

**UNIVERSITE MONTPELLIER II**  
**CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES**  
**AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme de Doctorat

Ecole Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie,  
Géosciences, Hydrosociences, Environnement

Spécialité : Biologie Intégrative des Plantes

par

**Vincent LE GUEN**

**Exploration de la diversité des résistances génétiques à la maladie  
sud-américaine des feuilles de l'hévéa (*Microcyclus ulei*) par cartographie et  
génétique d'association au sein de populations naturelles**

le 12 décembre 2008

<b>J.L. Notteghem</b>	Professeur Supagro Montpellier	Président
<b>B. Courtois</b>	Chercheur	Directeur de thèse
<b>M. Manzanares-Dauleux</b>	Professeur Agrocampus ouest Rennes	Rapporteur
<b>C.E. Durel</b>	Chargé de recherche Inra Angers	Rapporteur
<b>M. Seguin</b>	Chercheur	Examineur invité

# Sommaire

<b>Remerciements</b>	1
<b>Préambule</b>	3
<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	7
1.1. L'espèce cultivée : <i>Hevea brasiliensis</i>	9
1.1.1. Généralités	9
1.1.2. La production de caoutchouc	13
1.1.3. L'amélioration génétique de l'hévéa	16
1.2. Le pathogène : <i>Microcyclus ulei</i>	20
1.3. La propagation des maladies cryptogamiques de grandes cultures	26
<b>Chapitre 2 : Nouveaux résultats concernant le cultivar RO 38</b>	33
Article 1 : Bypassing of a polygenic <i>Microcyclus ulei</i> resistance in rubber tree, analysed by QTL detection	35
Introduction	35
Materials and Methods	36
Results	38
Discussion	41
Conclusions et perspectives	46
<b>Chapitre 3 : Détection de nouveaux facteurs génétiques liés à une résistance durable au SALB chez le cultivar MDF 180</b>	49
3.1. Article 2 : Long lasting rubber tree resistance to <i>Microcyclus ulei</i> characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph	51
Introduction	51
Material and Methods	52
Results	53
Discussion	54
3.2. Cartographie de facteurs de résistance chez le cultivar MDF 180	57
3.2.1. Matériel et méthodes	57
3.2.1.1. Matériel végétal	57
3.2.1.2. Souches de <i>M. ulei</i>	58
3.2.1.3. Inoculations en conditions contrôlées	59
3.2.1.4. Observations de l'essai Combi 16 en conditions naturelles d'infestation	61
3.2.1.5. Lecture des symptômes	62
3.2.1.6. Extraction d'ADN	64
3.2.1.7. Analyse des marqueurs SSR	64
3.2.1.8. Tri des marqueurs microsatellites	66
3.2.1.9. Analyse des données	66
3.2.2. Résultats	67
3.2.2.1. Ségrégation des paramètres de résistance	67
3.2.2.2. Cartographie génétique de la descendance PB260 x MDF180	72
3.2.2.3. Cartographie de QTLs de résistance	77
3.3. Discussion générale chapitre 3	79
3.3.1. Description d'une nouvelle résistance de l'hévéa au SALB	79
3.3.2. Cartographie de QTLs de résistance	81
3.3.3. Universalité des locus identifiés	83

3.3.4. Adéquation aux modèles d'interaction hôte-pathogène	84
3.3.4.1. Rappel des principaux concepts	84
3.3.4.2. Quel modèle pour la résistance de MDF 180 ?	86
3.3.5. Applications à la SAM	87
3.3.6. Génétique d'association	87
<b>Chapitre 4 : Structuration de la diversité dans les populations sauvages d'<i>Hevea brasiliensis</i> d'Amazonie occidentale</b>	<b>89</b>
4.1. Article 3 : Genetic structure of Amazonian populations of <i>Hevea brasiliensis</i> assessed by SSR markers, and application to germplasm management	91
<i>Introduction</i>	93
<i>Materials and Methods</i>	95
<i>Results</i>	98
<i>Discussion</i>	99
<i>Tables</i>	108
<i>Figures</i>	111
4.2. Résultats complémentaires ne figurant pas dans l'article	114
4.3. Discussion	117
<b>Chapitre 5 : Etendue du déséquilibre de liaison au sein de populations naturelles et application à la détection de facteurs de résistance par étude d'association</b>	<b>121</b>
5.1. Matériel et méthodes	122
5.1.1. Matériel végétal	122
5.1.2. Extraction d'ADN	123
5.1.3. Marqueurs microsatellites	124
5.1.4. Marqueurs SNPs	125
5.1.5. Analyses statistiques	127
5.1.6. Phénotypage des accessions	130
5.2. Résultats	131
5.2.1. Déséquilibre de liaison entre marqueurs de g2 et g8	131
5.2.1.1. Déséquilibre de liaison génotypique	132
5.2.1.2. Réduction du nombre d'allèles	133
5.2.1.3. Déséquilibre de liaison haplotypique	135
5.2.2. Déséquilibre de liaison entre marqueurs de g15	137
5.2.3. Recherche d'association avec la résistance au SALB	140
5.2.3.1. Phénotypage en conditions naturelles d'infestation	140
5.2.3.2. Association marqueurs – paramètres de résistance	142
5.3. Discussion	146
5.3.1. Echantillon d'étude	146
5.3.2. Multiallélisme des microsatellites	147
5.3.3. Hétérozygotie des individus échantillonnés	149
5.3.4. Origine et intensité du déséquilibre de liaison des populations étudiées	150
5.3.5. Association avec des gènes de résistance au SALB	151
<b>Chapitre 6 : Conclusion, perspectives</b>	<b>155</b>
6.1. Rappel de l'ensemble des résultats acquis au cours de la thèse	155
6.2. Perspectives	158
6.2.1. A court terme	158
6.2.2. A long terme	160
<b>Références bibliographiques</b>	<b>165</b>

## **Remerciements**

*Je tiens en premier lieu à remercier Marc Seguin qui a été à l'origine de ce travail, qui m'a fait confiance pour le mener à bien, et dont la disponibilité a été constante tout au long de ces trois années.*

*Je remercie Brigitte Courtois qui a bien voulu diriger cette thèse et avec qui les conversations ont toujours été très enrichissantes.*

*Je remercie Charles Eric Durel et Maria Manzanara-Dauleux qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Jean-Loup Notteghem dont l'intérêt pour les maladies de l'hévéa ne se dément pas depuis de nombreuses années.*

*Cette thèse n'aurait pu être effectuée sans le concours efficace de tous les collègues de l'unité de service de Pointe-Combi dirigée par Jean-Louis Pradon: Christophe Couturier qui a joué un rôle essentiel dans la mise en place des dispositifs expérimentaux et qui m'a fait découvrir la forêt Guyanaise, Amélie Mabie, le meilleur greffeur d'hévéas de Guyane, Fragile Baguidy durement éprouvé au cours de ces derniers mois, Louis Masson dont la bonne parole nous a fréquemment éclairés, Sylvain Laurent, Henny Pansa, Joseph Sizo et Ilereste Cézaire.*

*Ce travail doit également beaucoup à Fabien Doaré pour les inoculations, la lecture des symptômes et les extractions d'ADN à Kourou, ainsi qu'à Virgile Condina pour les observations sur le terrain à Combi. Je les en remercie.*

*Je remercie Jean Guyot pour ses informations utiles en mycologie et phytopathologie, ainsi que toute sa famille pour l'hospitalité dont ils ont fait preuve à mon endroit.*

*A Montpellier, mes remerciements vont à Ronan Rivallan pour ses compétences, son dévouement envers tous les géotypeurs chevronnés ou néophytes et pour son endurance, Christelle Weber pour son aide précieuse et sa patience à mon égard, Maguy Rodier-Goud pour m'avoir fait profiter de son expérience en biologie moléculaire de l'hévéa, Valérie Pujade-Renaud pour m'avoir éclairé sur la génomique de l'hévéa.*

*Je ne saurais oublier tous les amis que j'ai connus sur les plantations brésiliennes et qui ont su me faire partager leur passion pour l'hévéa, et plus particulièrement Carlos Mattos (ainsi que Fabiana et Amandinha pour leur hospitalité), Bertrand Vignes, Eric Cavaloc et Cássio Scomparin.*

*Merci à toutes les personnes qui ont accepté de me prodiguer leurs conseils: Didier Tharreau, Agnès Doligez, Xavier Perrier, Jean-Louis Noyer.*

*Enfin je remercie Denis Lespinasse qui, avec Marc Seguin, a été le pionnier de la cartographie génétique de l'hévéa et avec qui les conversations, bien que trop peu fréquentes à mon goût, sont toujours un réel plaisir.*

## Préambule

La culture de l'hévéa s'est considérablement développée en Asie du sud-est depuis le début du XXème siècle et représentait, avec 9.23 millions de tonnes, 93% de la production mondiale de caoutchouc naturel en 2006. Toutefois si cette région du monde a su faire preuve d'un important dynamisme agricole au cours des dernières décennies, notamment en ce qui concerne la production de caoutchouc naturel (multipliée par 3.9 en 40 ans), il est probable que le développement futur de l'hévéaculture connaisse un rééquilibrage en faveur d'autres zones de production et notamment de l'Amérique Latine. L'Asie du sud-est deviendra en effet de plus en plus une région où s'accroîtra la pression sur les terres cultivables, en raison de la conjonction de plusieurs facteurs : forte densité de population humaine, possibilités limitées d'extension des terres agricoles au détriment des zones naturelles, concurrence entre cultures vivrières ou de rente. Plusieurs pays de cette région (Vietnam, Thaïlande, Chine) sont déjà contraints d'établir leurs nouveaux projets d'extension de l'hévéaculture dans des régions qui ne sont pas pourvues de conditions écologiques optimales pour la culture de l'hévéa : climat trop froid ou trop sec, acidité des sols. Par contraste, les régions équatoriales et tropicales du continent sud-américain sont caractérisées par une très faible densité de population, des superficies agricoles importantes, une moindre concurrence de la part de cultures de rente importantes comme le palmier à huile. Elles constituent donc un réservoir important de terres potentiellement disponibles pour la culture de l'hévéa

Cependant, la présence du parasite *Microcyclus ulei* dans toute la région intertropicale de l'Amérique Latine constitue un frein à l'expansion de l'hévéaculture. Ce champignon, responsable de la maladie connue sous le nom de South American Leaf Blight (SALB) est en effet à l'origine d'attaques foliaires qui, lorsqu'elles s'exercent sur des arbres de cultivars sensibles, peuvent par leur fréquence et leur intensité provoquer des défoliations partielles ou totales pouvant aller jusqu'à la mort des arbres. Les zones climatiquement les plus favorables à la culture de l'hévéa sont également celles où le SALB rencontre les conditions les plus propices à son développement épidémique, et il n'est alors possible de cultiver dans de telles régions que des cultivars résistants, généralement de productivité médiocre. Les cultivars les plus productifs, la plupart du temps très sensibles au SALB, ne peuvent être cultivés que dans des régions dites d'esquive, où les conditions climatiques ne permettent pas un

développement épidémique important. En contrepartie, ces conditions climatiques en zone d'esquive limitent également le potentiel productif des cultivars élite qui y sont plantés.

L'obtention de cultivars à la fois résistants au SALB et avec un fort potentiel de production est donc un objectif important de la sélection variétale de l'hévéa pour tous les pays américains producteurs de caoutchouc naturel. Le SALB, originaire comme l'hévéa du bassin amazonien, ne s'est pas jusqu'ici propagé en dehors du continent américain, où il est endémique partout où se pratique la culture de l'hévéa, depuis l'état de São Paulo au sud du Brésil, jusqu'au sud du Mexique. Sa présence dans les zones de forte production de caoutchouc d'Asie et d'Afrique n'a encore jamais été mentionnée, mais cette éventualité représente une véritable épée de Damoclès dans la mesure où les cultivars hautement productifs plantés dans ces régions sont sans exception très sensibles au SALB. L'obtention de cultivars résistants et productifs est donc un objectif qui intéresse également ces régions encore indemnes de SALB, afin d'anticiper une éventuelle extension de l'aire de répartition du parasite.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse visent à identifier de nouveaux facteurs de résistance dans les ressources génétiques actuellement disponibles afin de les utiliser dans les programmes d'amélioration génétique.

Après une présentation de l'état des connaissances dans ce domaine au démarrage de nos travaux, le présent document est divisé en quatre grands chapitres.

- Nouveaux résultats concernant le cultivar RO 38. Une réinterprétation du type de résistance présentée par ce cultivar, sur la base d'un article paru en janvier 2007 dans la revue *New Phytologist*.
- Détection de nouveaux facteurs génétiques liés à une résistance durable au SALB chez le cultivar MDF 180.
- Structuration de la diversité au sein de populations amazoniennes provenant de différentes prospections représentées dans une collection ex situ en Guyane.
- Etendue du déséquilibre de liaison au sein de populations naturelles et application à la détection de facteurs de résistance par étude d'association

Ces quatre parties sont suivies d'un chapitre de conclusion et perspectives.

L'ensemble des travaux décrits dans cette thèse a été réalisé dans les installations du Cirad, à Montpellier et sur deux sites expérimentaux en Guyane. Il sera souvent fait référence dans la suite de ce document à ces trois localisations, aussi nous présentons succinctement ci-dessous leurs caractéristiques ainsi que le type d'activité qui y a été conduit.

- A Montpellier dans les laboratoires de l'UMR Développement et Amélioration des Plantes ont été menées toutes les activités de génétique moléculaire et d'interprétation des résultats. Le génotypage (préparation des plaques, PCR, migration, lecture automatisée et analyse des gels), a été réalisé sur le plateau de robotique et génotypage du Groupement d'Intérêt Scientifique Montpellier Languedoc-Roussillon Genopole®.
- La station expérimentale de Combi en Guyane est située sur la commune de Sinnamary. Elle comprend une pépinière permettant la multiplication clonale (semis de porte-greffe, réception de bois de greffe, greffage, transfert de matériel végétal), ainsi que des superficies expérimentales situées en zone de forêt primaire utilisées pour l'établissement de collections *ex-situ*, d'essais variétaux, d'essais de descendance, d'essais épidémiologiques. Cette station est située dans la zone de répartition naturelle du genre *Hevea*, et du champignon *Microcyclus ulei*.
- Le principal centre de recherche du Cirad en Guyane est situé à Kourou. Parmi d'autres équipements, se trouve un laboratoire de phytopathologie permettant l'isolement de souches de champignon, leur culture *in vitro*, leur stockage. C'est dans ce laboratoire que sont également effectuées les lectures de symptômes sur feuilles ainsi que l'extraction d'ADN à partir d'échantillons foliaires. Ce centre comporte également des serres où sont entreposées provisoirement les plants d'hévéa destinés à être inoculés, ainsi qu'une enceinte climatique (désignée généralement dans la suite du document comme « chambre d'inoculation »), au sein de laquelle les conditions d'éclairement, de température et d'humidité sont optimales pour le développement de *M. ulei* sur feuilles non détachées.

## Chapitre 1 - Introduction

Les interactions entre un parasite et sa plante hôte s'apparentent la plupart du temps à une perpétuelle course aux armements (Stahl & Bishop 2000). Par sélection alternée de formes génétiques mieux adaptées, résistance renforcée chez l'hôte et contournement de cette résistance chez le pathogène, et par leur diffusion au sein de leurs populations respectives, s'entretient une coévolution entre les deux acteurs du pathosystème. Tout retard pris par un des acteurs dans cette course incessante est rapidement sanctionné par une perte de capacité adaptative préjudiciable à la survie des populations concernées. C'est la fameuse métaphore de la Reine Rouge développée par Van Valen (1973) pour rendre compte de la nécessité pour les êtres vivants d'évoluer sans cesse afin de conserver leur degré d'adaptation à leur environnement.

