (PB 235 : sujet au TPD, bon comportement dans le nord-est ; RRII 118 : clone prometteur dans le nord-est pour son bois)

4.2. Visite de la division de Physiologie

4.2.1. Discussion avec le Dr James Jacob (responsable division).

Cette division travaille sur un grand nombre de sujets :
- Environnement (séquestration du carbone),
- Interaction porte-greffe –greffon,
- Métabolites secondaires,
- Ecologie (diminution de la diversité génétique).

4.2.2. Discussion avec le Dr Molly Thomas (mollyrrii@yahoo.com)

Ce biochimiste fait le criblage d'une descendance du croisement RRII 105 x RRIM 600 pour la tolérance au stress par analyse de l'expression différentielle des gènes (*differential display technique*) et par hybridation avec une sonde cible du gène codant pour la Dehydrine sur des plants greffés de 1 à 2 ans. Pour cela, il est en relation avec une équipe de l'université de Tamul Naru. Il étudie aussi l'influence de l'interaction porte-greffe/greffon sur l'apparition de TPD à partir de marqueurs RAPD.

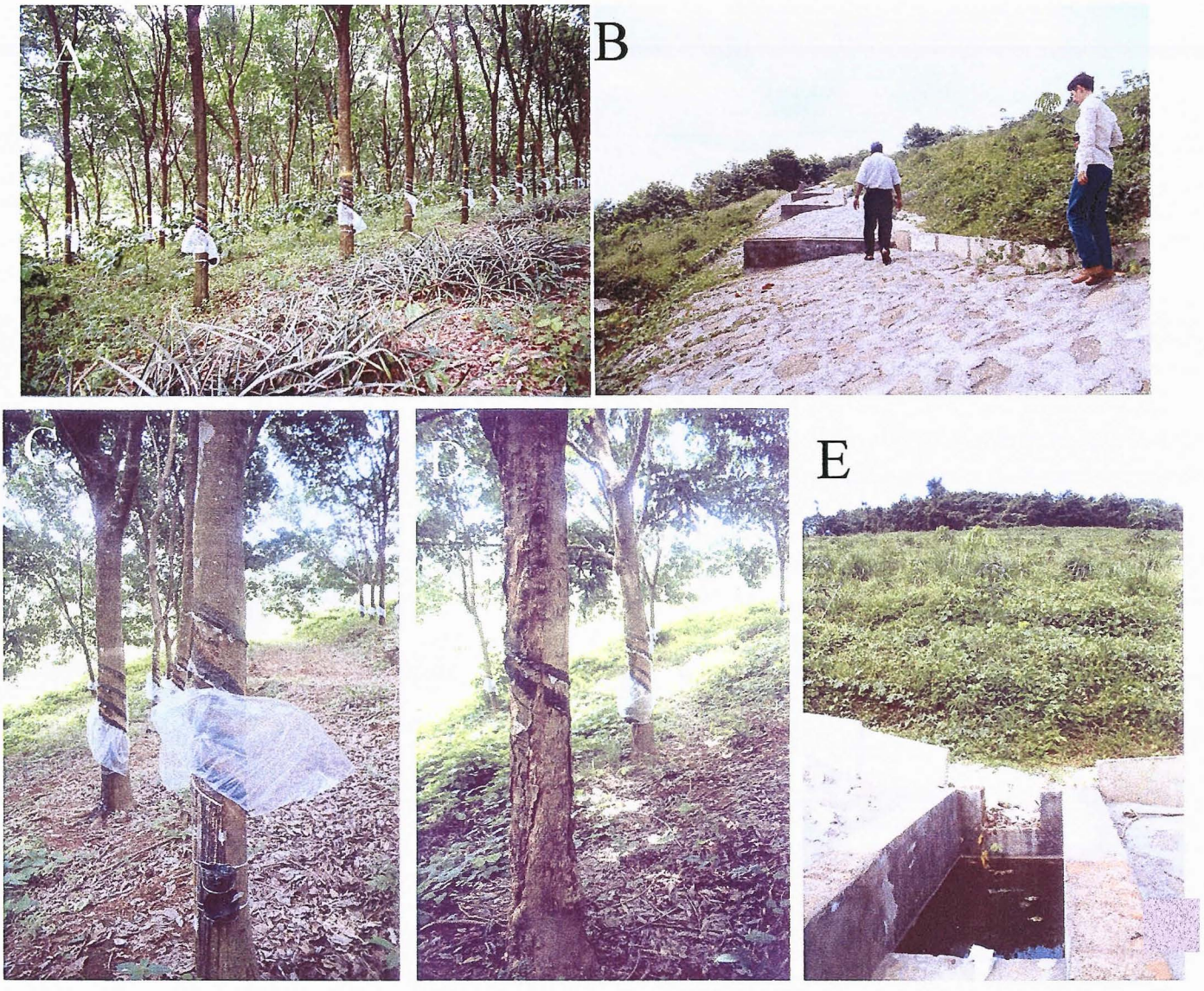

Figure 2. Visite de la station expérimentale de Chethackal, Kerala. (A) Essai d e cultures associées hévéas-ananas. (B, E) Etude de l 'érosion des sols (système de collecte des eaux chargé d 'alluvion). (C) Protection plastique de la tasse contre les eaux de pluie. (D) Arbre atteint de la maladie du panneau de saignée.

4.2.3. Discussion avec le Dr R. Krishnakumar

Ce chercheur travaille en collaboration avec K. Cornish sur l'influence du TPD sur la biosynthèse du caoutchouc. En cas de TPD, la respiration des tissus de l'écorce augmente et la teneur en ATP diminue ce qui est contradictoire avec les données physiologiques normales. La voie de résistance au cyanide serait mise en cause. Ainsi le manque en ATP impliquerait la formation de chaîne courte de caoutchouc. L'activité de la *rubber transferase,* qui est impliquée dans l'élongation de la chaîne, serait en effet réduite en cas de TPD, et augmentait *in vitro* par addition d'ATP. Une méthode de dosage de l'activité avec de l'IPP radioactif a été mise au point chez K. Cornish (publication dans Malaysian Journal).

