les dossiers
d'AGROPOLIS
INTERNATIONAL
Compétences de la communauté scientifique

La plate-forme de recherches avancées Agropolis

Génomique & biotechnologie

Numéro 5

Déterminisme génétique et *localisation de composantes* physiologiques de la *productivité de l'hévéaculture* par approche QTL en Thaïlande

En situation à la fois de concurrence et de complémentarité avec le caoutchouc synthétique, le caoutchouc naturel, agro-matériau renouvelable issu de l'hévéaculture, présente des qualités technologiques spécifiques très appréciées, notamment pour la fabrication des pneumatiques. En Thaïlande, premier pays producteur mondial, l'hévéaculture est pratiquée presque exclusivement dans le cadre de petites plantations familiales.

Le projet Genmap *(cf. Le partenariat)* s'est intéressé aux bases génétiques du fonctionnement de l'arbre en vue de créer des variétés (clones) plus performantes. La saignée provoque chez l'hévéa un véritable détournement des sucres issus de la photosynthèse, au détriment de la croissance de l'arbre et au bénéfice de la production de latex dans les cellules laticifères de l'écorce. Le projet de recherche développé en Thaïlande a comporté une importante composante dédiée à l'étude des mécanismes physiologiques de la production de latex. L'optimisation des systèmes de saignée a utilisé des outils et résultats antérieurs, notamment un diagnostic biochimique de l'état du tissu laticifère (« diagnostic latex ») qui avait permis d'établir une typologie métabolique caractérisant le fonctionnement des différents clones d'hévéa (variétés greffées diffusées par multiplication végétative). Une recherche réalisée par le Cirad entre 1995 et 2000 avait d'abord permis de publier la première carte génétique réalisée sur l'hévéa. Cette carte visait à analyser les bases génétiques d'un mécanisme de résistance à la maladie sud-américaine des feuilles. Le projet Genmap s'est alors attaché à réaliser une nouvelle carte génétique, avec une nouvelle génération de marqueurs (microsatellites), orientée vers l'étude génétique des facteurs de production de latex et notamment des paramètres du diagnostic latex.

© A Clément-Demange

▶ *Saignée d'hévéa.*

Conclusions et perspectives

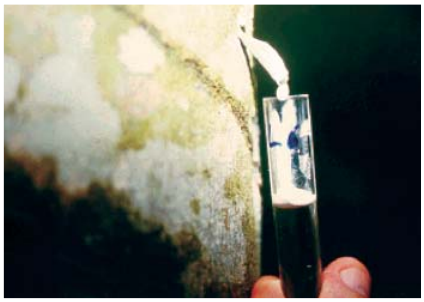
Travail de longue haleine, la sélection de nouveaux clones permet aux planteurs de mieux utiliser les possibilités physiologiques de l'espèce et d'obtenir de meilleures performances. C'est ce qui a motivé l'alliance de la génétique et de la physiologie dans cette recherche sur l'hévéa réalisée en Thaïlande.

Depuis la découverte des lois de Mendel décrivant les cas les plus simples, la sélection s'est complexifiée, utilisant de plus en plus les mathématiques pour modéliser les caractères génétiques dont la variation est continue (caractères dits quantitatifs que l'on suppose contrôlés par un grand nombre de gènes). L'expression phénotypique de ces caractères est fortement modifiée par les variations de l'environnement, ce qui affecte leur héritabilité et donc l'efficacité de leur sélection. Mais le développement récent de la cartographie génétique *(cf. Marqueurs génétiques moléculaires et cartographie génétique)* permet désormais, pour les caractères agronomiques les plus héritables, de localiser sur le génome des loci associés à des gènes fortement impliqués dans l'expression de ces caractères. La caractérisation du génome devient de plus en plus fine, pouvant aller jusqu'à l'identification, le clonage et l'étude fonctionnelle de gènes importants. La génomique est devenue une discipline combinant des méthodes variées et souvent •••