Le cas des pathosystèmes impliquant un hôte pérenne à long cycle complique sensiblement l'équilibre coévolutif dans la mesure où la rapidité d'évolution du parasite est généralement largement supérieure à celle de l'hôte, et lui confère donc un avantage certain. Cet écueil peut toutefois être surmonté dans des populations naturelles par la grande diversité génétique de l'hôte, ainsi que par sa faible densité de peuplement ne permettant pas au parasite de proliférer au point de mettre en péril la survie de l'hôte. Le cas des plantes pérennes cultivées où l'on rencontre fréquemment des densités élevées de peuplements génétiquement très homogènes est encore bien plus complexe : toutes les conditions semblent alors réunies pour que le pathosystème soit complètement déséquilibré en faveur du pathogène et aboutisse à des épidémies dévastatrices. C'est ce qui explique vraisemblablement les échecs ayant accompagné les premières tentatives de plantation d'hévéas à grande échelle sur le continent Sud-Américain : des variétés hautement sensibles ou perdant rapidement leur résistance, plantées à forte densité et mises en présence d'un pathogène destructeur et à forte capacité d'adaptation, *Microcyclus ulei*. Tout concourait à ce que ces premières plantations se soldent par d'importantes pertes (Dean 1987). Et pourtant, plus de 70 ans après ces premières tentatives, des plantations d'hévéas arrivent à croître dans des régions fortement infestées par *M. ulei*, même si ces plantations n'ont pas les performances qu'on en attendrait dans d'autres régions du monde exemptes de maladies majeures de l'hévéa. Il existe donc chez l'espèce

*Hevea brasiliensis* ou chez des espèces apparentées des résistances possédant une certaine efficacité vis-à-vis des attaques de *M. ulei*.

Pour reprendre la métaphore guerrière de la course aux armements, le rééquilibrage des forces en faveur de l'hévéa nécessite d'une part une meilleure connaissance de l'ennemi, et d'autre part la possibilité pour l'hévéa d'avoir recours à de nouvelles armes défensives ayant fait leur preuve sur d'autres champs de bataille, d'être capable de changer ces armes en fonction de l'évolution de l'armement de l'adversaire, et au besoin de cumuler ces différentes armes en un même lieu. En d'autres termes plus pacifiques, deux axes d'études sont essentiels et doivent être menés concomitamment :

- Une meilleure connaissance de *M. ulei*, son développement épidémique, la biologie du cycle du champignon, la diversité génétique et la variabilité des populations, les mécanismes de virulence.
- L'identification chez *Hevea spp.* de formes variées de résistance, des mécanismes mis en œuvre dans les interactions avec *M. ulei*, pour une intégration de ces résistances dans des génotypes performants et la gestion des résistances à l'échelle des peuplements.

La présente étude concerne uniquement le deuxième axe présenté ci-dessus, et principalement l'identification chez *H. brasiliensis* de formes nouvelles de résistance à *M. ulei*. Dans un premier temps sera soulignée la fragilité de la seule source de résistance décrite jusqu'à présent. Nous chercherons ensuite à caractériser une nouvelle résistance par l'étude de la descendance en ségrégation d'un génotype particulièrement performant. Enfin nous évaluerons la possibilité d'identifier par génétique d'association d'autres allèles de résistance au sein de populations sauvages apparentées à celle dont provient le génotype performant évoqué ci-dessus.

Plusieurs thèses de doctorat ont été soutenues au cours des vingt dernières années sur la thématique globale de la génétique de l'hévéa et de l'interaction *Microcyclus ulei* / *Hevea sp* : composants de la résistance en conditions naturelles et contrôlées (Rivano 1992), identification de clones et analyse de la diversité de l'hévéa (Besse 1993), aspects histologiques et biochimiques de la résistance (Garcia 1995), cartographie génétique de l'hévéa et déterminisme génétique de la résistance (Lespinasse 1999), et épidémiologie à petite échelle en milieu amazonien (Guyot 2007). Ces documents contiennent tous des synthèses bibliographiques très complètes sur l'historique de la production de caoutchouc

naturel à partir de l'espèce *Hevea brasiliensis*, depuis l'exploitation d'arbres sauvages en forêt amazonienne jusqu'aux plantations modernes d'Asie et d'Afrique, ainsi que sur les premières identifications de *Microcyclus ulei*, et les mesures adoptées en Amérique Latine pour tenter de résoudre le problème causé par cette maladie dans la culture de l'hévéa. Nous ne reviendrons pas ici sur cet aspect historique. Cette partie se limitera donc à la présentation des informations nécessaires à la compréhension des chapitres suivants, c'est-à-dire : une présentation de l'espèce *Hevea brasiliensis* ainsi que celle du champignon *Microcyclus ulei*. Une revue de quelques exemples de dissémination de pathogènes sera également proposée, afin de replacer cette étude dans le contexte agro-économique de la culture de l'hévéa. Enfin, une partie sera consacrée aux études antérieures de diversité et de déséquilibre de liaison de diverses espèces pérennes.

## **1.1. L'espèce cultivée : *Hevea brasiliensis***

### **1.1.1. Généralités**

Le genre *Hevea* appartient selon la classification phylogénétique à l'ordre des *Malpighiales* et à la famille des *Euphorbiaceae*. La revue taxonomique la plus récente, éditée par Schultes (1990), fait état de dix espèces dont trois comportent en outre plusieurs sous-espèces. L'aire de répartition naturelle du genre *Hevea* s'étend sur une grande superficie de l'Amazonie au sens large (bassins de l'Amazone et de l'Orénoque, plateau des Guyanes) recouvrant les états de Bolivie, Brésil, Colombie, Equateur, Guyana, Guyane Française, Pérou, Surinam et Venezuela. La plus vaste répartition est celle de l'espèce *H. guianensis* (Figure 1.1). Dans les zones de recouvrement entre aires de répartition des espèces (cas de *H. brasiliensis*, *H. guianensis*, *H. pauciflora* et *H. benthamiana* en Amazonie occidentale), peuvent se rencontrer des hybrides interspécifiques spontanés et fertiles (Seibert 1947). Il existe donc un continuum de flux génique sur l'ensemble du genre *Hevea* qui constitue le pool génétique primaire de l'espèce cultivée.

Cette possibilité d'hybridation entre espèces apparentées a fréquemment été mise à profit par les sélectionneurs afin de tenter d'introgesser dans l'espèce cultivée *H. brasiliensis* des caractères d'intérêt provenant d'autres espèces, et notamment la résistance au SALB (Gonçalves 1968 ; Pinheiro et al. 1984 ; Junqueira et al. 1990 ; Lespinasse et al. 2000b ; Priyadarshan & Gonçalves 2003 ; Le Guen et al. 2003).

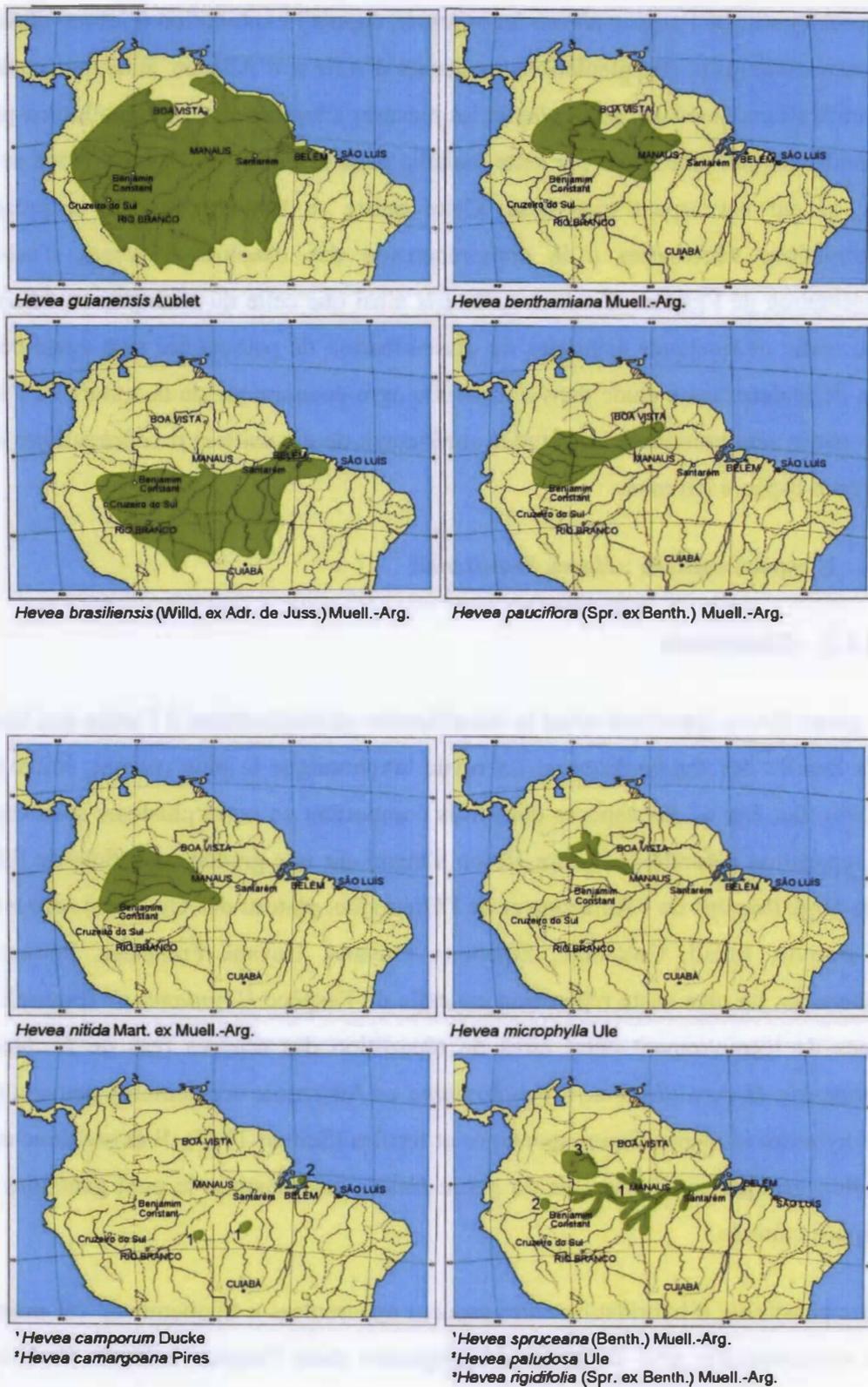


Figure 1.1. Aires de répartition des différentes espèces du genre *Hevea* (d'après Priyadarshan & Gonçalves 2003)

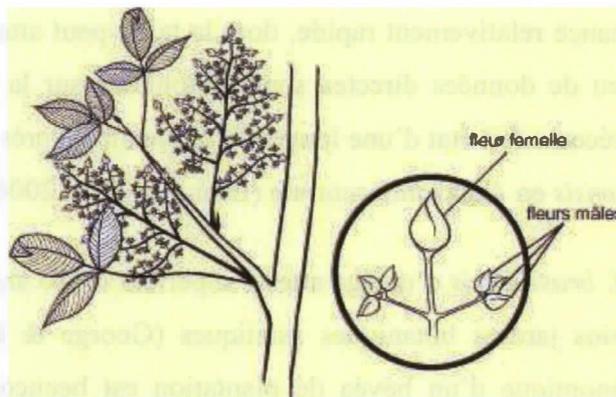
L'hévéa est un arbre à croissance relativement rapide, dont la taille peut atteindre 40 m dans les peuplements naturels. Peu de données directes sont disponibles sur la longévité de *H. brasiliensis*, mais une étude récente fait état d'une longévité moyenne de près de 300 ans chez l'espèce apparentée *H. guianensis* en Amazonie centrale (Laurance et al. 2004).

Des spécimens de l'espèce *H. brasiliensis* d'un âge attesté supérieur à 120 ans sont également toujours présents dans certains jardins botaniques asiatiques (George & Kuruvilla Jacob, 2000). La durée de vie économique d'un hévéa de plantation est beaucoup plus limitée, n'excédant généralement pas 35 ans, âge auquel les arbres sont abattus pour procéder à un nouveau planting. La circonférence du tronc peut atteindre couramment 3m pour les arbres de forêt les plus âgés. En plantation, le développement des arbres est fortement diminué en hauteur et en circonférence du fait du traumatisme engendré par la saignée pratiquée régulièrement (Gohet 1996).

L'hévéa adulte perd ses feuilles et les renouvelle chaque année, le plus souvent de façon synchrone sur un même arbre. Les feuilles nouvellement émises sont groupées en unités de croissances à l'extrémité des rameaux, constituées chacune d'une quinzaine de feuilles. Les feuilles sont formées de 3 folioles à l'extrémité d'un pétiole.

La floraison est déclenchée par une forte intensité de rayonnement solaire (Yeang 2007) et peut survenir une à deux fois par an en fonction de la latitude. L'hévéa est monoïque, les fleurs mâles et femelles de petite taille (4mm en moyenne) sont distinctes et groupées en inflorescences en forme de grappes (Figure 1.2.). Les fleurs femelles, moins nombreuses que les mâles, sont disposées à l'extrémité des axes primaires et secondaires de l'inflorescence. Sur une inflorescence donnée, les fleurs mâles arrivent à maturité avant les fleurs femelles (protandrie). Il peut cependant y avoir chevauchement des floraisons mâles et femelles sur un même arbre et donc possibilité d'autofécondation, phénomène encore accentué dans les plantations en parcelles monoclonales. Qu'elles soient pollinisées naturellement ou manuellement, les fleurs femelles fécondées ne donneront des fruits que dans environ 3% des cas (Leconte 1984; Webster & Baulkwill 1989).

Les fruits arrivent à maturité environ 5 mois après la floraison. Ce sont des capsules à trois loges contenant chacune une graine. A maturité, la coque du fruit éclate en suivant des fentes de déhiscence situées sur chacune des loges, ce qui provoque l'expulsion des graines sur plusieurs dizaines de mètres autour des arbres.

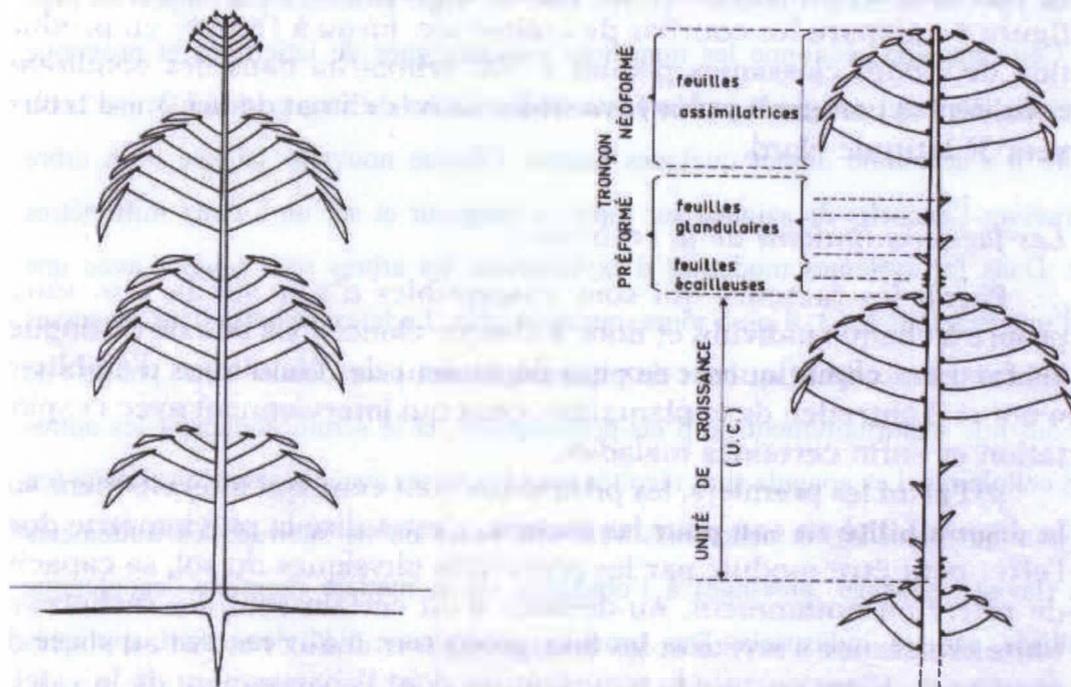


**Figure 1.2.** Fleurs d'hévéa (<http://www.genagro.org/hevearepro.htm>)

Les graines d'hévéa perdent leur pouvoir germinatif rapidement ce qui limite leur possibilité de dissémination tant naturelle que par intervention humaine.