Par ailleurs, il a été démontré que l'action de l'éthéphon sur la stabilité des lutoïdes était inversée dans le cas d'une forte synthèse endogène d'éthylène, et l'application de thiosulfate d'argent aurait un réel effet sur les arbres atteints du syndrome. La diminution de la teneur en cytokinine a aussi été reliée à l'apparition du TPD.

D'une manière générale, une forte variabilité a été observée dans l'analyse arbre / arbre, et il est préconisé de faire les prélèvements bien au-dessus du panneau de saignée pour déterminer un *individual tree index.*

4.3. Visite de la division de Botanie

Présentation de la Division de botanie par M. G.M. Joseph. Cette division a réalisé la sélection et les essais pour la recommandation du clone RRII 105 en 1982 issus d'un croisement TGIR 1 x GL-1. Les nouveaux clones sélectionnés de la série 400 sont issus d'un croisement RRII 105 (haut producteur) x RRIC 100 (vigoureux) et possèdent en moyenne plus de manteaux laticifères que le RRII 105. Des essais d'évaluation de ces clones pour la tolérance à la sécheresse et pour la réponse à la stimulation éthylénique sont en cours.

4.4. Visite de la division de Technologie

Présentation par le Dr Baby Kuriakose (Mohanakumar and Tharian 1999).
Une forte variabilité du caoutchouc indien est dûe au fait qu'il est produit sous forme de feuilles par 1 million d'hévéaculteurs dont 800 000 dans le Kérala. La division "Rubber Physics and Technology" s'intéresse aux moyens d'augmenter la qualité et de réduire les coûts de processing à travers :

- l'organisation de centre de processing regroupant plusieurs producteurs,
- le développement de nouveaux coagulants (acide formique et mélanges de sels de calcium),
- l'amélioration du séchage,
- les modifications chimiques du caoutchouc (Epoxidation Natural Rubber (ENR), greffage de monomères (High Styrene Resin Synthetic Rubber).