© A. Clément-Demange

▲ *Parcelle d'hévéa adulte, en Côte d'Ivoire.*

◀ *Saignée d'hévéa.*
▶ *Récolte de latex.*



© A. Clément-Demange

L'hévéa, arbre à caoutchouc

L'hévéa (*Hevea brasiliensis*, famille des Euphorbiacées) fournit un agro-matériau renouvelable à usage industriel doté de qualités spécifiques, le caoutchouc naturel, qui représente 40 % de l'utilisation mondiale des élastomères (caoutchoucs naturel et synthétique). Le latex n'est pas une sève mais une émulsion laiteuse contenant les particules de caoutchouc et constituée par le cytoplasme des cellules laticifères présentes dans l'écorce du tronc. Depuis 20 ans, le bois d'hévéa est également exploité de façon croissante, principalement pour la fabrication de petit mobilier ; ce bois est devenu un deuxième produit de l'hévéaculture : sa part représente actuellement environ 15 % dans la rentabilité des parcelles. L'arbre à caoutchouc a été intensément exploité dès la découverte de la vulcanisation en 1839 : ce procédé permet de préserver l'élasticité, propriété essentielle du caoutchouc naturel. 70 % de la production est destinée à la fabrication de pneumatiques.

L'hévéaculture résulte d'une domestication initiée en 1876 avec le premier transfert de graines du Brésil vers l'Asie du Sud-Est. Le paradoxe de l'hévéaculture est qu'elle n'a jamais pu véritablement se développer en Amérique du Sud, aire d'origine de l'hévéa, du fait de la maladie sud-américaine des feuilles due au champignon *Microcyclus ulei.* Développée en Asie à l'époque coloniale par de grands groupes agro-industriels, l'hévéaculture est progressivement devenue une activité de petites plantations familiales, inférieures à cinq hectares pour les trois quarts des surfaces exploitées. En 2004, la Thaïlande a fourni 35 % des 8,4 millions de tonnes produites dans le monde.

Les clones de greffe obtenus par multiplication végétative constituent actuellement le matériel disponible le mieux adapté à l'hévéaculture. Une parcelle d'hévéa est mise en saignée 6 à 8 ans après la mise en terre des plants greffés et la production peut durer de 20 à 30 ans. La saignée (récolte du latex) est pratiquée périodiquement tous les 2 à 5 jours. Les techniques de saignée ont progressivement évolué pour optimiser le cycle de l'écoulement, de la coagulation puis de la régénération du latex dans le tissu laticifère de l'écorce. Selon les systèmes de production et l'âge des plantations, la production annuelle par hectare de caoutchouc sec peut varier entre 300 et 2500 kg.

Contact : André Clément-Demange, andre.clement-demange@cirad.fr

▷▷ Les chercheurs accueillis

Le projet Genmap représente la composante génétique à court terme, d'un programme de recherche intégré développé sur le long terme, en coopération entre le Cirad, le RRIT (Rubber Research Institute of Thailand) *et l'Université de Kasetsart en Thaïlande, avec l'appui d'Agropolis International et du ministère français des Affaires étrangères. Portant sur la période 1998-2010, ce programme a pour objectif l'augmentation de la productivité et de la qualité des produits et l'adaptation de l'hévéaculture à l'environnement écologique et socio-économique des plantations.*

Kanlaya Prapan (jeune chercheuse thaïlandaise du RRIT) a séjourné 12 mois en France en 2001-2002, afin de réaliser le génotypage des descendants et la plus grande partie de la cartographie génétique du croisement étudié.

Napawan Lekawipat (RRIT) est venue finaliser le travail de cartographie génétique au cours d'un séjour de cinq mois, courant 2005 (sur un financement différent et complémentaire du financement de la plate-forme de recherches avancées), permettant ainsi d'atteindre l'objectif annoncé initialement dans la proposition Genmap.

complémentaires, où les informations obtenues sur une espèce peuvent être utilisées pour d'autres espèces (d'où un enrichissement mutuel et une convergence progressive des efforts de recherche).

La méthode mise en œuvre dans le projet Genmap a associé la cartographie génétique à une analyse au champ de la famille d'hévéas étudiée (recherche de QTLs associés aux caractères agronomiques mesurés en champ d'essai en Thaïlande).

