

Mc. Lambert
CD-RP 17556



RAPPORT DE MISSION

Thaïlande

du 22 mars au 4 avril 2009

Cirad-BIOS
UMR DIAPC
Fabienne MORCILLO

04-2009

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette



Mission THAILANDE, du 22 mars au 4 avril 2009

Fabienne Morcillo, Cirad-BIOS, UMR DIAPC

Tim Tranbarger, IRD, UMR DIAPC

A - Descriptif de la mission

Depuis 2007, une collaboration a été initiée entre l'équipe mixte Cirad/IRD « Biologie du développement des Palmiers » (UMR DIAPC), l'UMR DAP et différents partenaires scientifiques Thaïlandais (BIOTEC, les Universités de Mahidol, Kasertsat et PSU).

Pendant deux ans, cette collaboration a été favorisée par un projet bilatéral **PHC Franco-Thaï 2007/2008**: « Molecular and genomic analysis of oil palm fruit development : identification of genetics markers for oil palm improvement » qui a permis des échanges d'étudiants et de chercheurs. Ce projet a supporté différentes études telles que la mise au point de techniques de transformation génétique transitoire chez le palmier à huile ; le positionnement de nouveaux marqueurs SRR sur des cartes génétiques ; ou encore la production de données moléculaires transcriptomiques par séquençage 454.

Cette collaboration s'est poursuivie avec l'obtention pour 2008 d'une bourse Doctorale de la **Fondation Agropolis** pour Mr Peerapat Roongsattham (formation en alternance entre Bangkok et Montpellier). Elle a été également soutenue par le Cirad *via* deux projets **d'Action Incitative**, permettant l'accueil pour deux mois à Montpellier du Dr Potjamarn Suraninpong de l'Université de Walailak et une mission de 3 semaines pour moi en Thaïlande.

Enfin en 2009, un financement a été accordé pour un deuxième projet bilatéral **PHC Franco-Thaï 2009/2010**: "Small RNA discovery in oil palm via 454 transcriptome sequencing" (Annexe 1); il est cordonné pour la partie française par Dr T. Tranbarger (IRD) et la partie Thaïlandaise, le Prof. Apichart (Université de Kasertast).

La présente mission, réalisée avec T. Tranbarger (UMR DIAPC) et X. Argout (UMR DAP), avait pour objectifs de définir le programme d'échange franco-Thaï 2009-2010 ; aller sur le terrain collecter du matériel et conduire des expérimentations dans le cadre du projet de thèse de Mr Peerapat Roongsattham (RTRA) et enfin enrichir et pérenniser les actions en cours avec notre partenaire de l'Université de Walailak, le Dr Potjamarn Suraninpong.

Le programme prévu était de :

- (1) Participer à la première phase du projet bilatéral PHC Franco-Thaï (EGIDE) 2009/2010 : visites et tables rondes avec les différents partenaires (BIOTEC et Université de Kasertsat);
- (2) Visiter la plantation « Goldentenera » à Krabi, collecter des fruits à différents stage de développement et réaliser des traitements à l'éthylène sur certains des stades collectés ;
- (3) Rendre visite au Dr Potjamarn Suraninpong à l'Université de Walailak pour faire le point sur les manipulations en cours concernant le développement de la technologie de transformation du palmier à huile et monter un dossier pour son accueil en France.

Le programme complet de la mission est donné dans l'Annexe 2.

20 MAI 2009

B – Projet PHC 2009/2010

1-Recherche de financement d'appuis au projet

Dans le cadre du projet bilatéral Franco-Thai , BIOTEC, institut public thaïlandais membre du NSTDA (National science and technology development advance) qui fait office également d'agence de moyens proposera à sa direction scientifique un projet d'appuis au financement du projet PAI pour la conduite d'un RUN de séquençage 454 de Small RNAs et une demi bourse de thèse. Ce projet sera rédigé par le Dr Chatchawan, de l'université de Kasertasat et sera déposé à la fin du mois d'avril.

Il est aussi proposé du côté français de faire une demande de financement au près du **DSF (IRD) et/ou du Cirad** pour financer l'autre moitié de la bourse du doctorant. Dr Samwong Tragoonrun et le Dr Chatchawan, ont déjà identifié un étudiant de l'Université de Kasertasat, Mr Chatree, qui a déjà commencé sa thèse. Celle-ci se déroule sur 5 ans et pourrait être cofinancée par la France pour les 3 dernières années qui restent. Cet étudiant fera le premier échange franco-thai en France pour se familiariser avec le projet qui fait partie intégrante de sa thèse et faire connaissance avec l'équipe française.

2-Table ronde autour du projet : choix du matériel végétal et du programme d'échange.

Sont présents à cette table ronde les coordinateurs de projet : T. Tranbarger (Tim) (IRD, UMR DIAPC) et me Prof. Apichart (Université Kasertsat) ; Dr Sithichoke, le responsable du laboratoire de séquençage à BIOTEC, Dr Chatchawan (Chat), maître de conférence à l'université de Kasertsat , Xavier Argout , bio informaticien du Cirad (UMR DAP) et moi-même.

Chat fait une présentation rapide du projet et du programme initial prévu dans le cadre des échanges (Annexes 3 et 4). Tim fait ensuite une présentation des différents projets s'intéressant aux petits ARNs au sein de l'équipe mixte IRD-Cirad portant principalement sur l'initiation des inflorescences mâles et femelle ainsi que sur le développement de la fleur et du fruit chez le palmier à huile (Annexe 5). Certains projets sont déjà initiés au sein de l'équipe tels que (1) l'étude de l'expression du gène *EgNAC4* et du micro ARN associé, *Eg-miR164* au cours du développement des inflorescences et des fleurs de palmier à huile (Stefan Jouannic) ; (2) l'identification et l'étude de l'expression de *AP2-like* et *miR172* au cours de l'initiation et le développement des inflorescences mâles et femelles chez le palmier à huile (Helene Adam). Par ailleurs dans le cadre de l'étude de l'anomalie florale *mantled* induite par la culture in vitro, A Rival et E Jaligot ont fait connaître leur souhait de faire une analyse comparative globale de l'expression des petits ARNs dans les cals et les fleurs normales/anormales et de rechercher par la suite les gènes cibles associés potentiellement associés à l'anomalie. Enfin chez le fruit, Tim et Fabienne, souhaiterait faire une étude de l'expression globale des petits ARNs au cours de la maturation et de l'abscission des fruits de palmier à huile pour étudier des régulation potentielles par les petits ARNs sur des événements clés associés à ces étapes de développement. Tim a terminé sur la présentation d'exemple d'outils bioinformatiques à développer pour l'identification des petits ARNs en concertation avec X Argout.

Une discussion a été ensuite engagée entre les différents partenaires pour (1) retenir les questions biologiques communes d'intérêt aux deux partenaires thaï et français ; (2) définir le matériel qui servira aux études à conduire ; (3) proposer un calendrier d'échange dans le cadre de la bonne conduite des travaux.

Trois questions biologiques majeures ont été retenues comme d'intérêt commun :

- L'étude du sexe ratio
- L'anomalie *mantled*
- Le développement du fruit

Le choix du matériel d'étude :

Pour une question de RUN 454, Dr Siticho suggère de se limiter à 8 échantillons. Le Run sera réalisé en dupliquât sur les 8 échantillons sur la plateforme de BIOTEC.