L'ENR comporte l'avantage d'une résistance à l'huile et une faible perméabilité à l'air, ce qui concourrait à une susceptibilité du caoutchouc à l'oxydation.

D'autres projets sont en cours sur la déprotéinisation, le mélange de caoutchouc naturel et synthétique (Nanocley). Pour cela de nombreuses collaborations ont été développées avec des industriels de Bombay et des universités du Kérala.

4.5. Visite de la division Agronomie et sol

Cette division est organisée en 7 sections :
- Integrated nutrient management,
- DRIS (Degradation analysis),
- Organic recycling,
- Bio-fertilizer,
- Ground cover,
- Sustainable farming system,
- Soil and water conservation,
- Natural resource management,
- Integrated weed management,
- Laboratory,
- Database management.

Les documents suivants référencés peuvent servir de source sur les données agronomiques de l'hévéaculture en Inde : (Vijayakumar *et al.* 1998; Krishnakumar *et al.* 2001a; Krishnakumar *et al.* 2001b; Gnanaharan *et al.* 2002; Krishnakumar and Jacob 2002; Vijayakumar *et al.* 2002).

4.6. Visite de la division Plant Pathology

4.6.1. Présentation par le Dr Annakatty Joseph

- Etude en mycologie (Corynespora et Phythophtora).
- Aspect biotique du TPD (transmission de la maladie obtenue par greffage d'écorce malade).
- Etude de l'évolution du TPD dans le cas de transmission chez le seedling par analyse de type Reverse-PAGE.
- Phythophthora se développe avec l'arrivée de la mousson en juin / juillet. Le clone RRII 105 reste faiblement susceptible à cette maladie. Un traitement préventif (cuivre, bouilli bordelaise) en mai suffit à enrayer le développement de la maladie (Pulvérisation au sol ou par hélicoptère – Figure 3H).
- Développement de Corynespora en 1996 dans le nord du Kérala sur le clone RRII 105 fortement sensible à cette maladie foliaire, mais la progression a été stoppée par traitement à l'oxychlorine de cuivre.
- Analyse de la diversité des races de Corynespora et Phytophthora par RAPD et AFLP (sur 70-80 sites analysés, 3-4 groupes de races de Corynespora).
- Recherche de marqueurs moléculaires de la tolérance (analyse jusqu'à la 3ème génération issus de croisement résistant x sensible).

4.6.2. Présentation par le Dr Shaj Philip

- Etude de l'effet des Pathogenesis Related Protein (ex béta glucanase) sur l'induction de l'oospore chez Corynespora (Philip *et al.* 2001).

- Classification de la sensibilité clonale à la maladie (du plus résistant au plus sensible : PR 107 > PR 105 > RRIM 600 > GT1).
- Isolement des protéines impliquées dans l'attachement aux cellules du mésophylle.

4.7. Visite de la division Economique

Présentation par le Dr Tharian George (Joseph *et al.* 1999; Gnanaharan *et al.* 2002).

4.8. Visite de la division Germplasm, Mrs Dr Y. Annamma Varghese

- Gestion et caractérisation morphologiques et moléculaires des 4548 accessions de la collection du germplasm IRRDB de 1981.
- Développement des marqueurs RAPD (Varghese *et al.* 1997).
- Les clones rondoniens sont plus résistant à Corynespora que les autres origines.
- Criblages de la collection pour la résistance à la sécheresse et au froid (test dans stations himalayennes).
- Caractérisation pour la qualité et la production de bois (marqueur lignine).

* Projet d'établissement d'une Core-collection
- Intérêt marqué pour un projet EST.