Le projet Genmap a comporté les phases successives décrites ci-après :

• Réalisation du croisement
« modèle », en l'an 2000, par pollinisation manuelle entre deux parents RRIM600 et PB217 qui sont deux clones cultivés représentant deux types métaboliques contrastés : le but était, d'une part, d'obtenir une large variabilité dans les 334 descendants de ce croisement afin de satisfaire l'objectif scientifique et, d'autre part, de trouver, parmi ces descendants, des clones combinant des qualités complémentaires.

• Génotypage des 334 descendants
pour les 267 marqueurs microsatellites disponibles et utilisables ; on a ainsi identifié, pour chaque descendant, les deux allèles présents sur un même locus (technique PCR puis électrophorèse).

• Cartographie génétique
du croisement *(cf. Carte génétique « Genmap »)*, par un traitement informatique des données de génotypage des descendants (logiciel *JoinMap3*), portant sur la présence conjointe ou séparée des allèles des différents marqueurs ; les loci correspondant aux différents marqueurs se trouvaient ainsi positionnés les uns par rapport aux autres sur chacun des 18 chromosomes de l'hévéa, les distances entre deux marqueurs correspondant au pourcentage de recombinaison *(crossing-over)* observé entre eux.

• Caractérisation en champ,
entre 2002 et 2010, des principaux caractères agronomiques de 196 descendants, notamment des caractères de croissance et de production de latex, des caractères biochimiques associés aux types métaboliques de la production et des caractères de qualité du caoutchouc.

• Établissement, par traitement informatique, des classes de descendants associées à chaque allèle de chaque marqueur, calcul des valeurs des caractères agronomiques de ces classes et identification des loci déterminant une part importante de la variation pour certains caractères (QTLs).

La partie prise en charge par la plate-forme de recherches avancées a porté sur les phases 2 et 3 de ce projet. La cartographie génétique de l'hévéa a nécessité 17 mois de temps-chercheur. L'emploi des marqueurs microsatellites a représenté un progrès important, par comparaison avec les anciens marqueurs dits « RFLP » utilisés auparavant, en termes de temps de travail (efficacité de la technique PCR), de nombre d'individus génotypés, de répartition sur le génome des loci cartographiés et de polymorphisme des allèles observés.

Marqueurs génétiques moléculaires et cartographie génétique

© A. Clément-Demange

▶ *Kanlaya Prapan réalisant un gel polyacrylamide pour séparer les marqueurs génétiques microsatellites issus de PCR.*

Les marqueurs génétiques dits « moléculaires » concernent directement la molécule d'ADN, dans laquelle ils correspondent à des zones (loci) non codantes. Ils sont dits génétiquement « neutres » car ils n'ont pas d'influence sur l'évolution de l'espèce et l'identification de leurs allèles chez un individu ne dépend pas du tissu étudié ni des conditions de milieu. Depuis qu'il est devenu possible de disposer d'un grand nombre de ces marqueurs, la démarche de cartographie génétique dite « par déséquilibre de liaison » s'est considérablement développée. Elle repose sur l'étude, dans une descendance, de la part de recombinaison des caractères due aux *crossing-over* (réarrangements intra-chromosomiques réalisés au cours de la méiose). Du fait de ces réarrangements, les allèles de deux loci, présents au départ sur le même chromosome, ont une certaine probabilité de se retrouver séparés dans deux gamètes différents (c'est le cas lorsqu'un *crossing-over* intervient dans l'espace qui les sépare).

Il existe des zones de l'ADN (appelées linkats) où se produisent très peu de *crossing-over* et où se retrouvent conservées les mêmes combinaisons d'allèles pour des loci voisins. La cartographie génétique consiste à analyser la fréquence d'association des allèles respectifs de deux loci, pour tous les couples de marqueurs disponibles. Cela permet de positionner les marqueurs les uns par rapport aux autres, d'identifier les linkats et de retrouver finalement les « super-linkats » correspondant aux différents chromosomes de l'espèce étudiée (l'hévéa est une plante diploïde comprenant 18 couples de chromosomes). Chaque « distance » entre deux marqueurs est exprimée en pourcentage de crossing-over (1 centi-Morgan = probabilité de 1% de *crossing-over* lors d'une méiose), ce qui permet de constituer des cartes.