- L'étude du sexe ratio (3 échantillons proposés)

Dans le cadre de l'étude du sexe ratio, des inflorescences très immatures doivent être prélevées. Il a été précisé que du côté français H. Adam et J. Tregear avaient une expertise incontestable dans ce domaine et étaient intéressés par cette étude. Le choix et le prélèvement du matériel devrait donc être validé après leur consultation. Le Prof Apichard fait le souhait de travailler sur du matériel femelle *dura* ; male *pisifera* et male *Oleifera*. D'après lui, le matériel femelle et male guineensis pourrait être prélevé à Krabi en Thaïlande après l'accord du propriétaire de la palmeraie et de nos observations (cf visite de la plantation au cours de la mission). Mais après visite de la plantation privée il nous semble difficile de demander le sacrifice des arbres 100% femelle. Le matériel pourrait être prélevé à Pobé, au Bénin pour les deux espèces, *guineensis* et *oleifera*. Il a été proposé de prendre contact avec Norbert Billotte s'il était intéressé pour intégrer le projet en sélectionnant notamment le matériel *Oleifera* d'intérêt.

- L'anomalie florale *mantled* (2 échantillons proposés)

Le matériel est déjà disponible à Montpellier (fleurs immatures femelles normales et anormales).

- Le développement du fruit (3 échantillons proposés)

Chat propose de travailler sur les trois tissus du fruit, la zone d'abscission, la coque et le mésocarpe. Fabienne et Tim soulèvent que dans le cadre de leur travaux ils ne s'intéressent qu'au mésocarpe et à la zone d'abscission et laissent libres les thaïlandais de travailler sur le développement de la coque. Ce sujet étant du côté français sous la direction de Norbert Billotte.

Il est proposé de prélever les différents tissus à trois stades de développement (30, 120 et 180 japs), de mélanger les stades de développement pour chaque tissu ce qui amènera à 3 échantillons de plus au total. Ce matériel sera prélevé à Krabi, Thaïlande.

Le programme prévisionnel :

- Prélèvement du matériel et Synthèse des banques de petits ARNs (Avril – dec 2009)
- RUNs 454 (Janv-Fév 2010)
- Développement de l'outil bioinformatiques (mars- juil 2010)
- Validation de certains couple « gene cible-miRNA » (juil- dec 2011)

Dans le cadre de la préparation des banques de petits ARNs, Dr Siticho propose d'utiliser avant le séquençage le kit mirCAT, vendu par la société IDTDNA (www.idtdna.com). Quatre lots de petits RNAs issus de 4 origines tissulaires/conditions différentes pourraient être

mélangés après ligation d'adaptateurs spécifiques permettant de les discriminer. Les petits ARNs seraient ensuite concatémérisés avant de réaliser les RUN. Au final 2 banques de petits ARNs seraient construites, correspondant chacune à 4 échantillons différents, et seraient séquencées en double copie.

Il est rappelé que pour l'extraction des petits ARNs il faut utilisée une méthodologie d'extraction des ARN totaux adaptés (ex : la purification des ARNs totaux utilisant le CICs ne convient pas).

Pour finir, les participants de la table ronde s'engagent à la valorisation commune de résultats sous formes de publication au-delà du projet.

C. ANALYSES HISTOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DU MECANISME D'ABSCISSION DU FRUIT CHEZ LE PALMIER A HUILE

Collecte de matériel et conduite d'expériences

Une collecte d'échantillons ainsi que des traitements à l'éthylène des fruits ont été programmés lors de cette mission.

Avant le départ en plantation, une journée au « Rice Gene Discovery Unit », dirigé par le Prof Apichart, a été organisée. Cette unité se trouve sur le Campus de Kamphaengsaen à Nakhonpathom. Nous avons été reçus par le Prof. Apichart qui nous a fait la visite de son laboratoire et notamment sa plateforme de génotypage SNP à haut débit (appareils de la société Beckman). Cette plateforme comprend notamment deux robots de préparation des échantillons, deux appareils pour détecter les SNP en haut débit (gène par gène ; 48 analyse / plaque). Suite à la visite, nous avons préparé avec Peerapat l'ensemble du matériel pour organiser la collecte et les expériences sur la plantation de palmier à huile se trouvant dans la province de Krabi.

Le lendemain nous sommes partis sur Krabi pour nous rendre sur la plantation Golden Tenera (goldentenera@yahoo.com) dirigée par Anek Limsrivilai pour faire l'inventaire des arbres sur lesquels le matériel allés être prélevé. Anek est un agronome diplômé de l'Université de Kasersat qui montre un grand intérêt à sa plantation de 50 hectares. Sa stratégie a été de choisir 4 clones *tenera* (Ta, Tb, Tc et Td) les plus adaptés à son environnement et les planter en Thaïlande. Les parents des clones sont vraisemblablement issus d'un croisement par des femelles (Deli x Dumpy) et des males (Avros). Ces clones ont été produits par les malais par micropropagation classique et ne montrent aucune anomalie de développement. La moyenne d'âge des arbres est de 9 ans. A ce stade les arbres sont très productifs. Parmi les individus ségrégués à partir de ces clones, certains montrent des productions de plus de 24 régimes femelles par ans avec l'apparition quelques fois d'une seule inflorescence male en 4 ans. Un rendement de 42% en huile / poids du régime nous a été signalés.

Le matériel utilisé dans le cadre de la thèse de Peerapat provient d'un clone *tenera* (clone c) très homogène (phénotype similaire entre individus) et synchrone (développement des régimes). Dans un premier temps des fruits prélevés sur des régimes obtenus après 30, 120 et 180 jours après la pollinisation ont été prélevés. Ces fruits ont été gazés à l'éthylène pour étudier l'effet de ce dernier sur la chute des fruits en fonction du stade de développement des fruits. Le poids frais des fruits a été mesuré ; le poids sec quant a lui avait déjà été évalué le mois dernier pour faire une correspondance avec le matériel issu du Benin. Les stades de développement semblent très proches de ceux observés pour le génotype 1 de nos travaux (DA155D AF, « hight lipase » *PO6053*). Après le traitement des fruits, des échantillons de mésocarpe et de la zone d'abscission ont été prélevées pour

analyse des protéines et des ARNs. Des échantillons ont été aussi fixés pour analyses histologique et immunologiques. Les résultats obtenus suite au traitement éthyle sont relatés dans l'annexe 6.

Un second prélèvement a été réalisé pour faire des collectes des échantillons issus du champ à différents stades de développement (fleurs prêtes à être fécondées sentant l'anis ; fleurs tous juste fécondées ; 30, 100, 120, 140, 180 jap). A partir de ces fruits, des échantillons de mésocarpe, zone d'abscission et la graine ont été prélevés. Parmi les échantillons prélevés, les stades 30, 120 et 180 seront utilisés dans le cadre du projet « Small RNAs » cofinancé par EGIDE, l'équipe Ird-Cirad biologie du développement des palmiers, BIOTEC et l'Université de Kasetsart.

Discussion de l'avancées des travaux de thèse de Peerapat et mise en place du calendrier de travail jusqu'à la prochaine visite en France.

En présence du Dr Chat, T. Tranbarger et moi-même, Peerapat fait un rapide bilan des résultats obtenus au cours de ces 3 derniers mois. Deux nouvelles séquences de transcrits codant des polygalacturonases ont été clonées à partir de tissus de fruit dont une a été à ce jour identifiée dans un nouveau clade. Avec ces deux nouvelles séquences, 223666_S6AS7_AZFB_O5 et 221786_S6AS768_M3001, un total de 8-9 séquences différentes sont disponibles. D'autres clones ont été séquencés et sont aujourd'hui en attente d'analyse par Blast.

Tim, responsable scientifique de la thèse, présente ensuite les deux plans d'articles scientifiques qu'il programme dans le cadre des travaux de la thèse de Peerapat :

Article 1: Description of abscission zone during fruit development and fruit shedding

Key words: cell wall characterization; polygalacturonase; vesicle trafficking

Method: histology; TEM; immunolocalization (PGs; RAB; pectin)

- a) Effect of ethylene on fruit shedding depends of the age of the fruit (30, 120 and 180 dap)
- b) Histological analysis of abscission zone during fruit development (cell wall; vesicular trafficking). Identification of pectin with JIM antibodies in abscission zone, pedicel and mesocarp in relation to fruit development and shedding process
- c) Identification of PGs and RAB proteins with specific antibodies, in abscission zone, pedicel and mesocarp in relation to fruit development and shedding process

Les résultats relatifs au point (a) sont acquis ; la description histologique de la zone d'abscission aussi. Les analyses immunologiques seront initiées par Tim au cours des 3 prochains mois et seront poursuivies par Peerapat à partir d'août.