La croissance des rameaux est discontinue et se caractérise par une période d'élongation rapide au cours de laquelle l'ensemble du verticille foliaire est émis, suivie d'une période de repos correspondant à la maturation des feuilles (Figure 1.3.). Chez les jeunes plants l'élongation des rameaux dure 2 à 3 semaines, et la période de repos également. Une nouvelle unité de croissance est donc émise toutes les 6 semaines environ.

Les variétés cultivées en plantation sont principalement des clones obtenus par greffage en écusson sur des porte-greffes issus de graines. Le clone de greffe est également le procédé universellement utilisé pour la conservation de génotypes en collections *ex-situ*. Il est à noter que bien que l'on parle de clones, seule la partie aérienne tronc/couronne est clonale, le système racinaire étant pour sa part génétiquement unique pour chaque arbre. En Indonésie, des variétés populations, constituées d'arbres issus de graine ou "seedlings", sont encore exploitées, mais ce type de formule variétale tend à disparaître.



**Figure 1.3.** Etages foliaires d'un jeune hévéa, et disposition des verticilles foliaires (d'après Combe & Plessix 1974)

### 1.1.2. La production de caoutchouc

Nous aborderons ici quelques aspects agro-économiques de la production de caoutchouc, dont la connaissance est indispensable à la compréhension des contraintes particulières des programmes d'amélioration génétique de l'hévéa. Les informations reprises ici proviennent essentiellement de Compagnon (1986).

Le produit récolté dans une plantation d'hévéa est le latex, obtenu par saignée des arbres. Ce latex est produit dans des cellules spécialisées appelées laticifères organisées entre le cambium et l'écorce en manchons concentriques. Les laticifères d'un même manchon s'anastomosent entre eux pour former un réseau continu (syncytium). Le latex est un cytoplasme cellulaire comportant plusieurs types d'organites et de particules dont majoritairement des particules de caoutchouc qui représentent plus de 90% de la matière sèche. Ces particules sont constituées d'un polymère, le  $\beta$  cis-polyisoprène en suspension colloïdale dans le latex. Le latex est un produit du métabolisme secondaire, dont la synthèse par l'arbre a un coût énergétique non négligeable, mais dont le rôle biologique est mal identifié.

La saignée de l'hévéa consiste à inciser l'écorce avec un angle prononcé par rapport au plan horizontal. Cette incision sectionne les manchons concentriques de laticifères et provoque l'écoulement du latex qui est guidé par la pente de l'encoche de saignée jusqu'à une tasse dans laquelle il s'accumule durant quelques heures. Chaque nouvelle saignée d'un arbre consiste à raviver l'encoche de saignée sur toute sa longueur et sur un à deux millimètres d'épaisseur. Dans les systèmes modernes d'exploitation, les arbres sont saignés avec une fréquence d'une fois tous les 3, 4 ou 5 jours, rarement plus. Le latex recueilli dans les tasses de saignée (Photo 1.1.) coagule au bout de plusieurs heures pour donner deux phases : le coagulum constitué majoritairement de  $\beta$  cis-polyisoprène, et le sérum contenant les autres constituants cellulaires. Les coagula sont récoltés dans les tasses avant la saignée suivante (en général le jour qui précède), et acheminés vers une usine où ils subiront les traitements nécessaires (lavage, séchage, pressage) à l'obtention de la matière première "caoutchouc naturel" utilisée par les industriels. Des produits générateurs d'éthylène sont appliqués régulièrement sur l'encoche de saignée afin de stimuler la production de latex et optimiser la production par rapport au rythme de saignée.



Photo 1.1. Ecoulement du latex dans la tasse de saignée

Afin de ne pas compromettre leur développement végétatif futur, les hévéas ne sont saignés qu'une fois que leur tronc a atteint une circonférence minimale. En pratique, on ne commence donc à saigner une parcelle que lorsqu'un certain nombre d'arbres ont atteint cette valeur

minimale. Un seuil couramment admis est que 50% des arbres mesurent au moins 50cm de circonférence à 1m au-dessus du sol. L'âge auquel une parcelle atteint cette valeur dépend du clone planté, mais est aussi fortement dépendant des conditions de culture : fertilité du sol, régime hydrique, température moyenne, entretien de la parcelle. Il varie généralement entre 5 années après le planting au champ et 10 années dans les situations les plus défavorables. Une fois mis en saignée, les arbres sont exploités en continu tout au long de leur vie utile, avec toutefois des périodes de repos annuelles de quelques semaines correspondant à la saison de chute des feuilles et de refoliation (généralement en saison sèche). La saignée est généralement pratiquée sur la demi-circonférence du tronc et l'incision est toujours dans le même sens : du point haut à gauche au point bas à droite lorsqu'on regarde l'arbre. On parle de saignée en "demi-spirale". La partie du tronc soumise à la saignée (appelée le panneau d'exploitation) alterne généralement d'une année sur l'autre selon un plan d'exploitation préétabli (Photo 1.2.) permettant d'optimiser la productivité des arbres sur l'ensemble de leur vie utile.



Photo 1.2. Panneaux de saignée d'hévéa

Sur une parcelle généralement plantée à une densité avoisinant les 500 arbres par hectare, tous les arbres ne sont pas producteurs. Bien que les variétés plantées soient des clones, il existe des interactions génotype/environnement au niveau individuel dues à des modifications très localisées du milieu et à la nature non clonale du porte-greffe. Il arrive donc que certains arbres n'atteignent jamais le développement végétatif suffisant pour être mis en saignée. Par

la suite, un arbre peut cesser temporairement ou définitivement de produire du latex en raison de stress biotiques ou abiotiques (on parle alors d'arbre "sec"). Des dommages causés à son écorce peuvent aussi empêcher la saignée. Enfin, des accidents (vents violents, attaques de parasites ou de ravageurs) peuvent entraîner la mort des arbres. Le peuplement productif d'une parcelle a donc tendance à décroître au cours des années d'exploitation. Le rendement en caoutchouc par arbre, faible chez les jeunes arbres, augmente fortement par la suite et peut se stabiliser à des niveaux assez élevés mais qui peuvent varier fortement d'une année sur l'autre en fonction de l'état physiologique des arbres, des conditions météorologiques, du panneau de saignée en cours d'exploitation, de la qualité de l'écorce exploitée (vierge ou régénérée). La rentabilité économique d'une parcelle dépend donc de la productivité moyenne à l'arbre, ainsi que de la densité de peuplement qui conditionne à la fois le rendement en caoutchouc par hectare et le coût de la récolte (un faible peuplement est plus coûteux à exploiter en raison des trajets plus importants entre arbres productifs). En vieillissant, la production d'une parcelle finit par devenir insuffisante par rapport à son coût d'exploitation, généralement après 25 à 30 années de saignée. La parcelle est alors abattue puis replantée avec un clone apportant un progrès génétique par rapport à celui qui a été éliminé.

### **1.1.3. L'amélioration génétique de l'hévéa**

La difficulté de l'amélioration génétique de l'hévéa tient à la fois à la durée et à la superficie nécessaires à l'évaluation de nouveaux génotypes, et au faible taux de succès des pollinisations contrôlées.

Ainsi qu'il a été décrit à la section précédente, la vie économique d'une parcelle d'hévéas se poursuit fréquemment au-delà de 30 ans après sa mise en place (5 à 10 années improductives suivies de 25 à 30 années d'exploitation). Au cours de cette longue période les arbres passent par différentes phases de leur développement qui peuvent modifier plus ou moins fortement la productivité de la parcelle, de façon temporaire mais parfois aussi définitive. Il existe ainsi des "typologies clonales" de production caractérisées pour certains clones par une forte production dès le jeune âge, mais qui diminue fortement au bout de quelques années (clones dits "quick starter"), pour d'autres clones par une augmentation lente de la production mais pour atteindre après plusieurs années des plateaux élevés de production ("slow starter") ; il existe des clones ayant besoin d'une importante stimulation afin d'exprimer tout leur potentiel

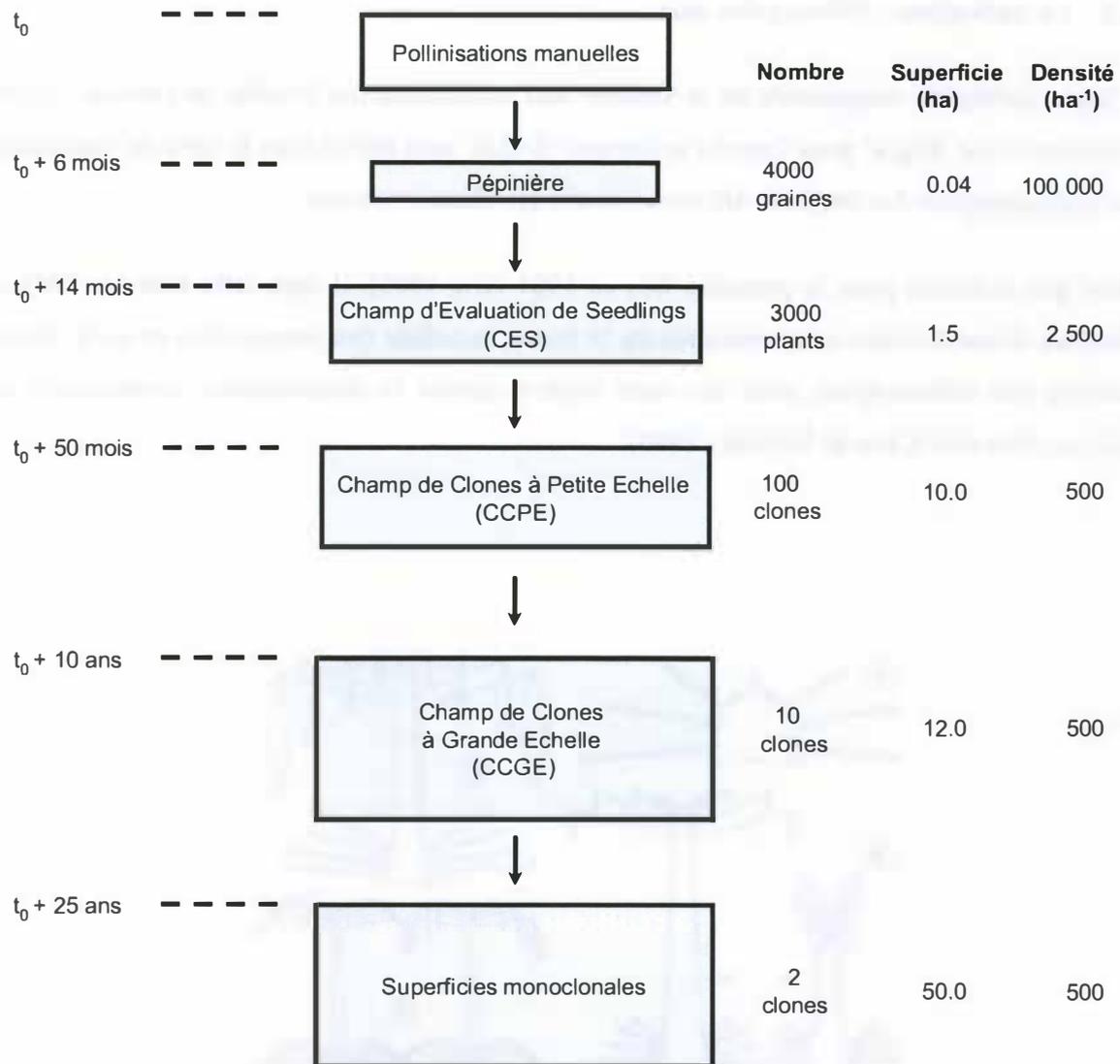
de production alors que pour d'autres une stimulation excessive entraîne une surexploitation physiologique et un arrêt de l'écoulement du latex ; l'architecture de certains clones les rend particulièrement sensibles aux vents violents à partir d'un certain âge mais pas avant ; d'autres sont sensibles aux attaques de parasite dans le jeune âge mais plus du tout à l'âge adulte etc. Pour toutes ces raisons il ne paraît pas possible de se prononcer sur la valeur d'un nouveau clone en cours de sélection avant de l'avoir observé suffisamment longtemps.

Pour des considérations similaires, la superficie nécessaire à l'évaluation clonale ne saurait être trop restreinte, au risque de voir cette évaluation perturbée par des effets de bordure, de compétition entre arbres de clones différents, au risque également de ne pas déceler des particularités générées par l'homogénéité clonale d'un peuplement comme la sensibilité à la casse au vent.

Enfin, troisième obstacle à l'amélioration génétique, la faible réussite des programmes de croisements. Que ce soit à la suite d'une pollinisation naturelle ou effectuée manuellement, la fécondation de l'ovule est suivie dans 70% à 100% des cas par l'abscission de la fleur femelle moins de 15 jours après la pollinisation (Leconte 1984). Ce phénomène, assez fréquent chez les fruits tropicaux, n'a pas été élucidé, et rend difficile voire impossible la réalisation de certains croisements. Les centres de recherche en amélioration génétique de l'hévéa sont généralement situés dans des régions où il existe une saison de forte floraison qui peut durer de 4 à 5 semaines en fonction de la diversité des clones qui y sont présents. Cela présente l'avantage de pouvoir regrouper les activités liées à la production de croisements au cours d'une "campagne de pollinisation" limitée dans le temps. Au cours d'une telle campagne, une personne peut difficilement polliniser plus de 150 à 200 fleurs par jour en raison de la pénibilité de ce travail (en plein soleil, présence de moustiques, souvent sur une échelle ou un échafaudage), et de l'attention nécessaire à la manipulation des petites pièces florales de l'hévéa. Avec un taux de réussite voisin de 3% (3 fruits, donc 9 graines pour 100 fleurs fécondées), ce sont donc entre 300 et 400 graines qui seront produites par une personne au cours d'une campagne.

Ces trois contraintes majeures ont conduit les généticiens et améliorateurs de l'hévéa travaillant dans divers centres de recherche à opter pour un schéma convergent schématisé dans la Figure 1.4. Cette figure, qui comporte des ordres de grandeur standard, appelle les quelques commentaires suivants :

- Pépinière : Cette phase sert uniquement à assurer la germination et la croissance des jeunes plantules dans de bonnes conditions. Aucun tri n'est effectué à ce stade.
- Champ d'évaluation de Seedlings (CES) : Les arbres sont regroupés en parcelles familiales homogènes. Les effectifs par famille peuvent être très hétérogènes, en fonction des résultats de la campagne de pollinisation. Un choix portant sur les valeurs familiales est effectué à l'issue de cette phase qui peut durer entre 2 et 3 ans. Les critères de choix sont le développement végétatif, la production précoce, le comportement face aux maladies.
- Champ de clones à petite échelle (CCPE) : Ce type d'expérimentation comporte des répétitions de parcelles élémentaires de petite taille (par exemple 4 répétitions x 12 arbres). L'essai peut également être structuré en familles de clones plein-frères pour affiner l'appréciation de la valeur génétique de chaque famille. Les critères de choix sont la croissance, l'architecture de la couronne, la production sans et avec stimulation, la sensibilité aux maladies, l'observation éventuelle d'anomalies. Cette phase est la première opportunité d'observer le comportement clonal d'un génotype particulier. Elle est donc primordiale.
- Champ de clones à grande échelle (CCGE) : Il s'agit de la mise en expérimentation en vraie grandeur des clones retenus à l'issue du CCPE. Cette phase doit durer suffisamment longtemps pour pouvoir évaluer le pourcentage de gain génétique des clones retenus par rapport aux clones témoins. Elle doit donc prendre en compte un certain nombre d'années de production stabilisée à l'âge adulte, et permettre l'observation au niveau local des interactions clones/environnement. Les clones retenus à l'issue de cette phase peuvent être testés en superficies monoclonales de grande taille, ou bien être directement recommandés pour des premières plantations industrielles en réseau multilocal.