4.9. Visite de la division Genome Analysis, Mr Dr T. Saha (saha@rubberboard.org.in)

- Développement des marqueurs RAPD depuis 1997 puis AFLP et des marqueurs microsatellites dinucléotides depuis 2002.
- Utilisation gènes candidats : résistance aux stress biotiques et biosynthèse lignine.
- Recherche marqueurs spécifiques H. brasiliensis, benthamiana, spruceana.
- Développement de marqueurs chloroplastiques (intergenic spacers).
- Etudes en collaboration sur maladies de feuilles (Saha *et al.* 2000; Saha *et al.* 2002).

5. Visite d'une Rubber Producer's Society, Pala, Kérala

Une matinée a été dédiée à la visite d'une association de petits planteurs villageois qui a été primée en 2002 par le Rubber Board (Figure 3). Cette association créée en 1986 compte maintenant 334 membres représentant 272 ha en exploitation et 30 ha encore immature. L'association gère la manufacture, les formations organisée par le Rubber Board et des activités sociales (artisanats) pour les femmes des exploitants. Le revenue moyen par planteur est de 15 730 rupies, et de 11 575 rupies par employé. Le produit (44850 kg de feuilles fumées, 123000 kg latex ammoniaqué, 20201 kg de coagulum) est directement vendu aux sociétés de pneumatiques (MRF, etc.). Les employés de la manufacture sont principalement les femmes des exploitants. L'environnement est fortement pris en compte, notamment à travers la gestion des eaux usées.