L'article sera rédigé lors du dernier trimestre 2009.

Article 2: Expression of PGs and evidence to support their role during cell separation processes in oil palm

Key words: cell wall modification;

Method: PGs activity; PGs expression

- a) Polygalacturonase activity during fruit dev and shedding induced by ethylen
- b) Cloning of full length oil palm polygalacturonase specific of fruit

- c) Phylogenic tree (oil palm PGs and PGs from other species associated with abscission or shedding)
- d) Expression patterns of PGs in AZ and mesocarp during fruit development and shedding induced by ethylene

avril-août point (b) ; Peerapat

Sept-déc point (a) ; Tim

Sept-déc point (d) ; Peerapat et Fabienne

Des primers permettant l'amplification des PGs de palmier à huile déjà disponible ont été dessinés et synthétisés. Des primers niches permettant une RACE 3' des PGs déjà isolées par Peerapat à partir de la AZ ont été aussi dessinés et synthétisés.

Il a été acté que si les extractions d'ARNs étaient tjrs difficile à réaliser en utilisant la méthodologie par CICs, une autres méthodologie serait utilisée.

Par ailleurs une banque de full cDNA sera construite à partir de la AZ et du mésocarpe d'ici la fin de l'année (financée par le RTRA).

Article 3 : *Les résultats présentés lors d'une communication orale au XI symposium ISHS à Bologne en sept 2009 seront publiés dans Acta horticultura.*

L'article sera écrit par Chat, Peerapat et Tim en octobre.

D. VISITE DU DR POTJAMARN SUR LE CAMPUS DE WALAILAK UNIVERSITY.

Deux journées ont été organisées pour rendre visite au Dr Potjamarn Suraninpong, partenaire scientifique dans le cadre du projet « Mise en place d'un protocole de transformation génétique transitoire des cals et suspensions embryogènes de palmier à huile » initié lors du précédent projet PAI. L'université de Walailak se trouve dans la province de Nakhon Si Thammarat dans le sud de la Thaïlande. Cette Université fait partie des Universités autonomes mises en place par le gouvernement Thai. Elle a vu le jour il y a une quinzaine d'années et est une Université d'excellence dans cette province.

Lors de cette visite nous avons abordé différents points de discussion avec notre partenaire : 1) Etat d'avancement des travaux de recherche relatifs au projet de transformation et échange de souches d'*Agrobacterium* pour sa réalisation ; 2) Visite du Dr Potjamarn pour une durée de 2 mois en 2009 financés par la Thaïlande ; 3) Montage d'un projet d'accueil pour 1 année dans le cadre du BEST de l'IRD.

Pour résumer, le Dr Potjarman nous a informés de l'acceptation de son financement pour une visite de 2 mois en France. Ce séjour sera consacré à la réalisation de travaux complémentaires nécessaires à la validation du protocole de transformation mis en place. Nous avons à ce sujet rappelé les objectifs des expériences sur la base d'un article à soumettre à Plant Cell Report avant la fin de l'année.

Nous avons ensuite établi un calendrier de rédaction pour la préparation d'un dossier relatif à la demande de financement d'un accueil du docteur à l'IRD dans le cadre des projets BEST. Les documents définitifs à remplir seront disponibles sur le site de l'IRD à la fin du mois d'avril.

Enfin Dr Potjamarn nous a proposé d'être coresponsables d'une thèse dans le cadre d'un appel d'offre proposé à l'Université de Walailak. Dans ce cadre il faut avoir un minimum de 5 articles publiés lors des 5 dernières années. Il a été accepté par moi-même de prendre en charge ce dossier et de proposer lorsque le Dr P. aura en sa connaissance toutes les

formalités un sujet de thèse relatif aux travaux développés avec T. Tranbarger. Dans ce cadre un résumé des différents projets traités par TT et FM a été rappelé à notre partenaire. La possibilité d'accueillir aussi un étudiant dans le cadre du Master tropicale proposé par le Prof P Gantet a été aussi évoqué.

En conclusion, nous avons reçu un très bon accueil et pu lors de cette mission nous rendre compte de l'avancée réalisée dans le partenariat Thaïlandais. La facilité aussi mise en place pour conduire des expérimentations, la richesse des échanges scientifiques et enfin les potentialités grandes d'échange et encadrement d'étudiant en Master et en thèse.

Annexe 1 : PHC 2009-2010

Dossier de candidature à un PHC 2009 / 2010
(Candidature initiale) - Non déposé

Programme concerné

PHC THAILANDE (Thaïlande)

1 - Partenaires

	Équipe française	Équipe étrangère
Chef de projet 1		
Nom	M TRANBARGER TIMOTHY JOHN	M TANGPHATSORNRUANG SITHICHOKE
Fonction	Chercheur CR1	chercheur
Date de naissance	23/07/1961	
Lieu de naissance	SAN JOSE, CALIFORNIA	
Pays de naissance	ETATS UNIS D AMERIQUE	
Nationalité	AMERICAINE	
Laboratoire 1		
Nom - Sigle	DIVERSITE ET ADAPTATION DES PLANTES CULTIVEES - DIAPC	GENOME INSTITUTE -
Adresse	INSTITUT DE RECHERCHE POUR LA DEVELOPPEMENT CENTRE DE MONTPELLIER UMR DIAPC 911 AVENUE AGROPOLIS BP 64501	113 PHAHOLYOTHIN ROAD, KLONG 1, KLONG LUANG
Code postal	34394	12120
Ville	MONTPELLIER CEDEX 5	PATHUMTHANI
Téléphone	04 67 41 62 35	(66) 6625646700
Mobile	06 16 76 66 60	
Télécopie	04 67 41 61 81	(66) 6625646707
Email	tranbarg@mpl.ird.fr	sithichoke.tan@biotec.or.th
Site web		
Institution de rattachement	IRD	BIOTEC
Adresse	213, RUE LA FAYETTE	
Code postal	75480	
Ville	PARIS CEDEX 10	
Site web	http://www.ird.fr/	
Directeur	M HAMON SERGE	

	Équipe française	Équipe étrangère
Chef de projet 2		
Nom	M ARGOUT XAVIER	M APICHAART VANAVICHIT
Laboratoire 2		
Nom - Sigle	BIOINFORMATICS GROUP - DAP	RICE GENE DISCOVERY UNIT - RGD
Adresse	AVENUE AGROPOLIS	KASETSART UNIVERSITY KAMPHANGSAEN
Code postal	34398	73140
Ville	MONTPELLIER CEDEX 5	NAKORN PATHOM
Téléphone	04 67 61 58 00	66 34 28 24 33
Télécopie	04 67 61 56 05	66 34 28 10 93
Email	xavier.argout@cirad.fr	apichart@dna.kps.ku.ac.th
Site web	www.cirad.fr	www.ku.ac.th
Institution de	CIRAD	KASETSART UNIVERSITY

rattachement		
Adresse	AVENUE AGROPOLIS	KASETSART UNIVERSITY KAMPHANGSAEN
Code postal	34398	73140
Ville	MONTPELLIER CEDEX 5	NAKORN PATHOM
Site web	www.cirad.fr	www.ku.ac.th