**Figure 1.4.** Schéma d'amélioration génétique de l'hévéa

Ce schéma de base de sélection de l'hévéa est conçu dans le cadre général d'une amélioration pour le rendement en caoutchouc en l'absence de contraintes biotiques fortes telles que des pressions parasitaires majeures. La prise en compte dans un tel schéma d'un critère de résistance à un parasite comme *M. ulei* complique notablement l'ensemble, notamment par la nécessité de mise au point de tests fiables et prédictifs de la durabilité des résistances détectées.

## 1.2. Le pathogène : *Microcyclus ulei*

L'agent pathogène responsable de la Maladie Sud Américaine des Feuilles de l'hévéa ('South American Leaf Blight' pour lequel l'acronyme 'SALB' sera utilisé dans la suite du document) est le champignon Ascomycète *Microcyclus ulei* (P. Henn.) von.Arx.

Bien que collectée pour la première fois en 1901 (Ule 1905), il aura fallu attendre 1983 et diverses dénominations intermédiaires de la forme conidiale (ou anamorphe) et de la forme parfaite (ou téléomorphe) pour que cette espèce reçoive la dénomination consensuelle de *Microcyclus ulei* (Chee & Holliday 1986).

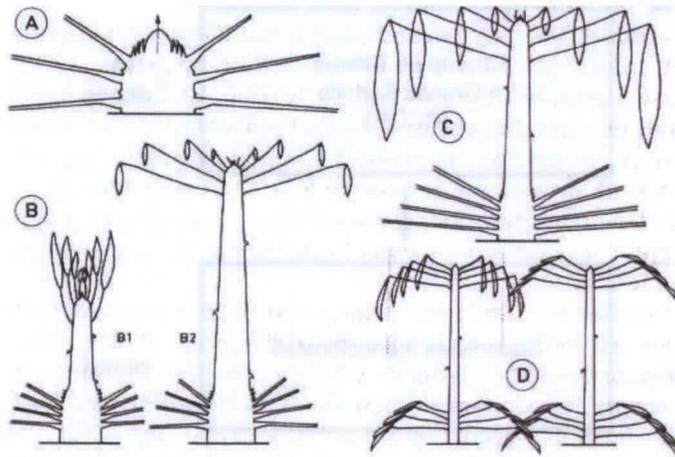


Figure 1.5. Stades foliaires de l'hévéa d'après Hallé & Martin (1968)



Photo 1.3. Stade B2 de développement foliaire, propice à l'infection par *M. ulei*

En conditions naturelles, l'infection se produit sur les jeunes feuilles des unités de croissance non encore mûres, aux stades B1 à C (Hallé & Martin 1968) (Figure 1.5. et Photo 1.3.). Quatre à cinq jours après l'infection, commencent à apparaître des lésions sur la face inférieure des folioles. Ces lésions se couvrent au bout de dix à douze jours de conidiophores qui libèrent à leur extrémité des conidiospores (ou conidies) qui assurent la multiplication non sexuée du champignon. Ces conidies sont de petites propagules bi-cellulées et cloisonnées d'environ 50µm de longueur, en forme caractéristique de massue (Photo 1.4.). Elles peuvent être produites en très grand nombre et contribuent au développement épidémique de la maladie (Photo 1.5.).

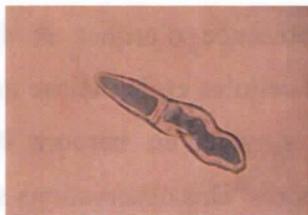


Photo 1.4. Conidie de *M. ulei* au microscope photonique



Photo 1.5. Abondante sporulation conidienne

Les feuilles infectées sont couvertes de lésions dont la taille et le nombre dépendent à la fois du degré de résistance de l'arbre et de la pression parasitaire (quantité d'inoculum). Ces lésions diminuent la surface photosynthétique utile de la feuille et peuvent provoquer des déformations importantes du limbe (Photos 1.6. et 1.7.). Les attaques les plus sévères peuvent

se traduire par des chutes de folioles et de feuilles, voire des défoliations de rameaux entiers ou des arbres dans leur ensemble (Photo 1.8.). La défoliation complète d'un arbre est suivie généralement par une émission générale de nouvelles unités de croissance dont les jeunes feuilles sont à nouveau attaquées par le SALB si les conditions climatiques le permettent. Un cycle de défoliations - refoliations répétées se met alors en place qui épuise les arbres, leur confère un aspect chétif, et peut provoquer leur mort en quelques mois ou quelques années.

Lorsqu'une feuille attaquée se maintient sur le rameau, apparaissent après quelques semaines en bordure des lésions et sur la face supérieure des folioles, de petites excroissances noires appelées stromas (Photo 1.9.). Ces stromas sont constitués de périthèces au sein desquels se forment les asques contenant chacun huit ascospores. Il s'agit donc de l'organe de reproduction de *M. ulei*, siège de la fusion des cellules sexuelles, suivie de la méiose qui produit les ascospores haploïdes. La présence d'asques et d'ascospores est facilement observable, mais les étapes de fusion des cellules et de méiose qui la précèdent n'ont jamais été décrites. De plus, la présence de stromas en bordure des lésions n'implique pas nécessairement celle d'asques et d'ascospores. Des observations systématiques pratiquées sur les stromas ont montré (Guyot 2008) qu'une proportion importante ne contient pas d'ascospores. Les mécanismes impliqués dans la présence ou non d'asques et d'ascospores dans les stromas n'ont pas été élucidés.

Comme pour un grand nombre de champignons, *M. ulei* a besoin pour se développer de conditions assez précises de température et d'humidité. En conditions contrôlées d'inoculation de la maladie, le meilleur développement est obtenu en maintenant les plants en humidité relative supérieure à 90% et à 24°C (Rivano 1992 ; Gasparotto & Junqueira 1994). Les études épidémiologiques menées récemment en Guyane en conditions naturelles (Guyot 2008) révèlent que le facteur le plus important pour l'inoculation et le développement de *M. ulei* est la durée quotidienne d'humectation des feuilles.



Photo 1.6. Face inférieure d'une feuille d'hévéa couverte de lésions de *M. ulei*



Photo 1.7. Etage foliaire d'un jeune plant fortement attaqué par le SALB



Photo 1.8. Arbres défoliés par une attaque de SALB (Guyane)



Photo 1.9. Stromas sur la face supérieure d'une feuille

Aucune étude n'a encore porté sur la diversité génétique de *M. ulei*, bien que des marqueurs microsatellites polymorphes aient été définis (Le Guen et al. 2004). La diversité du pouvoir pathogène a en revanche fait l'objet de nombreux travaux (Chee et al. 1986 ; Junqueira et al. 1986a ; Hashim & Almeida 1987 ; Junqueira et al. 1988 ; Rivano 1997 ; Mattos et al. 2003). Ces travaux, généralement menés en conditions contrôlées, ont pour objectif de déterminer les différences de virulence et d'agressivité entre races du pathogène.

Dans la suite de ce chapitre et du document, nous utiliserons le terme virulence selon la définition suivante proposée par Shaner et al. (1992): "*the genetic ability of a pathogen race to overcome genetically determined host resistance, which is effective against other races of that pathogen, and cause a compatible (disease) interaction*". De même, nous utiliserons le terme agressivité selon une des définitions proposées par les mêmes auteurs : "*a property of the pathogen reflecting the relative amount of damage caused to the host without regard to resistance genes*".

Dans le cas du pathosystème *Microcyclus/Hevea*, la détermination des différences de virulence et d'agressivité entre races s'effectue en pratiquant en conditions contrôlées des inoculations sur des plants appartenant à des clones qui manifestent des différences d'interaction compatible et de sévérité des symptômes. Un ensemble de clones d'hévéa utilisés pour mettre en évidence ces différences constitue une "gamme hôte" différentielle. Deux isolats seront considérés comme faisant partie de la même race du pathogène lorsque leurs virulences et leur agressivité seront identiques sur tous les clones d'une même gamme

différentielle. Plus le nombre de clones composant une gamme différentielle est important, plus la capacité de cette gamme différentielle à discriminer les races entre elles est fine, à condition que les clones la composant apportent tous une information pertinente et non redondante.

Les différentes études citées ci-dessus font état d'une grande diversité de virulence et d'agressivité chez *M. ulei*, ce qui permet de distinguer de nombreuses races du parasite. L'exemple le plus marquant est celui de l'étude de Mattos et al. (2003), dans laquelle 50 isolats ayant une origine géographique restreinte (tous provenaient d'une même plantation de 5000 ha) testés sur une gamme différentielle de 12 clones d'hévéas ont révélé 36 profils différents de virulence et d'agressivité.

L'état actuel des connaissances sur le pathosystème *Microcyclus/Hevea* ne permet pas pour l'instant d'identifier des gènes de virulence/avirulence du pathogène auxquels correspondraient des gènes de résistance/sensibilité de l'hôte, comme c'est le cas pour d'autres pathosystèmes dont l'hôte est une plante pérenne, comme *Venturia/Malus* (Bénaouf & Parisi 2000) ou *Melampsora/Populus* (Pinon 1995). Nous ne sommes donc pas en mesure de savoir s'il existe réellement des interactions gène pour gène telles que définies par Flor (1971), ni sur combien de facteurs de résistance porte la discrimination entre deux clones d'une gamme différentielle. Cette méthode est toutefois éprouvée et répétable et permet sans ambiguïté de différencier deux races du pathogène, sans préjuger de la nature et du nombre de différences génétiques à l'origine de cette différenciation.

La possibilité d'une lutte biologique contre le SALB a été évoquée il y a plus de vingt ans lors de la découverte du champignon hyperparasite *Dicyma pulvinata* qui peut se développer naturellement sur les stromas de *M. ulei* (Junqueira et al. 1986b). Ce champignon hyphomycète est également connu pour coloniser les lésions de *Cercosporidium personatum*, responsable du "Late Leaf Spot" de l'arachide (Porter et Taber, 1992). Une caractérisation par marqueurs moléculaires de 49 isolats de ce champignon prélevés sur des lésions de *M. ulei* a été réalisée par Tavares et al. (2004). Plus récemment, il a été montré par bio-essais une action antagoniste efficace contre les lésions conidiennes de *M. ulei* (Mello et al. 2006), allant jusqu'à l'élimination des conidiophores et des conidies en 5 jours. Toutefois, le développement d'un procédé de lutte biologique tirant parti des propriétés hyperparasites de *D. pulvinata* n'est pas encore d'actualité, nombre de difficultés techniques devant être préalablement surmontées (culture à grande échelle de *D. pulvinata*, cinétiques comparées des

cycles du parasite et de l'hyperparasite, conditions d'application en plantation etc.). Encore plus récemment, deux équipes de recherche, une brésilienne et une américaine, ont initié des études portant sur les microorganismes endophytes de l'hévéa et sur leur antagonisme potentiel contre *M. ulei*.

### **1.3. La propagation des maladies cryptogamiques de grandes cultures**

Le fait que *M. ulei* soit connu depuis plus d'un siècle et qu'il n'ait jamais quitté la zone Amérique/Caraïbes pour envahir les principales régions productrices de caoutchouc naturel que sont l'Afrique équatoriale, et surtout l'Asie du sud-est, est diversement interprété. Les opinions oscillent généralement entre deux extrêmes : ceux qui pensent que puisque *M. ulei* n'a jamais quitté l'Amérique c'est qu'il existe des obstacles insurmontables à son implantation ailleurs, et ceux qui affirment que le SALB s'installera un jour sur un autre continent, et que ce n'est qu'une question de temps (Sache 2004). Les arguments des premiers se fondent sur la fragilité des spores de *M. ulei* qui ne leur permettrait pas de survivre à un voyage intercontinental, quelque soit le véhicule de transmission, et/ou sur l'existence en Asie et en Afrique de conditions environnementales peu propices à l'établissement de la maladie. Les seconds se basent sur le fait que toutes les maladies de plantes ont fini un jour ou l'autre par se répandre sur l'ensemble des zones de culture, que cette probabilité de dissémination est sans cesse renforcée par l'accroissement du volume et de la rapidité des échanges commerciaux et touristiques internationaux, et que la maladie a déjà été transportée par le passé hors de la zone d'origine naturelle de l'hévéa, comme en Amérique centrale et dans la zone de la forêt atlantique au Brésil.

La menace que fait peser l'éventualité d'une introduction accidentelle du SALB en Asie est prise au sérieux par les secteurs industriels dont l'activité dépend étroitement de la matière première qu'est le caoutchouc naturel. Cette menace est relayée périodiquement par des organes de presse de grande diffusion (Davis 1997 ; Gremillet 2006 ; Couper & Henbest 2007 ; Hertel 2007). Par ailleurs, *M. ulei* est considéré comme une arme biologique potentielle et comme telle, fait partie d'une liste d'organismes dont les mouvements internationaux sont soumis à un strict contrôle par diverses institutions nationales ou internationales (Madden & Wheelis 2003).

Pour la plupart des acteurs de la filière "caoutchouc naturel", la question : " le SALB s'installera-t-il un jour en dehors du continent Américain, et si oui à quelle date ? " revêt donc une importance cruciale. Il n'est pas dans nos compétences de proposer une réponse à cette question complexe, essentiellement du domaine de l'épidémiologie. Cependant, afin d'illustrer l'intérêt que présente ce type de questionnement, nous proposons de faire une revue de quelques maladies de plantes cultivées et de la manière dont a évolué au cours du temps leur aire de dissémination. A la suite de cet inventaire non exhaustif nous essaierons d'identifier les points communs et les éléments de divergence et verrons quels sont les enseignements que l'on peut tirer de ces différents exemples. Nous avons volontairement limité cette énumération à quelques exemples documentés de dissémination de maladies sur des cultures de plantes récemment domestiquées, ou dont l'aire de culture s'est élargie à une époque historique récente.

#### *Phytophthora infestans / Solanum tuberosum*

L'exemple sans doute le plus connu de la propagation d'une maladie d'un continent à un autre est celui du mildiou de la pomme de terre, *Phytophthora infestans*. Lorsque la pomme de terre a été importée en Europe au XVI<sup>ème</sup> siècle, le mildiou n'avait pas été introduit conjointement, et l'Europe en est restée indemne jusqu'au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle. La maladie est mentionnée pour la première fois en Belgique en juin 1845 (Semal 1995), et se répand en moins de 4 mois à l'Europe entière. Il semble que le phénomène se soit répété dans les années 1970 lorsque de nouvelles races qui jusqu'alors n'étaient présentes qu'au Mexique, ont envahi l'Europe et ont supplanté très rapidement les anciennes races installées depuis 1845. Dans les deux cas, il semble que la maladie ait été propagée par l'intermédiaire de tubercules infectés transportés par bateau en provenance des Amériques. Il se serait donc écoulé plus de 200 ans entre l'introduction de la pomme de terre en Europe, et la première introduction du mildiou, et 125 années supplémentaires pour la seconde introduction du parasite.