Contact :André Clément-Demange, andre.clement-demange@cirad.fr

Le partenariat

Cirad
Montpellier

Responsables du projet (encadrement français) :
Marc Seguin et André Clément-Demange
andre.clement-demange@cirad.fr
fax : +33 (0)4 67 61 55 96

Rubber Research Institute of Thailand (RRIT)
Department of Agriculture (Doa), Bangkok, Thaïlande, Équipe "amélioration génétique"

Responsable du projet (encadrement thaïlandais) :
Kanikar Teerawatanasuk, kanikar2001@yahoo.com
fax : +(66) 2 579 0585

Université de Kasetsart (KU),
Thaïlande

Responsable du projet :
Poonpipope Kasemsap, agrppk@ku.ac.th
fax : +(66) 2 942 8467

Transfert, valorisation et suites du projet

Le projet a permis d'obtenir les produits techniques attendus - le génotypage des descendants et la carte génétique du croisement – et a également favorisé la « mise au point de méthodes » appliquées à l'hévéa, telles que l'adaptation d'une technique accélérée de génotypage utilisant un séquenceur d'ADN.

La formation acquise par les deux chercheuses thaïlandaises accueillies a conduit à un transfert de savoir-faire vers l'institut thaïlandais d'origine et a créé une véritable dynamique des partenaires thaïs autour de ce projet.
L'institut thaïlandais emploie aujourd'hui la méthode PCR et les marqueurs microsatellites mis au point par le Cirad qui permettront notamment d'assurer en Thaïlande un service de contrôle de conformité du matériel végétal planté. Les séquences nécessaires ont été mises en accès libre sur la base de données internet EMBL/GenBank. Parallèlement, les opérations en champ en Thaïlande se sont poursuivies avec l'appui de chercheurs Cirad.

© A. Clément-Demange

L'institut RRIT-Doa vient de plus d'octroyer une bourse de thèse à une nouvelle jeune chercheuse (Mme Rachanee Ratanawong) pour la poursuite du projet Genmap au niveau des mesures en champ et de la recherche de QTLs, sous la supervision académique de l'Université Kasetsart, l'encadrement étant confié au Cirad. Outre ses objectifs scientifiques, le projet Genmap a constitué ainsi un support efficace de formation à la recherche pour un groupe de 5 à 10 chercheurs et techniciens thaïlandais.

Les autres produits attendus du projet, à court et moyen termes, seront une connaissance des possibilités d'exploitation en croisement de la complémentarité espérée entre des clones aux métabolismes contrastés, l'identification de QTLs pouvant servir de critères de sélection précoce au moins pour le croisement étudié et la sélection, parmi les descendants de ce croisement, de nouveaux clones performants exploitables.