	Équipe étrangère
Chef de projet 3	
Nom	M SOMVONG TRAGOONRUNG
Laboratoire 3	
Nom - Sigle	GENOME INSTITUTE - BIOTEC
Adresse	113 THAILAND SCIENCE PARK, PHAHONYOTHIN ROAD, KLONG 1, KLONG LUANG
Code postal	12120
Ville	PATHUMTHANI
Téléphone	(66) 6625646700
Télécopie	(66) 6625646707
Email	somvong@dnatec.kps.ku.ac.th
Site web	
Institution de rattachement	BIOTEC
Adresse	113 THAILAND SCIENCE PARK, PHAHONYOTHIN ROAD, KLONG 1, KLONG LUANG
Code postal	12120
Ville	PATHUMTHANI
Site web	http://www.biotech.or.th

	Équipe étrangère
Chef de projet 4	
Nom	M JANTASURIYARAT CHATCHAWAN
Laboratoire 4	
Nom - Sigle	PLANT MOLECULAR GENETIC LABORATORY - PMGL
Adresse	DEPARTMENT OF GENETICS, FACULTY OF SCIENCE, KASETSART UNIVERSITY
Code postal	10900
Ville	BANGKOK
Téléphone	(66) 6625625444
Télécopie	(66) 6625795528
Email	fscicwj@ku.ac.th
Site web	www.ku.ac.th
Institution de rattachement	KASETSART UNIVERSITY
Adresse	50 PHAHONYOTHIN ROAD, JATUJAK
Code postal	10900
Ville	BANGKOK
Site web	www.ku.ac.th

2 - Projet

Titre

Small RNA discovery in oil palm via 454 transcriptome sequencing

Domaine

Agronomie, productions animale, végétale et agroalimentaire

3 - Autres financements reçus ou demandés**Préciser**

Avez-vous déjà bénéficié d'un financement pour ce PHC ?	oui année(s) 2007
Sur le même thème de recherche ?	oui
Avec le même partenaire ?	non
Autres demandes déposées pour 2009	non

4 - Description du projet**Objectif**

The objective of this project is to apply high through-put sequencing technology towards the discovery of small RNAs involved in the regulation of the reproductive biology of oil palm. High-throughput pyrosequencing based transcriptome analysis will be developed to analyze small RNAs isolated from key stages of the reproductive development of oil palm (from flower to fruit) from different genetic backgrounds to provide part of the framework for understanding the regulation of the reproductive biology of oil palm at the molecular level. The development of bioinformatics tools necessary to analyze large sets of data produced by pyrosequencing and to identify putative target genes regulated by small RNAs will be shared between partners. The applied aim of this project is to provide necessary tools for molecular breeding strategies targeted to increase yields necessary to meet future worldwide vegetable oil demands.

Description

The overall aim of this project is to develop the necessary bioinformatic tools to understand the structure of the oil palm genome and the role of specific regions determining agronomical important characters. In particular, we wish to focus on genomic regions encoding the small RNA transcriptome which has been shown to be of key importance in recent years. Small RNAs include microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNA) that are both involved in the silencing of genes by different mechanisms. siRNAs are double stranded RNA molecules that are part of the post-transcriptional gene silencing system in plants that leads to the inhibition of target genes or as an antiviral defense system. miRNAs are first transcribed from genomic DNA as pri-miRNAs then processed to short pre-miRNAs in the cell nucleus before maturation to miRNAs in the cytoplasm. miRNAs have a wide range of roles in development and act on gene regulation, often transcription factors, through the inhibition of translation, mRNA cleavage, or directing chromatin modifications (JonesRhoades et al 2006). miRNAs have been shown to play roles in the development of the tomato fruit (Seymour et al 2008), flower development in Arabidopsis (Mallory et al 2004) and sex determination in maize (Chuck et al 2007). Moreover, rice mutants specifically affected in DCL1/miRNA and DCL4/ta-siRNA pathways revealed the role of these pathways in the control of the inflorescencial development in rice (Liu et al 2007). In contrast, nothing is known of their roles in the oil palm and could be used as a model to study inflorescence development, sex determination and oil containing drupe fruit development. While traditional sequencing has allowed to begin catalogues of small RNAs from different species, this technology is limited to the most highly expressed small RNAs in a given target sample. In contrast, the pyrosequencing technology has the potential for complete coverage of small RNA transcriptome as shown with plant model systems (Gustafson et al 2005; Lu et al 2008). This technology also has great potential to be applied to non-model agronomically important crop species where there is limited genomic information such as oil palm. The current project focuses on studying small RNAs from key stages of oil palm reproductive development through the development of appropriate bioinformatics tools. The production and analysis of both small RNA and mRNA transcriptome data sets holds tremendous promise towards the identification of genes that could be used directly in molecular breeding programs for oil palm improvement. Oil palm is the number one source of edible vegetable oil worldwide. The worldwide consumption of oleaginous products is predicted to continue to rise and this constant increase will be provided mainly from soybean and oil palm. In addition there has been an increased interest in the use of palm oil as a biofuel. Interest in palm oil as a biofuel could eventually cause constraints on the worldwide supply of edible palm oil and increase the pressure for higher yields and/or cultivatable areas. For tropical countries, such as Thailand, the cultivation of oil palm is both an important source of income and a potential source of sustainable energy production. An understanding of the molecular mechanisms involved in the reproductive biology of oil palm would provide tools necessary for the establishment of molecular breeding programs for oil palm improvement. In this context, high throughput sequencing technologies and bioinformatics tools have the potential to provide necessary tools for molecular breeding strategies targeted to increase yields necessary to meet future demands

and limit the pressure to increase cultivated areas. The current project will allow the Franco-Thai consortium to develop a long term collaborative project on bioinformatics tool development for small RNA analysis and target gene identification using pyrosequencing based transcriptome data.

Fichier(s) téléchargé(s) par le candidat

Liste des fichiers joints	Taille
AnnexA_thai-FrancoProposal.pdf	56 Ko
Annex B_budget.pdf	7 Ko
Taille totale	62 ko

Contexte national et international

French Partners IRD is a French public science and technology research institute governed by the French ministries for research and overseas development. It conducts research for the sustainable development of tropical and Mediterranean countries, with an emphasis on the relationship between man and the environment. The Palm Development group belongs to the DIAPC Joint Research Unit (JRU) which focuses on the diversity and adaptation of crop species and consists of staff from the University of Montpellier II, Montpellier Agriculture School (SupAgro), INRA, IRD and CIRAD. Species studied include wheat, sunflower, grape, corn, millet, coffee, Casuarina (filao), yam and palm species such as oil and date palm. The JRU contributes to Montpellier's international teaching and research center, Agropolis, as well as to teaching activities of the university and agriculture school. Technical training is also given to students (Bachelors, Masters and Doctorate) and visiting scientists to develop new skills and collaborations. The Palm Development group has a long history in oil palm research, particularly in the reproductive biology of oil palm. The team originally developed in vitro multiplication techniques for oil palm (Pannetier et al 1981; de Touchet et al, 1991). More recently the group has conducted molecular studies on different aspects of oil palm biology including flower development, somaclonal variation and somatic embryogenesis (Morcillo et al 2001; Tregear et al 2002; Jaligot et al 2004; Adam et al 2005; Jouannic et al 2005; Adam et al 2006; Morcillo et al 2006, Adam et al 2007, Morcillo et al 2007, Jouannic et al 2007). The second French partner CIRAD is the French Agricultural Research Centre for International Development. The CIRAD bioinformatic group constitutes the team "Integration of data for comparative genomics" of the JRU Plant Development and Genetic Improvement (DAP). The unit focuses on comparative analysis of the organization of closely related crop genomes. The main skills of the team are 1) the conception of information systems, (Larmande et al 2008; Droc et al 2006; Hamelin et al 2005; Ruiz et al 2004) 2) the development of automated chains of processing for functional genomics (Dereeper et al 2007; Terol et al 2007), 3) comparative genomics (Lescot et al 2008), 4) biostatistics. Thailand Partners The Genome Institute (GI) is the national program for the genomic sciences in Thailand. In October 2006, the molecular biologist, protein biochemist, bioinformaticist and biostatist embodies the core values of GI: scientific integration, medical and agricultural focus and international collaboration. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) under National Science and Technology Development Agency (NSTDA) is the parent funding body for the GI and has a long-term commitment to create a world-class infrastructure. At the present time, several genome and transcriptome sequencing projects with different species are underway at GI including spirulina, soybean, rubber tree and oil palm. The second Thai partner, Kasetsart University, is known internationally for academic excellence and work of world standard. Kasetsart University plays a key role in the nation's efforts to achieve sustainable development through developing intellectual resources emphasized on agriculture and science. There are 13 faculties including Agriculture, Agro-Industry, Economics, Business administration, Liberal Arts and Sciences, Sciences, Social Sciences, Veterinary Medicine. At present Kasetsart University has established 7 campuses distributed to cover all regions of Thailand.