#### *Hemileia vastatrix / Coffea spp.*

Bien que la culture du café ait été introduite en Amérique centrale et Amérique du sud dès la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle, et que la rouille orangée provoquée par *Hemileia vastatrix* ait été décrite pour la première fois au Sri Lanka en 1868 (Goujon 1971), ce n'est qu'en 1970 qu'elle

est signalée pour la première fois en Amérique du sud (Bowden et al. 1971). La rouille orangée était en fait endémique en Afrique de l'est et centrale et a été introduite par l'homme au Sri Lanka, puis par la suite à toute la zone caféicole d'Afrique et d'Asie. En dépit d'une vaste répartition, il aura donc fallu attendre un siècle pour qu'*Hemileia vastatrix* s'installe sur le continent américain, probablement transportée par des vents d'altitude (Bowden et al. 1971).

*Phakopsora pachyrhizi* / *Glycine max*

La rouille asiatique du soja due à *Phakopsora pachyrhizi* a été décrite au Japon pour la première fois en 1902. Elle est signalée en Afrique de l'est et australe de 1966 à 1998, à Hawaii en 1994, au Nigeria en 2001, au Brésil et au Paraguay en 2001, et enfin aux Etats-Unis en 2004 (Schneider et al. 2005) où elle est mentionnée dans 15 états du sud et de l'est du pays.

*Ustilago scitaminea* / *Saccharum officinarum*

Une actualisation de l'évolution mondiale du charbon de la canne à sucre a été réalisée récemment (Raboin et al 2007), de laquelle proviennent les informations exposées dans ce paragraphe. Avant les années 1940, cette maladie n'était présente qu'en Asie, quelques pays du sud et de l'est de l'Afrique et les îles de l'océan Indien (Madagascar, Maurice et Réunion). Sa première mention sur le continent américain remonte à 1940 en Argentine (Hirshhorn 1949), d'où il s'est disséminé vers le Paraguay, puis le Brésil en 1948 (Veiga 1972). En Afrique de l'ouest, le premier signalement est fait au Tchad en 1969, puis le charbon gagne progressivement tous les pays de la région dans les années 1970. A Hawaii, la maladie est identifiée en 1971, et au Guyana en 1974 pays à partir duquel la maladie se répand à tous les états caribéens et aux Etats-Unis. Enfin, la maladie est détectée pour la première fois en Australie en 1998, avant de s'étendre en 2006 à l'état du Queensland, principale région productrice du pays.

*Mycosphaerella fijiensis* / *Musa spp.*

La maladie connue sous le nom de maladie des raies noires du bananier (ou "black sigatoka") a été décrite pour la première fois à Fiji en 1963, mais était déjà probablement répandue en

Asie du sud-est et dans le sud de l'Océanie à cette date. En Afrique le premier enregistrement date de 1973 en Zambie, et depuis elle a envahi toute la zone sub-saharienne. Elle est apparue pour la première fois sur le continent américain au Honduras en 1972, et s'est par la suite étendue au sud du Mexique, ainsi que vers le sud. Elle a atteint le Brésil en 1998 (Rivas et al, 2004) et occupe actuellement tout les états de la région nord de ce pays.

#### *Moniliophthora perniciosa / Theobroma cacao*

La maladie connue sous le nom de balai de sorcière est endémique sans doute depuis longtemps dans la zone d'origine du cacaoyer (Bolivie, Brésil, Equateur, Pérou, Venezuela) (Purdy & Schmidt 1996). Elle est décrite pour la première fois en 1785 et les premières investigations scientifiques sont effectuées en 1895 au Surinam. Elle s'est propagée assez lentement aux autres pays de la région Caraïbes / Amérique centrale pour finalement arriver à la principale région productrice du Brésil dans l'état de Bahia (1989). Cette maladie est celle qui présente le plus de similitude avec le SALB pour ce qui est de l'évolution de son aire de répartition. Toutefois, à la différence de *Microcyclus*, on a identifié pour *Moniliophthora perniciosa* à ce jour plusieurs hôtes possibles n'appartenant pas au genre *Theobroma*.

#### *Cryphonectria parasitica / Castanea spp.*

Cet ascomycète, responsable de la maladie connue sous le nom de chancre du châtaignier est d'origine asiatique. Il a été signalé pour la première fois à New York en 1904 et a contaminé toute l'Amérique du nord en 25 ans. Cette maladie a ensuite été introduite en Italie où elle s'est propagée et a atteint le sud de la France vers 1956. Son aire de répartition en Europe s'étend de nos jours du Portugal à la République Tchèque (Bragança et al 2007).

Ces quelques exemples tendent à montrer que la dissémination d'une maladie loin de son aire d'origine est un évènement qui s'est répété de nombreuses fois dans un passé récent, mais pas de façon systématique (voir *Moniliophthora*), et que le calcul de la probabilité de réalisation d'un tel évènement sur une durée déterminée est difficile à établir. L'estimation du risque associé à cet évènement, qui prend en compte à la fois la probabilité de réalisation et l'intensité du préjudice, est donc tout aussi difficile à prévoir, même si à partir des exemples ci-dessus il est aisé de se rendre compte que les préjudices subis dans les régions où les maladies ont été nouvellement introduites ont toujours été considérables. De cette difficulté à

formuler des prévisions ressort un besoin accru de connaissances sur la biologie des champignons en général (Desprez-Loustau et al 2007).

Il ressort également de ces exemples qu'il serait illusoire de se baser sur le passé historique d'un pathosystème pour essayer d'en prévoir l'évolution future : le fait que *Microcyclus ulei* n'ait pas encore été disséminé en Asie et en Afrique alors que des plantations d'hévéa existent sur ces deux continents depuis bientôt un siècle ne signifie pas que ces plantations seront à jamais épargnées par le SALB, pas plus que l'absence de mildiou de la pomme de terre en Europe plus de deux siècles après l'introduction de cette culture ne permettait d'espérer en 1844 que ce fléau n'atteignît pas le vieux continent.

L'évolution des surfaces contaminées par le charbon de la canne à sucre illustre quant-à elle clairement la précarité des mesures phytosanitaires censées faire barrière à l'extension d'un parasite. Le fait que l'Australie, un des pays les plus vigilants en matière de quarantaine agricole et qui est de surcroît protégé par son insularité, n'ait pas réussi à empêcher ce parasite de se répandre dans le pays et de porter ainsi préjudice à une de ses principales cultures industrielles, ne peut que faire douter de l'efficacité réelle de telles mesures de protection.

Il semble donc que, parallèlement à l'accroissement des études visant la connaissance du champignon, la mesure la plus sensée pour anticiper l'arrivée d'un nouveau parasite dans une région où il ne sévissait pas encore, consiste à développer une stratégie de création et d'évaluation variétales visant à identifier des variétés résistantes au parasite identifié, possédant un fort potentiel de production et adaptées aux conditions locales de culture. Cette stratégie est d'autant plus importante lorsque la culture considérée est pérenne, à long cycle de production et avec une période végétative improductive de plusieurs années, et qu'il n'existe pas de moyens de lutte agronomiques ou chimiques efficaces. Si dans le cas d'une plante annuelle, on peut envisager de réagir dans l'urgence à une arrivée épidémique nouvelle en emblavant les superficies menacées avec des variétés résistantes provenant d'autres zones de culture, une stratégie de ce type dans le cas du SALB de l'hévéa reviendrait à admettre une période de transition de plusieurs années avec une production fortement réduite. Les conséquences en seraient alors catastrophiques, tant du point de vue social (des millions de petits planteurs vivent principalement de la culture de l'hévéa en Asie du sud-est) qu'économique.

Toutes proportions gardées, c'est une catastrophe de ce genre qu'ont subie les planteurs de cacao de l'état de Bahia au Brésil où l'arrivée du balai de sorcière a fait chuter la production de fèves de cacao de 300.000 à 180.000 tonnes au début des années 1990 (Renard 1999). Bien que la recherche et le développement soient fortement mobilisés dans de nombreux organismes brésiliens dans le but de divulguer de nouvelles variétés résistantes, la production de cacao marchand enregistrée dans l'état de Bahia n'a pas retrouvé, vingt ans après, le niveau qu'elle avait avant l'apparition de *Moniliophthora perniciosa*.

## Chapitre 2 – Nouveaux résultats concernant le cultivar RO 38

Lorsqu'ont débuté les travaux relatifs à la présente thèse, un seul cultivar avait fait l'objet d'une étude du déterminisme génétique de sa résistance au SALB : RO 38. La cartographie génétique d'une descendance entre le cultivar sensible PB 260 et le cultivar résistant RO 38 avait été établie au moyen de marqueurs isozymes, AFLP, RFLP et microsatellites (Lespinasse et al. 2000a), et 8 QTL de résistance répartis sur 7 chromosomes avaient pu être identifiés après inoculations de 5 races différentes du pathogène en conditions contrôlées (Lespinasse et al. 2000b). L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une thèse de doctorat (Lespinasse 1999). Par la suite, l'observation de la même descendance en conditions naturelles d'infestation a permis de confirmer certains QTL détectés en conditions contrôlées, et d'en mettre d'autres en évidence (Le Guen et al. 2003).

L'ensemble de ces résultats est rappelé ci-après :

- La quasi-totalité des QTL de résistance identifiés dans la descendance étudiée proviennent du parent résistant RO 38. Un seul QTL mineur de résistance provenant du parent PB 260 a pu être identifié.
- Un important QTL de résistance est situé sur le groupe de liaison g13, à proximité du marqueur EM36/14. Ce QTL participe à la résistance de RO 38 vis-à-vis des 5 races inoculées en conditions contrôlées et pour les 2 types de symptômes observés : type de réaction et diamètre des lésions. Ce QTL explique de 13 à 36 % de la variation phénotypique observée selon les symptômes observés et les races inoculées.
- Les autres QTLs identifiés en conditions contrôlées ne sont efficaces que contre une partie des races inoculées, et avec une participation plus réduite à la variation phénotypique observée.
- Le parent RO 38 présente une résistance totale vis-à-vis de 4 des 5 races inoculées, et pour chacune de ces 4 races, cette résistance totale est obtenue grâce à l'efficacité simultanée de 4 à 6 QTLs.
- Ce même parent RO 38 présente une résistance partielle vis-à-vis d'une race. Dans le cas de cette résistance, seul le QTL situé sur le groupe de liaison g13 est efficace.

- En conditions naturelles d’infestation, le QTL situé sur le chromosome g13 explique jusqu’à 89% de la variabilité phénotypique du type de réaction. De par cette valeur très élevée, on peut donc considérer que ce QTL se comporte en réalité comme un gène majeur de résistance dans les conditions où il a été testé (en Guyane). Il a été vérifié que ce gène majeur dénommé *M13-1bn* possède bien une hérédité mendélienne.
- L’efficacité de ce gène majeur *M13-1bn* a également été démontrée en milieu naturel pour le caractère densité de stromas, qui n’avait pas pu être observé en conditions contrôlées d’inoculation.
- Trois autres QTLs mineurs ont également été identifiés en conditions naturelles d’infestation.

Pour synthétiser :

- Un important QTL localisé sur le groupe de liaison g13 en conditions contrôlées se comporte comme un gène majeur de résistance en conditions naturelles d’infestation.
- La résistance totale à certaines souches est conférée par l’efficacité concomitante de 4 à 6 QTLs.
- L’efficacité du seul QTL en g13 confère un phénotype de résistance partielle de haut niveau.

Autre fait surprenant et inattendu: malgré l’efficacité du QTL en g13 et la résistance totale multigénique observée y compris pour des souches brésilienne, la résistance du clone RO 38 est presque totalement contournée au Brésil (résistance partielle faible à Bahia). De nouvelles races de *M. ulei* ont par la suite été découvertes, vis-à-vis desquelles RO 38 possédait soit une résistance partielle de faible niveau, soit une forte sensibilité (Mattos et al. 2003). Il est donc apparu intéressant d’étudier quels étaient les facteurs de résistance détectés dans le cas de l’inoculation de la même descendance PB 260 x RO 38 avec des races de ce type. C’est l’objet du présent chapitre, présenté sous la forme d’un article publié en 2007 dans la revue *New Phytologist*.

# Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection

V. Le Guen<sup>1</sup>, D. Garcia<sup>1,2</sup>, C. R. R. Mattos<sup>3</sup>, F. Doaré<sup>4</sup>, D. Lespinasse<sup>5</sup> and M. Seguin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR-1096 Polymorphisme d'Intérêt Agronomique, CIRAD, Avenue Agropolis, TA 80/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, Rod. Ilhéus-Itabuna BR 415, Km 16 Ilhéus – Bahia CEP 45.662-000. Brazil; <sup>3</sup>Plantações Michelin da Bahia, Cx. Postal 2, CEP 45435-000, Ituberá, BA, Brazil; <sup>4</sup>CIRAD, Campus Agronomique, BP 701, 97387 Kourou cedex, French Guiana; <sup>5</sup>Syngenta Seeds S.A.S. 12 chemin de l'Hobit, BP 27, 31790 Saint Sauveur, France

## Summary

Author for correspondence:

V. Le Guen

Tel: +33 4 67 61 55 35

Fax: +33 4 67 61 57 93

Email: [vincent.le\\_guen@cirad.fr](mailto:vincent.le_guen@cirad.fr)

Received: 13 June 2006

Accepted: 7 September 2006

- Genetic resistance components of the *Hevea brasiliensis* × *H. benthamiana* RO 38 cultivar to *Microcyclus ulei* disease were investigated by inoculating isolates which succeeded in partially or completely infecting genotypes of a mapping population.
- Progeny of a cross between RO 38 and a susceptible cultivar was inoculated under controlled conditions with three isolates and scored for two resistance traits. Interval mapping and a nonparametric test were used to detect resistance quantitative trait loci (QTLs).
- Eight significant QTLs were detected, all of them inherited from the interspecific parent. Among these QTLs, only one contributed to the partial resistance against a highly pathogenic isolate, and no QTL was detected for resistance against the most pathogenic isolate. As an unexpected result, a single isolate can thus completely bypass this polygenic resistance.
- This complex situation, where no clear relationship can be established between number of resistance factors and qualitative vs quantitative or partial vs complete resistance, is discussed and suggestions as to the detection of new and sustainable resistance sources are proposed.

**Key words:** *Hevea* spp., mapping population, *Microcyclus ulei*, polygenic resistance, quantitative trait locus, South American leaf blight (SALB).

*New Phytologist* (2007) **173**: 335–345

© The Authors (2006). Journal compilation © *New Phytologist* (2006)

doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01911.x

## Introduction

South American Leaf Blight (SALB) is one of the most damaging diseases affecting rubber tree plantations. It is caused by the aerial fungus *Microcyclus ulei*, which causes repeated defoliations, and may lead to death of the trees in the most severe cases. To date, its occurrence has been limited to the American continent, but the increased frequency of flights and commercial relationships with Africa and Southeast Asia make its accidental introduction into these regions of major natural rubber production more and more probable. Considering that 80% of the world's natural rubber production is concentrated in five Asiatic countries, in which the majority of cultivated clones are highly susceptible to SALB, the consequences of this hypothetical

introduction would be disastrous for millions of smallholders whose main income depends principally on latex production. Chemical management of this disease is technically possible but economically non-profitable, because of the large amounts of fungicides and the frequency of treatments necessary to protect trees of more than 20 m tall. Furthermore, it should raise numerous ecological and public health concerns.