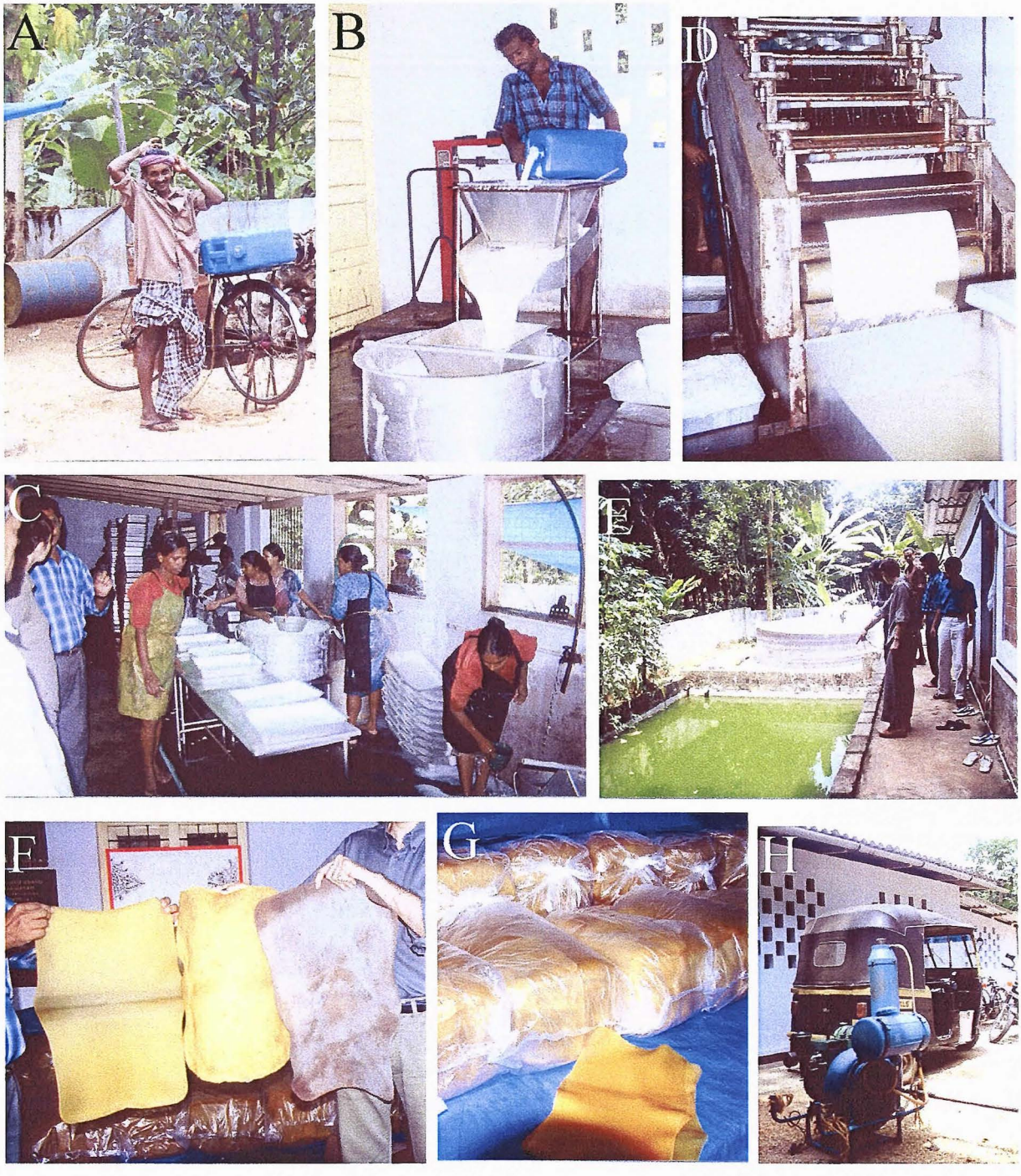

Figure 3. Visite d'une association de petits planteurs à Pala, Kérala. (A) Planteur amenant dans la matinée le latex récolté. (B) Pesée et filtration du latex. (C) Coagulation du latex dans des plaques. (D) Laminoir permettant la préparation des feuilles. (E) Bassin de décantation des eaux usées et système de récupération du méthane produit. (F) Différentes qualités de feuilles fumées. (G) Balles de feuilles fumées. (H) Pulvérisateur de produits fongicides.

6. Conclusions générales et perspectives de collaborations

Cette mission au RRII remplit totalement les objectifs définis sur l'évaluation du potentiel de recherche de cet organisme en matière de biotechnologie sur l'hévéa et la détermination de projets de recherche à développer en partenariat. Les premiers contacts pris lors de cette visite devront donc être entretenus notamment dans le cadre du prochain Workshop IRRDB du groupe biotechnologie qui devrait se tenir en fin d'année 2003 ou début 2004 afin de définir plus précisément le cadre de ces projets.

Des accords entre l'union européenne et le gouvernement indien ouvrent des pistes potentielles de financement à travers les appels d'offres listés sur les sites Internet suivants :
http://europa.eu.int/comm/europeaid/projects/asia-invest/download2002/eu-iji_biotechnology.pdf
http://europa.eu.int/comm/research/iscp/countries/india/in-doc1.pdf
http://europa.eu.int/comm/europeaid/projects/asia/index_temp_en.htm

La direction du Rubber Board, du RRI et tout particulièrement le Dr Thulaseedharan n'ont pas émis le souhait de développer un partenariat bilatéral ou même international sur la micropropagation ou la transformation génétique s'agissant de domaines stratégiques pour l'Inde.

En matière de biologie moléculaire sur la voie éthylénique, seuls les chercheurs de la division de physiologie maintiennent leurs activités tandis que ceux de la division de biotechnologie ont abandonné pour se recentrer sur l'étude de la voie de biosynthèse du caoutchouc naturel. La discussion avec Molly Thomas et Krishnakumar devra être entretenue car une complémentarité pourrait être trouvée entre nos approches, la leur très axé sur les mécanismes du TPD et la notre sur une modélisation du fonctionnement de l'écorce où les outils en cours de développement (imagerie cellulaire) seront essentiels pour acquérir une compréhension de ce phénomène. James Jacob a aussi apprécié la proposition de réaliser un Workshop IRRDB commun entre les groupes physiologie et biotechnologie, ce qui devrait faciliter l'élaboration de projets communs.

Les responsables des divisions *Germplasm* et *Genome analysis* nous ont accordé un accueil très chaleureux et nous sont apparus très ouvert à des échanges d'informations en génétique moléculaire. Ces chercheurs ont une connaissance de l'Europe à travers des stages doctoraux en Allemagne et en Angleterre. Un échange de chercheurs pourrait être envisagé.