Rappel du contexte de la coopération et des relations existantes

The partners participating in this project have been collaborating together since 2006, when the first meeting took place in Thailand between French and Thai researchers. The close collaboration which has since been established stems from the common goal of developing biotechnological approaches for the sustainable use oil palm in Thailand. Particular emphasis is placed on the use of genomics-based technologies, which continue to rapidly evolve. The strategic importance and scientific excellence of our franco-thai collaborations in oil palm biotechnology has already been recognised through the awarding of two external grants. Firstly, a PHC Franco-Thai oil palm biotechnology network, consisting of Thai partners (BIOTEC, Kasetsart University, Mahidol University, PSU University) and French partners (IRD, CIRAD) received funding in 2007 and 2008 to allow reciprocal exchanges between the two countries. This allowed the initiation and development of new biotechnological projects for oil palm. Secondly, at the end of 2007, the French Agropolis Foundation awarded a research and mobility grant to allow a Thai PhD student to carry out a research project on the economically important process of fruit abscission in oil palm, working in both countries on a 50:50 basis. With the rapidly evolving state of genomics technologies, the need to master high throughput in silico analysis of DNA sequences is now the biggest challenge faced in oil palm biotechnological research in both countries. For this reason, the current proposal involves a different and smaller group of institutions in France and Thailand compared to the previous PHC project. Moreover the project proposed here, which is distinct from any previous one, is based exclusively on the use of information technologies to unravel the complexity of the oil palm genome. This will enable us to build up an in-depth fundamental knowledge in this area for the long term benefit of sustainable agricultural practices.

Résultats espérés

2009 The first year involves the isolation of small RNA from existing samples from diverse tissues, organs, and genetic backgrounds related to the reproductive biology of oil palm previously obtained from the French genetic

resource available from CIRAD. There will be a student or junior researcher from Thailand who will come to France to work with the Palm Development group to prepare small RNAs from these samples to take back to Thailand for pyrosequencing. These same samples can be used to construct small RNA libraries in order to do limited traditional sequencing and preliminary expression analysis in order to assess the quality of the small RNAs isolated prior to pyrosequencing. A second Thai student or junior scientist will come to France to participate in the adaptation of existing sequence processing and analyses pipelines to apply for the analysis of pyrosequencing based data with the CIRAD Bioinformatics group. The main objectives of this exchange will be to analyze and cluster pyrosequencing data from both mRNA and small RNA transcriptomes and to be able to identify target genes from the mRNA transcriptome dataset and the existing EST database (Jouannic et al., 2005). In addition there are also over 17,000 ESTs now publically available at NCBI. A French student or junior researcher will travel to Thailand to work at the Genome Institute to participate in the pyrosequencing of the samples prepared as described above. A second French student or junior researcher will travel to Thailand to participate in the development and application of bioinformatics tools for analysis of pyrosequencing based data from both small RNA and mRNA data. There will be a Franco/Thai pyrosequencing and bioinformatics workshop for senior French and Thai scientist to be held in Thailand in October 2009. 2010 The second year involves the application of the bioinformatics analysis tools developed jointly the previous year and the establishment of a small RNA database for oil palm. The scientific exchanges to take place this year will establish the joint bioinformatics tools for pyrosequencing based data processing and analysis of small RNAs from oil palm and the creation of a joint small RNA database. Analysis tools will be developed to identify pre-microRNA and target gene sequences from available transcriptome data. Towards these objectives, two Thai students or junior researchers and two French students or junior researchers will travel to establish joint bioinformatics tools, perform bioinformatics analysis, and develop a joint small RNA database. In addition, experimental validation of small RNAs and their target mRNAs will be done using northern analysis, expression in heterologous systems and/or by RML-RACE PCR. At the end of the year, a second oil palm pyrosequencing and bioinformatics workshop will be held in France in September 2010.

5 - Moyens disponibles

Ressources humaines

(Indiquer les personnes qui participeront au projet (bénéficieront des missions, signeront des publications....). Donner pour chacune d'elles : nom, prénom, position (par exemple : Professeur), discipline d'exercice, tâche, assignée dans le projet. Commencer par le responsable du projet. Joindre obligatoirement en annexe les CV résumés (1 page maximum) de chaque personne.)

France

TRANBARGER, Timothy J. (Research Scientist, CR1) IRD; Project leader; Plant molecular biology; Development of oil palm genomic resources; transcript profiling and the identification of important genes involved in fruit development. TREGAR James (Research Director, DR2) IRD; Plant molecular biologist; genomics of oil palm reproductive development JOUANNIC Stefan (Research Scientist, CR2) IRD; Plant molecular biologist; molecular developmental studies with flower in relation to small RNAs regulation. MORCILLO Fabienne (Research Scientist) CIRAD; Plant molecular biologist; Development of oil palm genomic resources; regulatory gene candidate studies during fruit development. ADAM Helene (junior scientist) IRD; molecular developmental studies with flower in relation to small RNAs regulation. ARGOUT Xavier (Research Engineer) Cirad; Bioinformatics; Development of bioinformatics tools for oil palm

CV résumés des chercheurs et enseignants-chercheurs

Liste des fichiers joints	Taille
ADAM_H_EGIDE_CV_2008.pdf	11 Ko
JOUANNIC_S_EGIDE_CV_2008.pdf	12 Ko
MORCILLO_F_EGIDE_CV_2008.pdf	12 Ko
TRANBARGER_TJ_EGIDE_CV_2008.pdf	14 Ko
TREGAR_J_EGIDE_CV_2008.pdf	13 Ko
ARGOUT_X_EGIDE_CV_2008.pdf	10 Ko
Taille totale	68 ko

Pays partenaire

Tangphatsornruang Sithichoke (Research scientist) project leader. Tragoonrong Somvong (Director DNA Technology Laboratory) Genetics, Development of oil palm genomic resources. Vanavishit Apichart (Associate Professor) Development of oil palm genomic resources. Jantasuriyarat Chatchawan (Junior scientist) pyrosequencing. Roongsatham Peerapat (PhD student). Srikeaw Ing-On (Master student).

CV résumés des chercheurs et enseignants-chercheurs

Liste des fichiers joints	Taille
Apichart's CV.pdf	28 Ko
Chatchawan's CV.pdf	27 Ko
Sithichoke's CV.pdf	26 Ko
Somvong's CV.pdf	26 Ko
Peerapāt CV.pdf	25 Ko
Ing-On's CV.pdf	42 Ko
Taille totale	171 ko

6 - Récapitulatif des moyens demandés pour la réalisation du projet en 2009

Français

Déplacements France vers pays partenaire	
Bénéficiaires	Durée
M Tranbarger Timothy	1 voyage
M Jouannic Stefan	1 voyage
M Tregear James	1 voyage
Mme Morcillo Fabienne	1 voyage
M Argout Savier	1 voyage
Mlle Adam Helene	1 voyage

Visites courtes (chercheurs senior)
Aucun Visite courte (chercheurs seniors) spécifié.