Some surveys were carried out in the Amazon forest to identify native trees of *Hevea brasiliensis* or allied species, mainly *Hevea benthamiana* or *Hevea pauciflora* (Townsend, 1960; Gonçalves, 1981; Lins *et al.*, 1981; Paiva, 1981), with apparently good resistance to *M. ulei* (Le Guen *et al.*, 2002). Attempts to transfer these resistances into cultivated clones by crossing these trees with high-yielding Asiatic cultivars were

generally unsuccessful because of the nondurability of the resistances tested (Bos & McIndoe, 1965; Peralta *et al.*, 1990; Gasparotto & Lima, 1991).

Up to now, the most studied resistance source has been RO 38 (also known as FX 3899), an interspecific hybrid clone between *H. brasiliensis* and *H. benthamiana*. The resistance of this clone is inherited from its *H. benthamiana* parent F 4542. An F1 progeny between RO 38 and the susceptible Asiatic *H. brasiliensis* clone PB 260 was generated and a genetic linkage map established following a double pseudo-testcross strategy (Lespinasse *et al.*, 2000a). Resistance QTLs to SALB have been identified both in controlled conditions (Lespinasse *et al.*, 2000b) and under natural infestation (Le Guen *et al.*, 2003).

The sources of inoculum of *M. ulei* that have been studied up to now in these experiments of QTL detection consisted of strains that are either nonsporulating on the resistant parent RO 38 or have a moderate sporulation (Lespinasse *et al.*, 2000b). A major locus of quantitative resistance was detected on linkage group g13, which was responsible for 18–36% of phenotypic variance of components of quantitative resistance to different strains inoculated in controlled conditions and up to 85% under natural infestation. In fact, under natural infestation, the sporulation : nonsporulation trait segregates in a 1 : 1 ratio from the RO 38 parent, corresponding to a simply inherited trait governed by a qualitative resistance locus (named *M13-1bn*) located at the same position as the major QTL in the controlled condition on the linkage group g13 (Le Guen *et al.*, 2003). Other minor resistance loci (five and eight QTLs, respectively, under natural and controlled conditions of infestation) were also detected, which were expressed by a quantitative variation of resistance in the progeny.

When this first QTL analysis was carried out on the PB 260 × RO 38 segregating progeny, it was not known whether other *M. ulei* strains existed that were more aggressive on the

RO 38 clone. Meanwhile, new strains were isolated and tested on RO 38 and the aggressiveness of some of them proved to be much greater than those investigated by Lespinasse *et al.* (2000b). It thus became interesting to complete the QTL analysis for resistance to SALB with these strains showing greater aggressiveness in order to describe the genetic evidence of a resistance bypass or even of a resistance breakdown. The present study aims to describe the comparative efficiency of resistance QTLs in the PB 260 × RO 38 cross progeny, when inoculated with three different strains: a weakly pathogenic strain, a highly pathogenic strain, and a very highly pathogenic one.

## Materials and Methods

### Resistance tests

Among the three new strains studied in the present work, two were recently collected in rubber tree plantations, and the third was kept stored in the Cirad fungus library of Kourou (French Guiana). The strain San86 was isolated in the north of Brazil's Mato Grosso state, and Pmb34 was isolated from a tree of the clone RO 38 in a budwood garden in the Brazilian state of Bahia. Both strains were purified by successive inoculations on to a compatible rubber-tree clone. The strain G98, originating from French Guiana, was collected a few years ago for a rubber tree experiment and stored in a deep-freeze. Patterns of pathogenicity according to a host range of nine differential *Hevea* clones, including parents of the progeny, were determined as previously described (Lespinasse *et al.*, 2000b). Results of this differential test differed noticeably between G98 and the two other strains (Table 1). One of these differential clones is F 4542, the *H. benthamiana*-resistant parent of RO 38. This clone appears globally more resistant than RO 38, illustrating the fact that expression of resistance in pure *H. benthamiana* species is better than in an

**Table 1** Sporulation intensity and lesion diameter for the three *Microcyclus ulei* strains inoculated on to a set of differential *Hevea* spp. clones

Strains	Host range														Parents			
	FX 4098 <sup>a</sup>		FX 2804 <sup>c</sup>		F 4542 <sup>b</sup>		FX 985 <sup>a</sup>		FX 3864 <sup>a</sup>		MDF 180 <sup>d</sup>		FX 2261 <sup>a</sup>		RO 38 <sup>c</sup>		PB 260 <sup>e</sup>	
	SI	LD	SI	LD	SI	LD	SI	LD	SI	LD	SI	LD	SI	LD	SI	LD	SI	LD
Pmb34	+/- <sup>f</sup>	2.0	+	5.0	+/-	4.0	-	1.5	+	6.0	+/-	3.0	-	1.5	+	5.0	+	7.0
San86	*	*	+	2.0	+/-	1.0	-	1.5	+/-	1.0	+/-	1.5	-	1.0	+	2.0	+	7.0
G98	+/-	2.5	+/-	1.0	+/-	2.0	+/-	2.0	+	1.5	+/-	1.5	-	0.5	+/-	1.0	+	7.0

SI, sporulation intensity; LD, lesion diameter (mm).

<sup>a</sup>Clone from a cross between Asiatic and native South American *H. brasiliensis* clones.

<sup>b</sup>*H. benthamiana* clone.

<sup>c</sup>Clone from a cross between F 4542 and an Asiatic *H. brasiliensis* clone.

<sup>d</sup>Native South American *H. brasiliensis* clone.

<sup>e</sup>High-yielding Asiatic *H. brasiliensis* clone.

<sup>f</sup>+, dense sporulation; +/-, weak sporulation; -, absence of sporulation.

\*No data.

interspecific hybrid. Differences between San86 and Pmb34 were found only for lesion diameter on five clones (Table 1). In this paper we use the term 'aggressiveness' to describe a quantitative variation in pathogenicity in preference to 'virulence', characterizing the ability of a strain to cause disease on a specific genotype (Brown, 2003). Seedlings from the cross PB 260 × RO 38 that were previously used for the molecular linkage map (Lespinasse *et al.*, 2000a) and detection of resistance QTLs (Lespinasse *et al.*, 2000b) were grafted and grown in a glasshouse. The grafted trees were inoculated with the three strains following a procedure described previously (Rivano, 1992). Replication of resistance tests was possible because plants were clonally propagated by grafting. For this reason, 107 genotypes were inoculated twice with the strain San86, and 101 genotypes with the strains G98 and Pmb34.

Owing to the nonsynchronization of emergence of new shoots on plants, inoculations could not be carried out at the same time for all plants. Plants which presented leaves at a suitable stage for inoculation were transferred from the glasshouse to the inoculation chamber, enabling a rigorous control of environmental parameters: temperature of  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative moisture of 85–95% and a 12 h photoperiod. The lower part of two young leaves of each plant was sprayed with an inoculum suspension adjusted to  $2 \times 10^5$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  according to Mattos *et al.* (2003). The germination rate was systematically checked under a microscope after 24 h at room temperature in distilled water, and showed values of *c.* 90%. In a given experiment, 15–30 plants were thus inoculated with the same strain, and a total number of 175, 168 and 167 progeny individuals were inoculated, respectively, with the strains G98, San86 and Pmb34.

### Symptom assessment

A lot of parameters were tentatively used to characterize the *M. ulmi*–*Hevea* interaction (Junqueira *et al.*, 1987). However, it has been shown that, in the case of inoculation under controlled conditions, only two of them – namely the reaction type (RT) and the lesion diameter (LD) – had the required qualities (i.e. accuracy of measurements, heritability) to be used in a QTL identification study (Lespinasse *et al.*, 2000b). Previous studies (Junqueira *et al.*, 1990) have shown that in standard conditions of an inoculation chamber (i.e. temperature of  $24^\circ\text{C}$ , relative humidity of 90% and 12 h photoperiod), the lesions developed to a maximum size and sporulation intensity 11 d after inoculation. Leaflets of infected plants were thus cut and brought to the laboratory 11 d after inoculation to examine RT and LD. RT was assessed under binocular observation on a 1–6 scale: scores 1 and 2 corresponded to, respectively, necrotic and chlorotic nonsporulating flecks; scores 3, 4 and 5 corresponded to sporulating lesions on the lower surface of leaflets, with slight, moderate and high sporulation, respectively; score 6 corresponded to an abundant sporulation on upper and lower surfaces of leaflets. LD was

estimated from the average size of lesions, on a 0.5 mm basis from 0.5 to 7 mm (Rivano, 1992).

### Statistical analysis

The GLM procedure of the SAS software (SAS Institute Inc., 2001) was used to perform a standard analysis of variance (ANOVA) on RT and LD data for each of the three fungus strains. Variance was divided according to experimental factors, that is genotype and residual effect. Broad-sense heritability ( $H^2$ ) was deduced from the computed variances, using the following formula:

$$H^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2)$$

( $\sigma_g^2$ , genetic variance;  $\sigma_e^2$ , environmental variance).

### QTL analysis

The seedlings of the PB 260 × RO 38 cross had been previously typed with genetic markers, and linkage analysis was performed on segregation data from 195 progeny individuals (Lespinasse *et al.*, 2000a). The two pseudo-testcross core maps used for QTL analysis consisted of 234 markers for the resistant parent RO 38 and 158 markers for the susceptible parent PB 260 with core markers distributed every 10–15 cM. In order to allow exact comparison of QTL detection between Lespinasse *et al.* (2000b) and the present study, we used the same set of molecular data, except that we added, in the RO 38 core map, the major resistance locus *M13-1bn*, later identified by Le Guen *et al.* (2003) as a genetic marker. This new marker was added using JoinMap software with the same mapping parameters as for other markers. This addition aimed to improve QTL location on the g13 linkage group. In fact, data produced by Lespinasse *et al.* (2000b) were newly analyzed for QTL detection and we found that this resistance genetic marker was the LOD peak marker for the five strains used by the authors. We thus considered that the quantitative resistance locus on g13 is precisely located on the *M13-1bn* resistance genetic marker. The molecular markers are named under the following code: gHbCIR# for RFLP with *Hevea PstI* library probes, Rga# for RFLP with homologous resistance sequences used as probes, EM#/# for AFLP, and M# for microsatellite, including the Mn superoxide dismutase (MnSOD) locus mapped using microsatellite polymorphism. EST, LAP and ADH are three isozyme markers. QTL analysis was performed using the MapQTL 5 software (Van Ooijen, 2004). Permutation tests were carried out on the whole genome (Churchill & Doerge, 1994) to determine a LOD-score empirical-threshold value for interval mapping. For a genome-wide 5% significance level, which is considered a reasonable risk (Van Ooijen, 1999), this LOD-score value was 2.9, either on the PB 260 map or on the RO 38 map.

QTL analyses were performed on parental maps separately. We first applied the interval mapping procedure (IM) as described by Lander & Botstein (1989). Afterwards we used a multiple QTL mapping procedure (MQM), using as cofactor the marker with the highest LOD-score value in the previous IM analysis (Jansen, 1993). Finally, the nonparametric Kruskal–Wallis (KW) test (Van Ooijen, 2004) was applied individually to each segregating locus. As this test does not require a normal distribution, it was used to confirm the validity of detected QTLs in the case of nonnormality of the observed parameters. Comparing the results of these three different analyses, QTLs considered as significant were those with LOD-score values higher than 2.9 in the MQM procedure, or with a probability  $P < 0.0005$  in the KW test. We also decided to note putative QTLs for the record, in case the same QTLs appear in further studies. These putative QTLs were defined as follows: markers with LOD-score values higher than the threshold for a genome-wide 10% significance level, or probability  $P < 0.001$  in the KW test and significant for another trait (i.e. another strain or another resistance parameter).

In a second round of analysis, for strain G98, we applied trait-based analyses of QTL (Lebowitz *et al.*, 1987) to improve the power of QTL detection, eliminating the strong effect of the major QTL on the g13 linkage group. For that purpose, we selected the subsample of 94 progeny individuals which do not carry the resistance allele on the resistance genetic marker *M13-1bn*, that is, the progeny individuals with RT > 2 in the field experiment performed by Le Guen *et al.* (2003) in French Guiana. Among the so-called susceptible progeny individuals, 81 were inoculated with G98 in the present study. On this subsample, we performed QTL analysis following the same procedure as that for the complete progeny, except that: (i) for IM, the LOD thresholds were 3.1 and 2.9 for significant and putative QTLs, respectively, according to permutation tests; and (ii) for MQM, we used different single cofactors, applying the 'automatic selection of cofactors' option of MapQTL, on significant LOD-peak markers in the IM test. Confidence intervals were calculated, corresponding to a LOD diminution of 1 on either side of the likelihood peak. Referring to the propositions already made (Lespinasse *et al.*, 2000b), all QTLs with LOD-score peaks located within an interval of 20 cM on the same linkage group were assumed to be identical.

## Results

### Evaluation of disease resistance

Both parental clones were systematically inoculated with the three studied strains. The susceptible parent PB 260 always exhibited the maximum degree of susceptibility for both RT (score of 6) and LD (7 mm). In the so-called resistant parent RO 38, scores were different according to the strain: the average scores of strains G98, San86 and Pmb34 were, respectively, 3.0, 6.0 and 5.6 for RT, and 1.1, 2.0 and 5.1 for LD.

As mentioned above, 175, 168 and 167 progeny individuals were inoculated, respectively, with the strains G98, San86 and Pmb34. It was intended to duplicate the inoculations in order to compute average values and reduce the experimental error, but for practical reasons this was not possible for all genotypes. Only 107 genotypes were inoculated twice with the strain San86, and 101 genotypes with the strains G98 and Pmb34.

Broad-sense heritabilities are given in Table 2. High heritabilities were found for RT and LD with strain G98, weak heritability for LD with strain San86, and no significant heritability for RT with San86 and for both parameters with Pmb34. Considering these results, identification of efficient resistance QTLs against Pmb34 for both parameters and against San86 for RT is expected to be difficult.

The frequency distributions of genotypic means of the resistance parameters based on the two replicates in the F1 population 'PB 260 × RO 38' was illustrated in Fig. 1. The differences in resistance behaviour against the three strains were clearly illustrated. The F1 population showed a skewed distribution towards resistance with the strain G98, as compared with the other two strains. For RT, the value of distribution mode was 1 for G98, 5 for San86, and between 5 and 6 for Pmb34. As explained in the section on symptom assessment, scores 1 and 2 correspond to nonsporulating lesions whereas scores 3–6 describe lesions with an increased sporulation intensity on the lower side of leaflets (scores 3, 4 and 5) or on both sides of leaflets (score 6). Considering LD, the frequency distributions were skewed towards resistance with the strain G98 (with a mode value of 2 mm), towards susceptibility for Pmb34 (mode value 5 mm), and between these two extremes for San86 (mode value 3 mm). According to these two parameters, San86 could be considered as highly pathogenic, and Pmb34 as very highly pathogenic on this population.

### Detection of resistance QTLs

According to the threshold criteria defined in the Material and Methods section, no significant or putative resistance QTL was detected on the genetic map of the susceptible parent PB 260 for any of the three tested strains. For analysis on the

**Table 2** Number of genotypes inoculated and broad-sense heritabilities for each *Microcyclus ulei* strain

Strain	N1 <sup>a</sup>	N2 <sup>b</sup>	$H_{RT}^2$	$H_{LD}^2$
G98	175	101	0.50 **	0.57 **
San86	168	107	0.15 ns	0.27 *
Pmb34	167	101	0.03 ns	0.17 ns

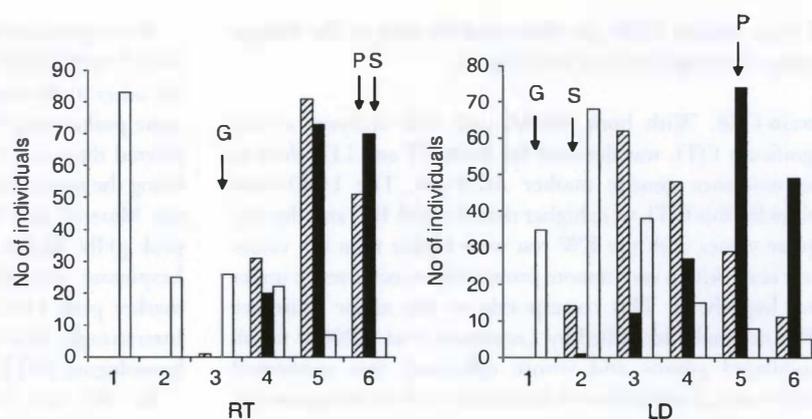
ns, nonsignificant; \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.001$ .