Enfin, en terme de *transcriptomique*, plusieurs chercheurs ont paru fortement intéressé par un projet international de création de population d'EST (*Expressed Sequence Tags*). Leurs groupes possèdent déjà un grand nombre de ressources moléculaires (banque d'ADNc de feuille, de latex, et d'écorce chez le clone RRII 105) qu'ils souhaiteraient exploiter. Le Dr Thulaseedharan (div. Biotechnologie), le Dr Jacob (div. Physiologie) et le Dr Annama Varghese (div. Germplasm) devraient ainsi participer au Workshop Biotechnologie durant lequel devrait se tenir un atelier sur la *transcriptomique*.

7. Références

Gnanaharan R, Tharian George K and Damodaran K, Eds. (2002). Rubber Wood Processing & Utilisation in India. Science & Technology Entrepreneurship Delopment Project , Kozhikode, Kerala, India, Ganesh Publications PVt. Ltd., Bangalore, India

Joseph T, Chandy B, Viswanathan PK and Lekshmi S (1999). Commercial Yield Performance of *Hevea* Clones in India. A Comparative Analysis, Rubber Research Institute of India, Kottayam, India

Krishnakumar R, Annamalainathan K, Simon SP and Jacob J (2001a). Tapping Panel Dryness Syndrome in Hevea Increases Dark Respiration but Not Atp Status. Indian Journal of Natural Rubber Research 14 (1): 14-19

Krishnakumar R, Cornish K and Jacob J (2001b). Rubber Biosynthesis in Tapping Panel Dryness Affected *Hevea* Trees. Journal of Rubber Research 4 (2): 131-139

Krishnakumar R and Jacob J (2002). Effect of Panel Changing on Tapping Panel Dryness in *Hevea*. Indian Journal of Natural Rubber Research 15 (1): 96-99

Mathew NM (2003). Rrii Activities and Strategy. Kottayam, Kerala, India

Mohanakumar S and Tharian GK (1999). Indian Rubber Products Manufacturing Industry. Evolutionary Dynamics and Structural Dimensions, Rubber research Institute of India, Kerala, India

Philip S, Joseph A, Kumar A, Jacob CK and Kothandaraman R (2001). Detection of B-1, 3-Glucanase Isoforms against Corynespora Leaf Disease of Rubber (*Hevea Brasiliensis*). Indian Journal of Natural Rubber Research 14 (1): 1-6

Saha T, Kumar A, Ravindran M, Jacob CK, Roy B and Nazeer MA (2002). Identification of *Colletrotrichum Acutatum* from Rubber Using Random Amplified Polymorphic Dnas and Ribosomal DNA Polymorphisms. Mycol. Res. 106 (2): 215-221

Saha T, Kumar A, Sreena AS, Joseph A, Jacob CK, Kothandaraman R and Nazeer MA (2000). Genetic Variability of *Corynespora Cassiicola* Infecting *Hevea Brasiliensis* Isolated from the Traditional Rubber Growning Areas in India. Indian Journal of Natural Rubber Research 13 (1&2): 1-10

Varghese YA, Knaak C, Sethuraj MR and Ecke W (1997). Evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA (Rapd) Markers in *Hevea Brasiliensis*. Plant Breeding 116: 47-52

Vijayakumar KR, Dey SK, Chandrasekhar TR, Devakumar AS, Mohankrishna T, Rao PS and Sethuraj MR (1998). Irrigation Requirement of Rubber Trees (*Hevea Brasiliensis*) in the Subhumid Tropics. Agricultural Water Management 35: 245-259

Vijayakumar KR, Thomas KU, Rajagopal R and Karunaichamy K (2002). Status of Exploitation Research in India. Joint Work Shop on Plant Breeding, Agronomy and Socio-Economics, Kuala Lumpur, Malaysia