Séjours courts (chercheurs junior et senior)	
Bénéficiaires	Durée
M Tranbarger Timothy	6 jours
M Jouannic Stefan	6 jours
M Tregear James	6 jours
Mme Morcillo Fabienne	6 jours

Séjours longs (chercheurs senior)
Aucun Séjour long (chercheurs senior) spécifié.

Séjours longs (chercheurs junior)	
Bénéficiaires	Durée
Mlle ADAM Helene	180 jours
M ARGOUT Xavier	180 jours

Appui logistique	
Nature	Oil palm Workshop I
Montant	0.00 €

Etranger

Moyens demandés
(1) The Thai National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) to provide 3,500,000 THB (73,325.85 EUR) for laboratory work preformed in Thailand (2)

BIOTEC to provide living allowance for 4 French senior scientists (1200 THB/day/pax*4*6=28,800 THB) to attend Franc/Thai oil palm Workshop 1 hosted by BIOTEC (3) BIOTEC to provide hotel accomodation for 4 French scientists (2625 THB/day/pax*4*7days=73500 THB)to attend Franco/Thai oil palm Workshop I (4) BIOTEC to provide 110,500 THB for oil palm Workshop I organization to be held in Bankok (5)Thai commission on higher Education (CHE) to provide airfare for 2 junior scientists to do experimental work in France for 6 months (48,000 THB/pax 2 = 96,000 THB) (6) BIOTEC to provide living allowance (25000 THB/mth/pax*2pax*6mths=300,000) for 2 French scientists to do experimental work in Thai laboratories (7) BIOTEC to provide accomodation (12,000 THB/pax/mth *2*6 mths=180,000 THB) for 2 French scientists to do experimental work in Thai laboratories.

7 - Récapitulatif des moyens demandés pour la réalisation du projet en 2010

Français

Déplacements France vers pays partenaire

Bénéficiaires	Durée
M Argout Xavier	1 voyage
Mlle Adam Helene	1 voyage

Visites courtes (chercheurs senior)

Aucun Visite courte (chercheurs seniors) spécifié.

Séjours courts (chercheurs junior et senior)

Aucun Séjour court (chercheurs junior et senior) spécifié.

Séjours longs (chercheurs senior)

Aucun Séjour long (chercheurs senior) spécifié.

Séjours longs (chercheurs junior)

Bénéficiaires	Durée
M Argout Xavier	180 jours
Mme Adam Helene	180 jours

Appui logistique

Nature	experimental validation
Montant	0.00 €

Etranger

Moyens demandés

(1) The Thai National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) to provide 3,500,000 THB (73,325.85 EUR) for laboratory work preformed in Thailand (2) Thai commission on higher Education (CHE) to provide airfare for 2 junior scientists to do experimental work in France for 6 months (48,000 THB/pax 2 = 96,000 THB) and for 4 seniors scientists to attend oil palm Workshop II (48,000 * 4= 192000)(3) BIOTEC to provide living allowance (25000 THB/mth/pax*2pax*6mths=300,000) for 2 French scientists to do experimental work in Thai laboratories (4) BIOTEC to provide accomodation (15000 THB/pax/mth *2*6 mths=180000 THB) for 2 French scientists to do experimental work in Thai laboratories.

Important

Ce document est établi à partir des informations disponibles dans la base de données PHC au 15/05/2008 à 17h48. Il ne constitue en aucun cas une preuve de dépôt et ne peut pas se substituer au dossier de candidature qui doit être impérativement finalisé en ligne.

Annexe 2 : Programme

Le programme complet de la mission est donné dans l'Annexe 2.

Date	Lieu	Personnes rencontrées	Objectif
Dimanche 22 mars			Départ de Montpellier
Lundi 23 mars			Arrivée BKK
Mardi 24 mars, matin	BIOTEC, Rangsit, Pathumthani	Déjeuné avec Dr Samwong Tragoonrun qui dirige le « Genome Institute ».	Discussion autour des financements à chercher pour la conduite du projet franco-thai (séquençage 454, bourse de thèse,...)
Mardi 24 mars, matin	BIOTEC, Rangsit, Pathumthani	Table ronde avec le Prof. Apichart, Dr par Dr Chatchawan (Chat), Dr Shoke, Dr Tranbarger (TT), Mr Argout.	Présentations du projet PAI 2009-2010 et discussion du programme
Mercredi 25 mars	Univ. Kasertsat, campus Kanpensan	Prof. Apichart et Mr Peerapat Roongsattham (PR)	Visite du Rice Genome Institut et preparation de la mission dans le sud.
Jeudi 26 mars	Déplacement à Krabi		
Vendredi 27 mars	Plantation GoldenTenera, Krabi	Mr Anek Limsrivilai (AL), propriétaire de la plantation	Visite de la plantation et repérage des arbres pour la collecte des fruits
Samedi 28 mars au mercredi 1 ^{er} avril	Krabi	TT, Chat, PR, AL et personnel UNIV ku	Collecte des différents tissus du fruits traités ou non à l'éthylène pour analyses histologiques et moléculaires
Mercredi 1 ^{er} avril, ap		Dr Potjamarn Suraninpong (PS)	Départ pour Nokhon Si Thammarat
Jeudi 2 avril	Univ Walailak , Nokhon Si Thammarat	PS	Discussion projet transformation
Vendredi 2 avril	Univ Walailak , Nokhon Si Thammarat	PS	Préparation dossier accueil IRD ou local du Dr PS à Montpellier
Vendredi 2 avril, ap	Départ pour BKK		
Samedi 3 avril	Arrivée Montpellier		

**Annexe 3 et 4 : Présentation du Dr Chat
(Programme PHC 2009-2010)**

PHC Program in higher Education and Research
Year 2009 - 2010

Project Title: Small RNA discovery in oil palm via 454
transcriptome sequencing

Thai side

Assoc. Prof. Dr. Apichart Vanavichit (KU)
Dr. Somvong Tragoonrungs (GI)
Dr. Sithichoke Tangphatsomunag (GI)
Dr. Chatchawan Janlasunyarat (KU)

French side

Dr. Timothy Tranbarger (IRD)
Dr. Fabienne Morcillo (CIRAD)
Dr. Xavier Argout (CIRAD)

Project Objectives:

- To apply high through-put sequencing technology towards the discovery of small RNAs involved in the regulation of the reproductive biology of oil palm.
- To develop of bioinformatics tools necessary to analyze large sets of data produced by pyrosequencing and to identify putative target genes regulated by small RNAs

Project Activities

- Small RNA isolation, library construction and 454 pyrosequencing
- Bioinformatics tool development for pyrosequencing based transcriptome and small RNA analysis

Scientific Exchanges

Tentative names of two 6-month visits for 2 junior Thai graduate students to France to conduct experiments.

Name	Affiliation	Research topics to be conducted in France
2009		
Mr. Chatree Saensuk	NCAB	Isolation of small RNAs and preparation for pyrosequencing
Mr. Supat Thongjuea	BIOTEC	Sequence processing and analyses pipelines to apply for the analysis of pyrosequencing based data
2010		
Mr. Chatree Saensuk	NCAB	Analysis of small RNA and mRNA pyrosequencing data and experimental validations
Mr. Supat Thongjuea	BIOTEC	Bioinformatics tool development to analyze the pyrosequencing data

Scientific Exchanges

Tentative names of two 6-month visits for 2 junior French researchers to Thailand to conduct experiments.