RT, reaction type; LD, lesion diameter.

<sup>a</sup>Number of genotypes inoculated once.

<sup>b</sup>Number of genotypes inoculated twice in two distinct experiments.

Fig. 1 Distribution of reaction type (RT) and lesion diameter (LD) for the three strains studied: G98 (open bars), San86 (hatched bars) and Pmb34 (closed bars). Arrows indicate values for G98 (G), San86 (S) and Pmb34 (P) on the RO 38 parent. Values for the three strains on the PB 260 parent are 6 for RT and 7 for LD.



linkage map of the resistant parent RO 38, results of the different QTL analyses are shown in Table 3. For G98, results are given for analyses on the complete progeny and on the subsample of susceptible progeny individuals lacking the resistance allele at the *M13-1bn* locus (indicated as RTs and

LDs in Table 3). All significant and putative QTLs as defined by the threshold values described in the Material and Methods section were mentioned in this table, even for parameters with no significant correlations between both replications. Localization, confidence interval and phenotypic importance

Table 3 Quantitative trait loci (QTLs) detected for two components of resistance to three strains of *Microcyclus ulei* in F1 progeny (PB 260 × RO 38) on the RO 38 linkage map

Strain	Trait	QTL location	Marker peak <sup>a</sup>	KW		IM		MQM		Cofactor <sup>f</sup>
				K <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	LOD <sup>d</sup>	R <sup>2</sup> (%) <sup>e</sup>	LOD	R <sup>2</sup> (%)	
G98	RT	g11-1	gHbCIR215	–	–	2.4	8.4	4.2	7.8	<i>M13-1bn</i>
		g11-2	M613	–	–	3.4	10.0	4.4	8.7	<i>M13-1bn</i>
		g12	LAP <sup>i</sup>	11.2	<0.001	–	–	–	–	<i>M13-1bn</i>
		g13	<i>M13-1bn</i>	61.9	<0.0001	15.4	34.3	(15.4)	(34.3)	<i>M13-1bn</i>
		g14	EM22/9	–	–	–	–	3.9	7.0	<i>M13-1bn</i>
		g15	EM3/17	–	–	2.9	7.9	–	–	<i>M13-1bn</i>
	RTs <sup>g</sup>	g11-1	gHbCIR215	16.7	<0.0001	3.9	17.3	3.4	16.2	EM22/9
		g11-2	M613	16.5	<0.0001	4.3	24.5	4.0	18.8	EM22/9
		g14	EM22/9	13.2	<0.0005	3.5	19.0	3.5	14.5	M613
		g15	EM3/17	10.9	<0.001	2.6	14.6	3.7	15.7	M613
		g16	EM54/1	14.7	<0.0005	4.1	21.6	4.1	17.6	M613
		LD	g4	EM58/7	–	–	2.8	8.6	3.7	7.3
	g12		EM15/3	11.2	<0.001	3.4	9.0	4.5	7.6	<i>M13-1bn</i>
	g13		<i>M13-1bn</i>	69.0	<0.0001	15.4	34.2	(15.4)	(34.2)	<i>M13-1bn</i>
	g16		EM54/1	–	–	–	–	–	–	–
	LDs <sup>h</sup>	g4	EM58/7	–	–	2.9	8.5	–	–	EM15/3
g11-1		gHbCIR688	12.6	<0.0005	–	–	–	–	EM15/3	
San86	RT	g2	gHbCIR540 <sup>i</sup>	10.9	<0.001	–	–	–	–	EM15/3
		g12	EM15/3	51.6	<0.0001	12.9	33.6	(12.9)	(33.6)	EM15/3
Pmb34	RT	–	–	–	–	–	–	–	–	
	LD	–	–	–	–	–	–	–	–	

IM, interval mapping; KW, Kruskal–Wallis test; MQM, multiple QTL mapping; LD, lesion diameter; RT, reaction type.

<sup>a</sup>Marker with the highest K-value for the KW test or nearest to the highest LOD-score position for the IM and the MQM procedures.

<sup>b</sup>Value of the KW test, to be compared with chi-square threshold values with 1 d.f.

<sup>c</sup>Probability associated with the K-value.

<sup>d</sup>LOD-score value.

<sup>e</sup>Proportion of the explained phenotypic variance.

<sup>f</sup>Marker used as cofactor for MQM.

<sup>g</sup>RT and LD traits scored on the part of the progeny lacking the resistance allele at the *M13-1bn* locus.

<sup>i</sup>Putative QTL.

of these various QTLs are illustrated for each of the linkage groups carrying resistance loci (Fig. 2).

**Strain G98.** With both MQM and KW analysis, a very significant QTL was detected for both RT and LD, close to the resistance genetic marker *M13-1bn*. The LOD-score values for this QTL were higher than 15 with IM, and the chi-square values with the KW test were higher than 60, values associated with a very remote probability of occurrence under null hypothesis. This corresponds to the major resistance QTL originally identified by Lespinasse *et al.* (2000b) for all inoculated strains and whose efficiency was confirmed under natural conditions of infestation in French Guiana (Le Guen *et al.*, 2003). The resistance marker *M13-1bn*, being the closest to the LOD peak in IM analysis of RT and LD for the G98 strain, was used as a cofactor for MQM for this strain.

Two significant QTLs were identified on linkage group g11 for RT with MQM, one close to the marker gHbCIR215 and the other in the neighbourhood of marker M613, both LOD-score peaks being 29.6 cM distant from each other. We considered these two LOD-score peaks on linkage group g11 as being the manifestation of two distinct QTLs, as explained in the Material and Methods section. The QTL with marker gHbCIR215 is identical to that identified on g11 by Lespinasse *et al.* (2000b) for four strains. The QTL with marker peak M613 has never been previously mentioned. Interestingly, this QTL colocalized with a cluster of R-gene homologous RFLP markers.

For RT, two other significant minor QTLs had already been identified with MQM on linkage groups g14 and g16 (Table 3). The QTL on g16 has already been identified by Lespinasse *et al.* (2000b) for the nonsporulating strain G70.

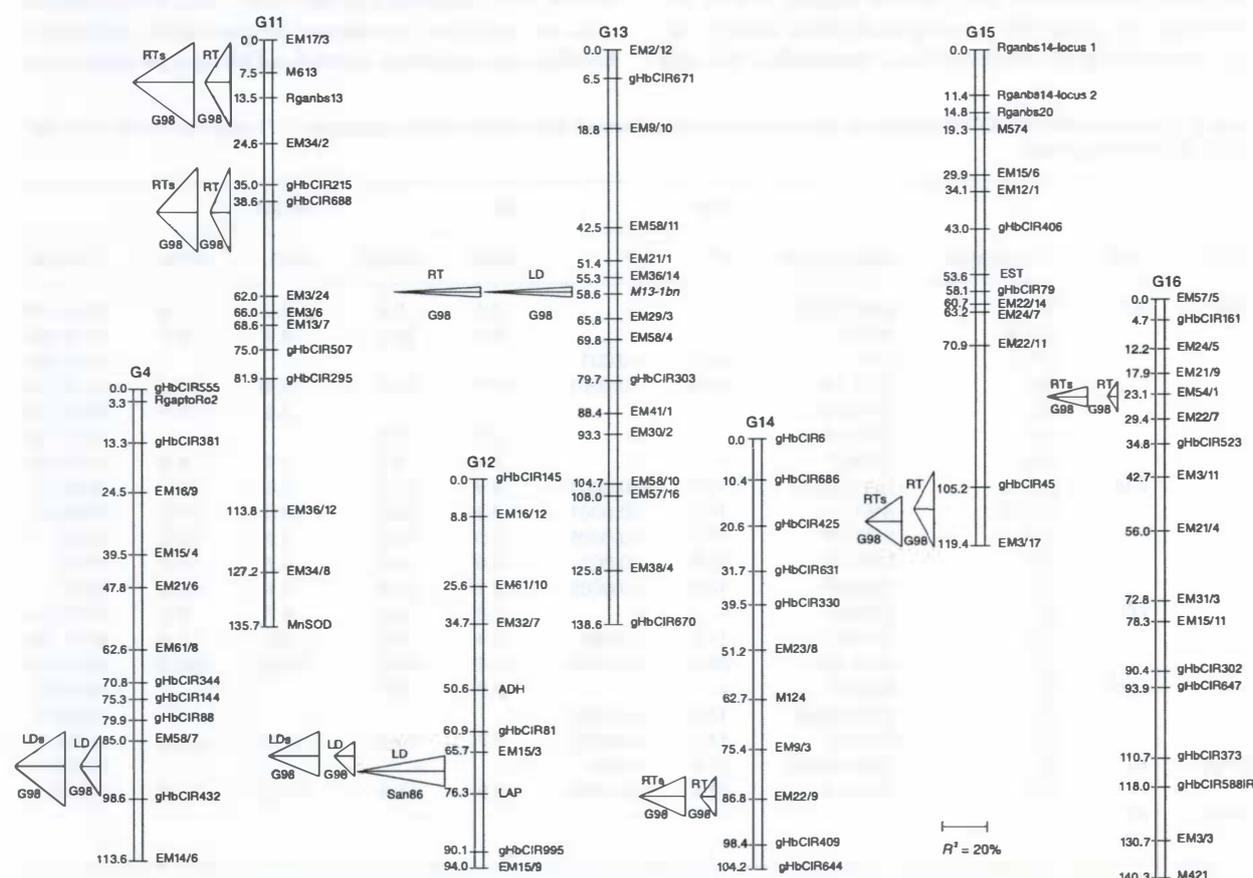


Fig. 2 Resistance quantitative trait loci (QTLs) identified on the RO 38 cultivar map for two components of quantitative resistance (resistance type (RT) and lesion diameter (LD)) to two *Microcyclus ulei* strains (G98, San86) inoculated under controlled conditions. From the linkage groups of the RO 38 *Hevea brasiliensis* × *H. benthamiana* cultivar, only those carrying resistance loci are represented. Distances (in cM) and names of markers are indicated on the left and right sides, respectively, of the linkage groups. Lengths of triangle bases represent confidence intervals corresponding to a LOD diminution of 1 on either side of the likelihood peak. Heights of the triangles represent the contribution of the QTL to the observed phenotypic variance of the trait. LDs and RTs represent LD and RT traits scored on the susceptible part of the progeny lacking the resistance allele at the *M13-1bn* locus. The molecular markers are named under the following code: gHbCIR# for RFLP with *Hevea PstI* library probes; Rga# for RFLP with homologous resistance sequences used as probes; EM#/# for AFLP; and M# for microsatellite, including the Mn superoxide dismutase (MnSOD) locus mapped using microsatellite polymorphism. EST, LAP and ADH are three isozyme markers.

The QTL on g14 was not detected under controlled conditions by Lespinasse *et al.* (2000b). However, this QTL has been identified for its efficiency against infection under natural conditions measured with another parameter: the presence of stromata which corresponds to the sexual stage in the biological cycle of the fungus (Le Guen *et al.*, 2003). The presence of stromata is an important resistance parameter (Chee *et al.*, 1985) that can only be measured in the field, several weeks after infestation.

A significant QTL was also detected for LD on linkage group g12 near marker EM15/3 (LOD score 4.5 with MQM). This QTL could be identified as the one detected by Lespinasse *et al.* (2000b) close to the LAP isozyme marker, if we refer to the earlier assertion of uniqueness of two QTLs located within a 20 cM interval. It was previously identified for LD with the four nonsporulating strains, but not with the weakly sporulating strain. The LOD value registered in our study for this QTL (4.5) matches those previously scored for the same QTL by Lespinasse *et al.* (2000b). Another significant QTL was detected for LD on linkage group g4 close to the marker EM58/7, with a LOD score of 3.7 (MQM procedure). This QTL could be related to a significant QTL already identified with the Una2 strain, and also to a putative QTL with the G77 strain (both for LD), peak marker gHbCIR88 (Lespinasse *et al.*, 2000b).

QTL detection on the subsample of susceptible progeny individuals (RTs and LDs, Table 3) allows more confident results to be obtained for minor QTLs. QTL detection in the vicinity of *M13-1bn* is not possible, as *M13-1bn* is monomorphic, and segregation of flanking markers is highly skewed towards resistance-associated alleles on this subsample of progeny individuals. For RT, five QTLs were found to be significant in MQM analysis (Table 3). From the five corresponding peak markers, the 'automatic selection of cofactors' option in MapQTL allowed for three possible cofactors to be retained: M613, EM22/9 and EM54/1. We tested the three markers as single cofactors in subsequent MQM analyses, and the maximum LOD-score values and the corresponding cofactors are given in Table 3. For RT, all the QTLs found to be significant or putative on the complete progeny are significant in the analysis on the susceptible subsample, illustrating the negative effect on QTL detection of the presence of the major QTL on g13. It is worth noting the QTL near marker EM3/17 on g15, which appeared as a putative one on the whole segregating population and became significant on this subsample of susceptible progeny individuals. For LD, the QTL on g12 is confirmed on the susceptible progeny individuals, but the minor QTL on g4 does not appear any more.

**Strain San86.** Considering the low value of broad-sense heritability for RT, it was not expected to be able to characterize efficient resistance QTLs for this parameter. In fact, no significant QTL was detected for RT with any of the three procedure analyses. For LD, a QTL very close to the one already detected

for the strain G98 on the linkage group g12, marker EM15/3 was identified, but with a much higher LOD score of 12.9 and a contribution to phenotypic variance of 33.6%. This QTL was confirmed by MQM procedure, as well as KW test (chi-square value of 51.6).

A putative QTL on g2 (peak marker gHbCIR540) was identified for RT with a probability value < 0.001 (Table 3). This QTL can be considered as putative, as a significant QTL at a neighbour position was identified for RT in the field condition by Le Guen *et al.* (2003).

**Strain Pmb34.** No QTL was detected for either RT or LD, even as putative ones. Whatever the method used for QTL detection, interval mapping, nonparametric test or multiple QTL model, no locus contributed to the resistance of the studied progeny to the strain Pmb34.

## Discussion

Our results do not reveal genetic transgression for any fungus strain or resistance parameter, and no significant QTL was detected from the susceptible parent PB 260. In the case of partial resistance, the transgressive segregation observed for progeny individuals with lower RT or LD values than for the RO 38 parent seems to be the result of experimental errors or environment interaction. Lespinasse *et al.* (2000b) also observed phenotypic transgression with the weakly sporulating strain G77, without genetic transgression. In contrast, the authors identified one significant QTL from the susceptible PB 260 parent, for one nonsporulating strain (G70). However, as a general rule, no transgressive segregation can be observed for nonsporulating strains, as the resistant RO 38 parent reaches the minimum values for both resistance parameters analysed.

The potential range of variation for the scoring scales is 1–6 for RT and 0.5–7 for LD. With almost no quantitative difference for RT between susceptible and resistant parents after inoculation with San86 or Pmb34, finding QTL controlling this trait was not expected, unless a large transgressive segregation could be found in the segregating population. It was, however, necessary to check this absence of efficient QTL experimentally, as we did in the present study. On the other hand, phenotypic differences between parental forms for LD were sufficient (2.0–7.0 for San86, 5.1–7.0 for Pmb34) to expect significant QTLs to be found. One QTL was actually found for this trait with San86 but not with Pmb34, the later case certainly owing to difficulties in standardizing the inoculation process. As a consequence of the very small variation for this trait, correlation between replicates was reduced, which led to a low heritability.