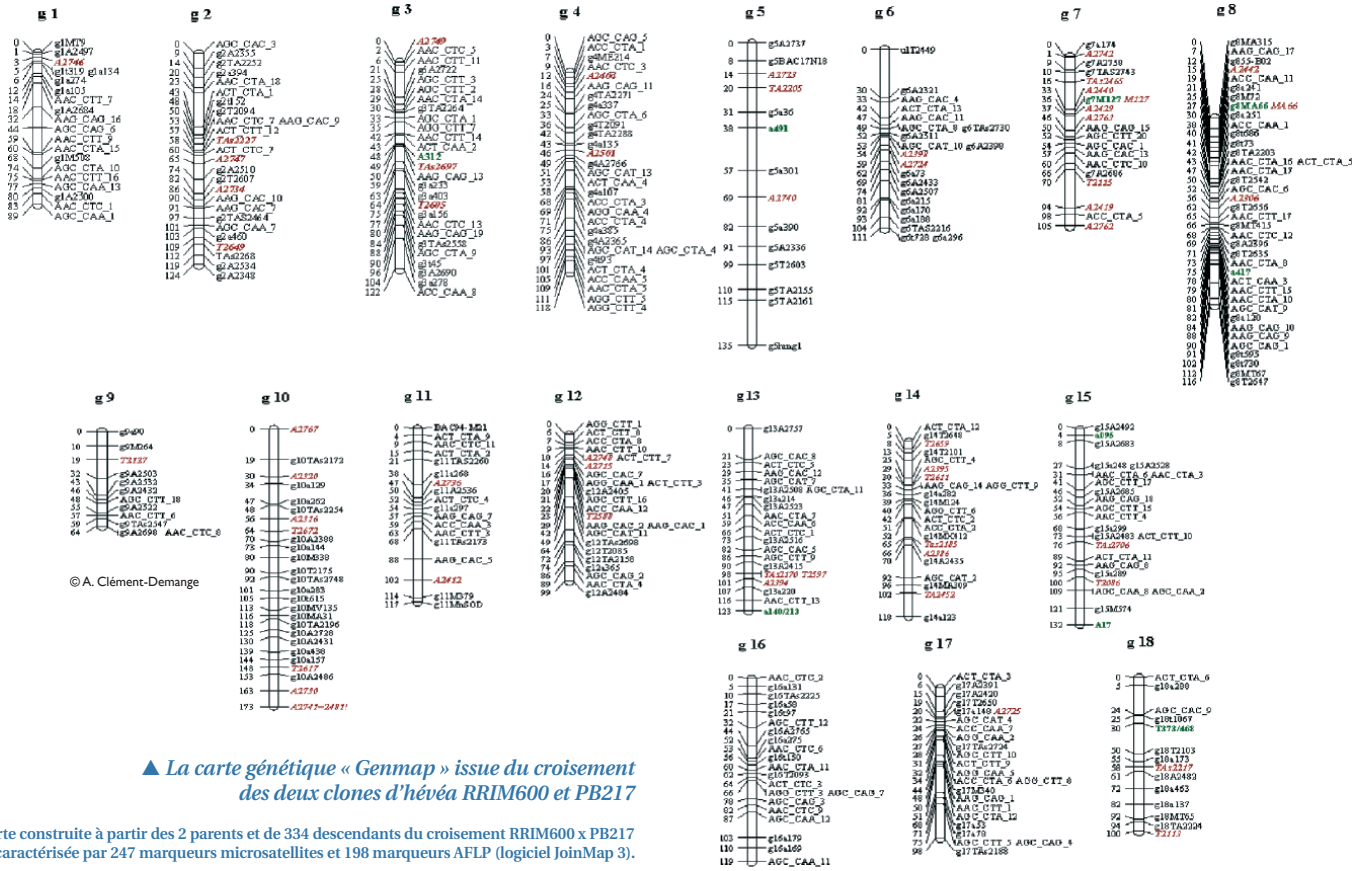
Le véritable intérêt de cette démarche de recherche se situe cependant à long terme, avec la constitution d'une base de documentation du génome de l'hévéa pour localiser les gènes d'intérêt qui sont régulièrement identifiés par d'autres recherches de génétique et de physiologie moléculaire sur cette espèce. ■

▷▷ Publications

Lekawipat N., 2005. Development of genetic map of RRIM600 x PB217 based on microsatellite markers. Cirad-Biotrop, Montpellier, January-May 2005. Doras-Rubber :Towards the improvement of the productivity of the rubber tree. Genmap component :"Variability analysis and genetic determinism of some physiological characteristics of the rubber productivity in Thailand".

Prapan K., Clément-Demange A., Teerawatanasuk K., Rodier-Goud M. and Seguin M., 2004(a). Genetic mapping and field study of a full-sib family (RRIM600 x PB217) in *Hevea brasiliensis* (Genmap project). First results." Towards the improvement of the productivity of the rubber tree". Kasetsart University - RRIT-Doa - Inra-Piaf - Cirad Seminar, Bangkok, 27-28 May, 2004.

Prapan K., Seguin M., Rodier-Goud M. and Clément-Demange A., 2004(b). *Hevea brasiliensis* : Déterminisme génétique et localisation de composantes physiologiques de la productivité de l'hévéaculture par approche QTL en Thaïlande. Réalisation d'une carte génétique ancrée sur marqueurs microsatellites. Programme Agropolis "Plate-Forme de Recherches Avancées", composante Genmap du projet Doras-Rubber, CP_SIC 1676, janvier 2004.



▲ *La carte génétique « Genmap » issue du croisement des deux clones d'hévéa RRIM600 et PB217*

Carte construite à partir des 2 parents et de 334 descendants du croisement RRIM600 x PB217 et caractérisée par 247 marqueurs microsatellites et 198 marqueurs AFLP (logiciel JoinMap 3).