Name	Affiliation	Research topics to be conducted in France
2009		
Dr. Adam Helenna	IRD	Pyrosequencing and sequence processing
Dr. Argout Xavier	CIRAD	Analyses pipelines to apply for the analysis of pyrosequencing based data
2010		
Dr. Adam Helenna	IRD	Analysis of pyrosequencing data and experimental validations
Dr. Argout Xavier	CIRAD	Bioinformatics tool development to analyze the pyrosequencing data

Workshops

- 2009
 - Workshop I in Bangkok
 - 4 senior scientists from France
- 2010
 - Workshop II in France
 - 4 senior scientists from Thailand

Work plan and timetable

Activity	2009				2010			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Joint Research								
(I) Small RNA isolation and sequencing	←			→				
(II) Bioinformatics tool development for pyrosequencing based transcriptome and small RNA analysis			←			→		
Scientific Exchanges								
(I) 2009 Franco-Thai Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop I in Thailand (visit of 4 French scientists for 6 days)			↔					
(II) 2010 Franco-Thai Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop II in France (visit of 4 Thai scientists for 6 days)							↔	
(III) Four 6-month visit for Thai postgraduate students or junior scientists to France to conduct experiments.		← 2 persons			← 2 persons			
(IV) Four 6-month visit for French postgraduate students or junior scientists to Thailand to conduct experiments.			← 2 persons			← 2 persons		

Project Outputs

- 2 international publications
- 8 trained personnel
- 2 workshops to exchange information

Thai-Franco Project on Oil Palm Year 2009-2010

24 March 2009 at Biotec, Thailand

Lists of Participants

Name	Organization	Email address
1. Dr. Timothy J. Tranbarger	French Project Coordinator/IRD	timothy.tranbarger@mpl.ird.fr
2. Dr. Fabienne Morcillo	Researcher/CIRAD	morcillo@mpl.ird.fr
3. Dr. Xavier Argout	Researcher/CIRAD	xavier.argout@cirad.fr
4. Dr. Apichart Vanavichit	Thai Project Coordinator/ Kasetsart U.	vanavichit@gmail.com
5. Dr. Chatchawan Jantasuriyarat	Researcher/Kasetsart U.	fscicwj@ku.ac.th
6. Dr. Sithichoke Tangphatsornruang	Researcher/Biotec	Sithichoke.tan@biotec.or.th
7. Dr. Jittima Pir	Researcher/Biotec	Jittima.pir@biotec.or.th
8.		

Thai-Franco Project Title:

“Small RNA discovery in oil palm via 454 transcriptome sequencing”

Research Areas Proposed

- Apply high through-put sequencing technology towards the discovery of small RNAs involved in the regulation of the reproduction biology of oil palm
- Develop of bioinformatics tools necessary to analyze large sets of data produced by pyrosequencing and to identify putative target genes regulated by small RNAs

Scientific Activities Realized in this project include

- Tissue samples collection and preparation
- Small RNA library construction
- Small RNA sequencing
- Bioinformatics tool for small RNA analysis

Scientific Exchange: throughout 2009-2010 There are a total of 8 trips consisting of

Name of Exchange Scientists	Affiliation	Research Topic	Tentative time
Mr. Chatree Saensuk	Ph.D. student, Kasetsart University	Isolation of small RNAs and preparation of library	2009 3 months
Dr. Jittima	Researcher, Biotec	Bioinformatics tool development to analyze pyrosequencing data	2009
Mr. Chatree Saensuk	Ph.D. student, Kasetsart University	Analysis of small RNA and mRNA pyrosequencing	2010
Dr. Jittima	Researcher, Biotec	Sequencing processing and analyses pipelines	2010
Dr. Adam Helenna	Researcher, IRD	Pyrosequencing and sequencing processing	2009
Dr. Argout Xavier	Researcher, CIRAD	Analyses pipelines to apply for the analysis of pyrosequencing based data	2009
Dr. Adam Helena	Researcher, IRD	Analysis of pyrosequencing data and experimental validation	2010
Dr. Argout Xavier	Researcher, CIRAD	Bioinformatics tool development to analyze the pyrosequencing data	2010

Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop:

There are 2 workshops including one in Thailand (2009) and one in France (2010)

Workshop I: October 2009, Thailand

Tentative names of 4 senior scientists from France are:

- Dr. Timothy Tranbarger
- Dr. Fabienne Morcillo
- Dr. Stefan Jouannic
- Dr. James Tregear

Workshop II: October 2010, France

Tentative names of 4 senior scientists from Thailand are:

- Dr. Apichart Vanavichit
- Dr. Somvong Tragoonrung
- Dr. Sithichoke Tangphatsornruang
- Dr. Chatchawan Jantasuriyarat

Project Work Plan and Timetable

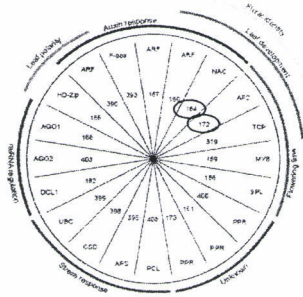
Activity	2009				2010			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Joint Research								
(I) Small RNA isolation and sequencing	←→							
(II) Bioinformatics tool development for pyrosequencing based transcriptome and small RNA analysis			←→					
Scientific Exchanges								
(I) 2009 Franco-Thai Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop I in Thailand (visit of 4 French scientists for 6 days)				↔				
(II) 2010 Franco-Thai Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop II in France (visit of 4 Thai scientists for 6 days)								↔
(III) Four 6-month visit for Thai postgraduate students or junior scientists to France to conduct experiments.		← 2 persons →			← 2 persons →			
(IV) Four 6-month visit for French postgraduate students or junior scientists to Thailand to conduct experiments.			← 2 persons →			← 2 persons →		

Project outputs:

- 2 international publications
- 2 workshops to exchange information
- 8 trained personnel

**Annexe 5 : Présentation du Dr T. Tranbarger
(Programme PHC 2009-2010)**

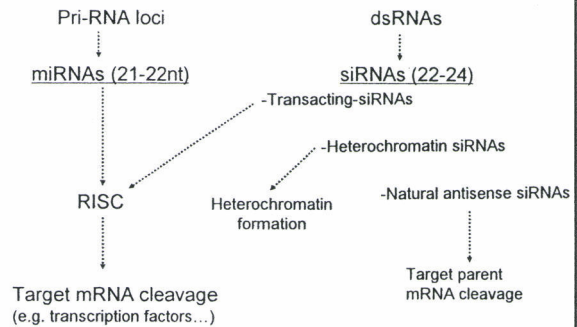
Small RNA Roles in Plant Development



Function as negative post-transcriptional regulators of gene expression

Mallory and Vaucheret, Nat Genet, 2006
Chuck et al 2009 CCRB

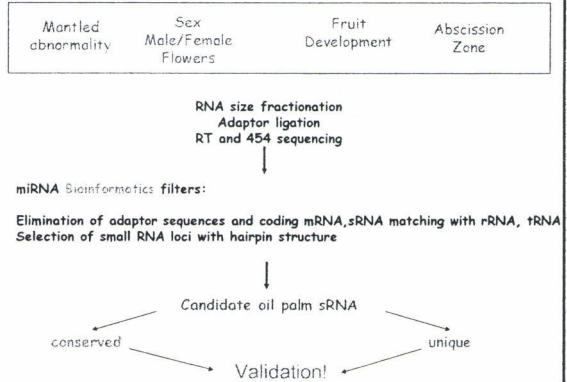
What are non coding small RNAs and how do they function?



miRNAs

- majority are conserved across plant families
- some are species and function specific
- need deep sequencing approaches to identify nonconserved and/or low expressed miRNAs that function in specific developmental processes

Oil palm small RNAs related to reproductive development



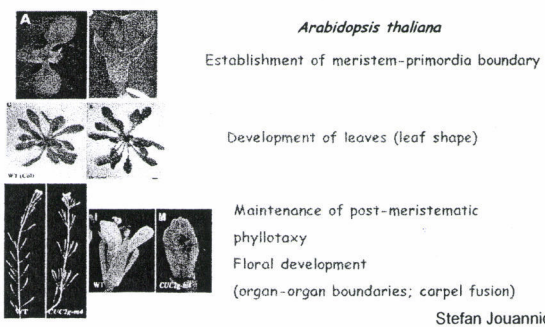
How to be sure of a miRNA function?

- hairpin structure
- Target Prediction
- Precursor genes (miRNAs)
- expressed (Northern/qPCR)
- Mediate cleavage of target mRNAs
- in situ hybridization

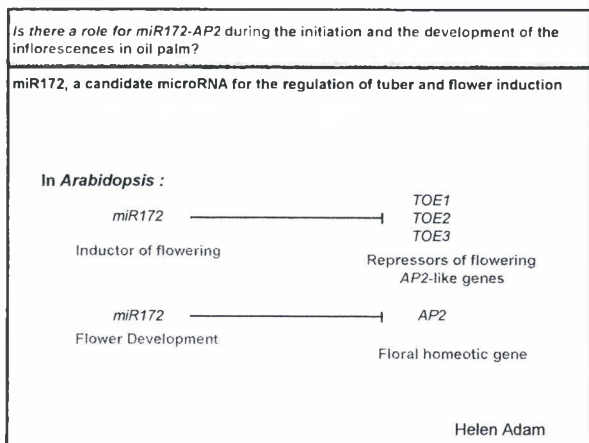
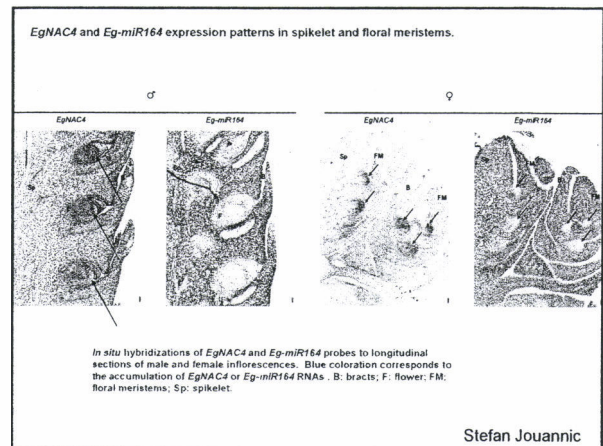
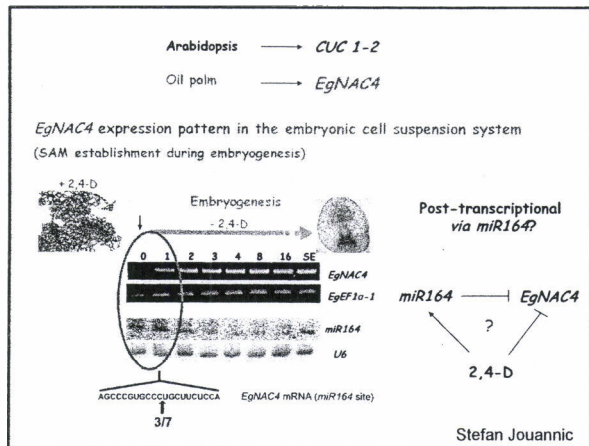
CUP SHAPED COTYLEDON 1-2 (CUC1-2) NAC domain TFs

Boundary establishment

Inhibition of cell proliferation and elongation



Stefan Jouannic



miR172 identified in Arabidopsis, maize, *N. Benthamiana*, rice, pine and fern.

Targets of *miR172* are AP2-like genes

Arabidopsis	AP2 TOE1 TOE2 TOE3	Flower development Flowering time Flowering time Flowering time
Maize	Glossy15 IDS1	Leaf development Meristem initiation and sex determination
<i>N. Benthamiana</i>	AP2	Flower development
Others	AP2-like	Unknown

Identify and study the expression of AP2-like and *miR172* during the initiation and the development of the inflorescence in palms

Helen Adam

- Project**
- Choice of material
 - Sample preparation for 454 sequencing
 - Bioinformatics tool development
 - Pyrosequencing/miRNA tools
 - Target mRNA identification
 - Precursor miRNAs
 - Validation of miRNA expression (spatial/temporal)
 - Validation of target cleavage
 - Exchanges for 2009-10?

- Project Exchange Plan**
- France funding (2009, 20,000€)
 - ✓ Support for Thai scientists and airfare for French scientists
 - ✓ 2x Thai scientists for 6 months
 - o French scientists to Thailand?
 - Possible Exchange Topics
 - Bioinformatics tools
 - RNA extractions and sequence sample preparations
 - pyrosequencing
 - qPCR profiling methodology for expression validations
 - in situ microscopy experiments
 - ??

PHC Program in higher Education and Research
Year 2009 - 2010

Project Title: Small RNA discovery in oil palm via 454
transcriptome sequencing

Thai side

Assoc. Prof. Dr. Apichart Vanavichit (KU)
Dr. Somvong Tragoonrungs (GI)
Dr. Sithichoke Tangphatsornunag (GI)
Dr. Chatchawan Jantasunyarat (KU)

French side

Dr. Timothy Tranbarger (IRD)
Dr. Fabienne Morcillo (CIRAD)
Dr. Xavier Argout (CIRAD)

Project Objectives:

- To apply high through-put sequencing technology towards the discovery of small RNAs involved in the regulation of the reproductive biology of oil palm.
- To develop of bioinformatics tools necessary to analyze large sets of data produced by pyrosequencing and to identify putative target genes regulated by small RNAs

Project Activities

- Small RNA isolation, library construction and 454 pyrosequencing
- Bioinformatics tool development for pyrosequencing based transcriptome and small RNA analysis

Scientific Exchanges

Tentative names of two 6-month visits for 2 junior Thai graduate students to France to conduct experiments.

Name	Affiliation	Research topics to be conducted in France
2009		
Mr. Chatree Saensuk	NCAB	Isolation of small RNAs and preparation for pyrosequencing
Mr. Supat Thongjuea	BIOTEC	Sequence processing and analyses pipelines to apply for the analysis of pyrosequencing based data
2010		
Mr. Chatree Saensuk	NCAB	Analysis of small RNA and mRNA pyrosequencing data and experimental validations
Mr. Supat Thongjuea	BIOTEC	Bioinformatics tool development to analyze the pyrosequencing data

Scientific Exchanges

Tentative names of two 6-month visits for 2 junior French researchers to Thailand to conduct experiments

Name	Affiliation	Research topics to be conducted in France
2009		
Dr. Adam Helenna	IRD	Pyrosequencing and sequence processing
Dr. Argout Xavier	CIRAD	Analyses pipelines to apply for the analysis of pyrosequencing based data
2010		
Dr. Adam Helenna	IRD	Analysis of pyrosequencing data and experimental validations
Dr. Argout Xavier	CIRAD	Bioinformatics tool development to analyze the pyrosequencing data

Workshops

- 2009
 - Workshop I in Bangkok
 - 4 senior scientists from France
- 2010
 - Workshop II in France
 - 4 senior scientists from Thailand

Work plan and timetable

Activity	2009				2010			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Joint Research								
(I) Small RNA isolation and sequencing	←	→	←	→				
(II) Bioinformatics tool development for pyrosequencing based transcriptome and small RNA analysis			←	→	←	→	←	→
Scientific Exchanges								
(I) 2009 Franco-Thai Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop I in Thailand (visit of 4 French scientists for 6 days)			→	→				
(II) 2010 Franco-Thai Oil Palm Pyrosequencing and Bioinformatics Research Workshop II in France (visit of 4 Thai scientists for 6 days)							→	→
(III) Four 6-month visit for Thai postgraduate students or junior scientists to France to conduct experiments.		← 2 persons →			← 2 persons →			
(IV) Four 6-month visit for French postgraduate students or junior scientists to Thailand to conduct experiments.			← 2 persons →			← 2 persons →		

Project Outputs

- 2 international publications
- 8 trained personnel
- 2 workshops to exchange information

**Annexe 6 : Effet de l'éthylène sur la chute des fruits
de palmier à huile en fonction de l'âge des fruits.**

20 MAI 2009

Ethylene Experiments Krabi 2009