The low heritability observed for the highly sporulating strains San86 and Pmb34 implies that it would be necessary to increase the population size to improve the power of QTL detection. An increased size of the segregating population

would also be useful for other strains such as G70 or G98. Indeed, our results show that the analysis on the subsample of susceptible progeny individuals has equivalent QTL detection power to analysis on the complete progeny, in accordance with the theoretical work of Lebowitz *et al.* (1987). Molecular marker genotyping could also be restricted to half of the enlarged progeny, allowing a considerable reduction of the experimental costs.

Eight significant QTLs were detected in the present work, of which six had already been identified for resistance to other isolates, and another for resistance to natural inoculum in French Guiana: a major QTL with predominant effect under either controlled conditions or natural infestation (close to marker *M13-1bn* on g13); a QTL with efficiency against four other strains (near marker EM15/3 on g12); two QTLs with efficiency against three other strains (between markers gHbCIR45 and EM3/17 on g15, and close to marker gHbCIR215 on g11); two QTLs whose efficiency has, until now, only been significantly established against one strain (near marker EM58/7 on g4 and near marker EM54/1 on g16); and a QTL until now only described in a field experiment under natural infestation (near marker EM22/9 on g14). The only newly detected QTL is that located on g11, near marker M613. Various authors have recently studied the question of false QTLs and tried to establish procedures aimed at estimating the false discovery rate of QTLs (Bernardo, 2004; Fernando *et al.*, 2004). In one such study (Lee *et al.*, 2002), it was demonstrated that, whatever the method used to determine the comparison-wide error rate, multiple-trait testing procedures always resulted in fewer declared QTLs, and consequently reduced the false discovery rate. In the present work we did not apply a rigorous multiple-trait testing procedure. However, considering that all but one of the declared resistance QTLs have already been described in independent experiments with other strains or even under other experimental conditions, we are confident in the existence and efficiency of these QTLs.

### Bypassing of the resistance to SALB

After the analysis of genetic resistance to nonsporulating and weakly pathogenic strains of *M. ulei* (Lespinasse *et al.*, 2000b), the present study focused on resistance to weakly, highly and very highly pathogenic fungus strains. The methodological choice we made, inoculating the same genotypes and using the same genetics markers of a saturated linkage map as for the previous study, allowed a rigorous comparison between the QTLs detected in both cases.

The overall results of these two studies are summarized in Table 4, where strains are classified in four categories according to their degree of pathogenicity. It thus became possible to underline similarities within a category and differences between categories.

No genetic difference is discernible between resistance to the four nonsporulating strains and resistance to the weakly

sporulating strain G98. In both cases, the major QTL, *M13-1bn*, and several minor QTLs are efficient. Surprisingly, differences appear to be much more important between resistances to the two weakly sporulating strains, resistance to G77 being characterized by the efficiency of the only *M13-1bn* major resistance locus (not considering the putative QTL on chromosome g4). Finally, the common feature of interaction between RO 38 and the two highly pathogenic strains is the complete absence of efficient QTLs for RT, the only efficient QTL being the one on g12 for LD, strain San86. However, it should be discussed whether this complete absence of efficient QTLs for RT is the reality or whether an eventual efficiency of minor QTLs was not detected because of the experimental design (population size, accuracy of measures and environment factors). Considering that, for the strain G98, it was possible to detect the efficiency of minor QTLs on a subsample of 81 progeny individuals without the resistance allele in *M13-1bn*, we can be confident that if minor QTLs were efficient on RT for San86 (apart from the putative one on chromosome g2) or Pmb34, they would have been detected on a sample of 168 progeny individuals. It is thus likely that strain Pmb34 succeeded in overcoming every resistance QTL of RO 38 declared efficient for both RT and LD, as also did strain San86, except for the QTL EM15/3 on g12 for LD.

Although strains G77 and G98 appear very similar for their pathogenicity on the studied population, their potential evolution could be quite different in natural conditions. A simple overcoming of the major resistance QTL *M13-1bn* would be enough for G77 to become a highly sporulating strain. These genetic differences between G77 and G98 are an illustration of the high degree of variability within populations of *M. ulei* even when isolates are apparently identical for their pathogenicity, and also of the fact that a partial resistance is not a guarantee of a sustainable resistance.

Complete resistance in the *M. ulei*–*Hevea* interaction was characterized by necrotic or chlorotic lesions without production of any kind of spores (Junqueira *et al.*, 1988). This type of interaction is frequently referred to as a hypersensitive reaction (HR) of foliar tissues which contributes to stop the infection process at an early stage (Hashim & Pereira, 1989; Garcia *et al.*, 1995). A conservative amount of 10 significant resistance QTLs have been identified by Lespinasse *et al.* (2000b), Le Guen *et al.* (2003) and in the present study (Table 4). Complete resistance of RO 38 is reached when favourable alleles are present at least at the *M13-1bn* locus and also at other ancillary minor QTLs. Previous results for field resistance (Le Guen *et al.*, 2003) led some to consider *M13-1bn* as a resistance gene that could be involved in a gene-for-gene interaction (Flor, 1971; Kolmer, 1996), and that efficiency of other minor resistance QTLs could be conditioned by an eventual recognition reaction triggered by *M13-1bn*. However, this hypothesis is not sufficient to explain our present results, where minor QTLs are still efficient in the absence of the favourable allele at the major resistance gene *M13-1bn* (RTs and LDs when

**Table 4** Synthesis of detected quantitative trait loci (QTLs) for two components of resistance to nonsporulating, weakly sporulating and highly pathogenic strains of *Microcyclus ulei* in F1 progeny (PB 260 × RO 38) on the RO 38 linkage map

Linkage group	Closest markers		Four nonsporulating strains <sup>a</sup>		G98		G77 <sup>a</sup>		San86		Pmb34	
			RT	LD	RT	LD	RT	LD	RT	LD	RT	LD
g2	gHbCIR393	LOD <sup>b</sup>	3.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		R <sup>2</sup> (%) <sup>c</sup>	18 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
g2	gHbCIR540	K <sup>d</sup>	–	–	–	–	–	–	10.9 <sup>f</sup>	–	–	–
		P <sup>e</sup>	–	–	–	–	–	–	<0.001	–	–	–
g4	gHbCIR88	LOD	–	3.3	–	4.0	–	2.4 <sup>f</sup>	–	–	–	–
	EM58/7	R <sup>2</sup> (%)	–	7 (1)	–	8.7	–	9.0	–	–	–	–
g10	EM36/7	LOD	3.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		R <sup>2</sup> (%)	9 (1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
g11	gHbCIR215	LOD	3.8–6.3	–	4.2	–	–	–	–	–	–	–
	EM3/24	R <sup>2</sup> (%)	8–10 (3)	–	7.8	–	–	–	–	–	–	–
g11	M613	LOD	–	–	4.0	–	–	–	–	–	–	–
		R <sup>2</sup> (%)	–	–	18.8	–	–	–	–	–	–	–
g12	EM15/3	LOD	–	3.8–4.8	–	4.5	–	–	–	12.9	–	–
	LAP	R <sup>2</sup> (%)	–	7–13 (4)	–	7.6	–	–	–	33.5	–	–
g13	M13-1bn	LOD	8.2–11.6	7.1–18.4	15.4	15.4	15.1	7.6	–	–	–	–
	EM36/14	R <sup>2</sup> (%)	13–22 (4)	16–36 (4)	34.3	34.2	34	18	–	–	–	–
g14	EM22/9	LOD	–	–	3.9	–	–	–	–	–	–	–
		R <sup>2</sup> (%)	–	–	7	–	–	–	–	–	–	–
g15	gHbCIR45	LOD	8.8–15.3	–	3.8	–	–	–	–	–	–	–
	EM3/17	R <sup>2</sup> (%)	15–26 (3)	–	13.4	–	–	–	–	–	–	–
g16	EM54/1	LOD	3.9	–	3.7	–	–	–	–	–	–	–
	gHbCIR161.L2	R <sup>2</sup> (%)	12 (1)	–	12.5	–	–	–	–	–	–	–
Number of significant QTLs			6	3	6	3	1	1	0	1	0	0
Phenotype of the <i>M. ulei</i> strains				NS		WS		WS		HP		VHP

HP, highly pathogenic; LD, lesion diameter; NS, nonsporulating; RT, reaction type; VHP, very highly pathogenic; WS, weakly sporulating.

<sup>a</sup>From Lespinasse *et al.* (2000b). Numbers in brackets are the number of strains for which this QTL has been detected. All these values are from the RO 38 map on the whole population, except for the QTL on linkage group g16, which was detected with analysis of the F1 consensus map.

<sup>b</sup>LOD score value.

<sup>c</sup>Proportion of the explained phenotypic variance.

<sup>d</sup>Kruskal–Wallis value.

<sup>e</sup>Probability associated with *K*-value.

<sup>f</sup>Putative QTL (LOD < 2.9 or 0.0005 < *P* < 0.001).

infected by G98), or when this allele is no more efficient (LD when infected by San86). These results illustrate the complexity of the *M. ulei*–*Hevea* pathosystem, where a complete resistance is reached when favourable alleles are present at various loci (major resistance gene and QTLs), and partial resistance may be the result of the simultaneous presence of one to eight QTLs. Furthermore, none of these 10 QTLs is effective when infection occurs with a highly pathogenic strain like Pmb34. This clearly means that the type of resistance brought by the RO 38 parent, although outstandingly efficient in some particular locations (Le Guen *et al.*, 2003), is not directly useful for producing varieties adapted to locations where natural inoculum contains isolates with the same pathogenicity as Pmb34.

This complex situation, where no clear relationship can be established between number of resistance factors and specificity vs nonspecificity or partial vs complete or sustainable vs

temporary resistance, has already been described for other pathosystems involving woody perennial crops. For instance, resistance of apple tree to scab (*Venturia inaequalis*) has been demonstrated to be under monogenic or polygenic control with various major resistance genes already identified (Olivier & Lespinasse, 1982). Some of these major resistance genes colocalize with resistance gene analogues (Calenge *et al.*, 2005). A single cultivar can carry both a major resistance gene and various resistance QTLs (Durel *et al.*, 2003), or broad-spectrum and isolate-specific QTLs (Calenge *et al.*, 2004). Resistance of poplar (*Populus* spp.) to rust (*Melampsora* spp.) can also be under polygenic control (Prakash & Heather, 1989; Lefevre *et al.*, 1994; Villar *et al.*, 1996) or monogenic control (Cervera *et al.*, 1996; Tabor *et al.*, 2000). Recent studies have also shown that a major *Melampsora* resistance factor had a beneficial effect on several components of quantitative resistance to various strains (Jorge *et al.*, 2005).

The clone RO 38 has been planted in the Brazilian state of Bahia since the 1970s in small-scale clonal trials. Later, it was recommended for planting over large areas in central and western Brazilian states (Gasparotto & Lim, 1984) and several hundred hectares of this clone are now in production in Mato Grosso state. In French Guiana, the area planted with this clone is very small, not exceeding a few hectares. Comparison of the host specificity of strain Pmb34 with that of 51 strains originating from Bahia state (Mattos *et al.*, 2003) on seven *Hevea* spp. differentiating clones common to both studies led to the conclusion that three of these 51 strains have the same virulence factors as Pmb34. Furthermore, 30 of these 51 strains were able to sporulate on clone RO 38. The strain Pmb34 can thus be considered as an emerging race representative of a type becoming predominant among natural inoculum of Bahia state. A similar evolution could be under way in the north of Mato Grosso where the strain San86 was prospected, and where RO 38 is more abundant than in Bahia state. In French Guiana, the natural inoculum seems to have been restricted, until now, to nonsporulating or weakly sporulating strains on RO 38. The lack of information about the pathogen, and particularly the absence of systematic sampling and testing of new isolates from various parts of the rubber-growing areas of Latin America, does not allow further speculation about the durability of RO 38 resistance. There is, however, a risk of emergence of Pmb34-like pathotypes in Mato Grosso and other central states of Brazil, as occurred in the state of Bahia.

In our case, although the highly pathogenic strain Pmb34 was able to overcome the 10 resistance factors identified in this and previous studies, it is noticeable that for other cultivars this same strain is merely able to sporulate weakly, or does not present any sporulation at all (Table 1). This fact clearly indicates that these cultivars carry efficient resistance factors (either qualitative or quantitative), which were not overcome by Pmb34 until now. Combining these efficient resistance factors from various sources would theoretically be the safer way to enlarge the spectrum of resistance, but for this more knowledge on other resistance factors and also on diversity of the pathogen is needed. Studies of pathogenic variability of numerous strains of *M. ulei*, when inoculated on a host range of rubber tree cultivars (Mattos *et al.*, 2003), must be completed with an exact determination of virulence factors as for the *Melampsora*-*Populus* pathosystem (Pinon & Frey, 1997). Characterization of genetic polymorphism of the pathogen has been initiated (Le Guen *et al.*, 2004) and must be continued for a better comprehension of genetic differences between isolates with apparently similar phenotypes (e.g. G77 and G98). Finally, other studies of progenies issuing from parents with confirmed sustainable resistance or with monogenic resistance are in progress in Brazil and French Guiana, which will undoubtedly lead to the identification of new resistance factors that may be tentatively combined with those carried by RO 38.

## Acknowledgements

This work was carried out as part of a common project between the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad) and the Michelin rubber tree plantations in Brazil. It was mainly supported by funding from the French government (SCSP-Cirad). We thank B. Courtois for critical review of the manuscript. The experiments comply with the current laws of France where the experiments were performed.

## References

- Bernardo R. 2004. What proportion of declared QTL in plants are false? *Theoretical and Applied Genetics* 109: 419–424.
- Bos H, McIndoe KG. 1965. Breeding of *Hevea* for resistance against *Dothidella ulei* P. Henn. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaya* 19: 98–107.
- Brown JKM. 2003. Little else but parasites. *Science* 299: 1680–1681.
- Calenge F, Faure AGM, Gebhardt C, Van de Weg WE, Parisi L, Durel CE. 2004. Quantitative trait loci analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for SCAB resistance in apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94: 370–379.
- Calenge F, Van der Linden CG, Van de Weg E, Schouten HJ, van Arkel G, Denancé C, Durel CE. 2005. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 660–668.
- Cervera MT, Gusmao J, Steenackers M, Peteman J, Storme V, Broeck AVD, Montagu AV, Boerjan W. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *populus*. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 733–737.
- Chee KH, Darmono TW, Kai-ming Z, Lieberei R. 1985. Leaf development and spore production and germination after infection of *Hevea* leaves by *Microcyclus ulei*. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia* 33: 124–137.
- Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963–971.
- Durel CE, Parisi L, Laurens F, Van de Weg WE, Liebhard R, Jourjon MF. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome* 46: 224–234.
- Fernando RL, Nettleton D, Southey BR, Dekkers JCM, Rothschild MF, Soller M. 2004. Controlling the proportion of false positives in multiple dependent tests. *Genetics* 166: 611–619.
- Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 8: 275–296.
- García D, Cazaux E, Rivano F, Auzac Jd. 1995. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight. *Hevea* spp. *European Journal of Forest Pathology* 25: 282–292.
- Gasparotto L, Lim TM. 1984. Research on SALB (*Microcyclus ulei*) in Brazil – recent progress. *International SALB Workshop, CEPLAC/CEPEC, Itabuna, August 1984*. Itabuna, Brazil: CEPLAC/CEPEC, 1–19.
- Gasparotto L, Lima MIPM. 1991. Research on South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) of rubber in Brazil. *Indian Journal of Natural Rubber Research* 4: 83–90.
- Gonçalves PS. 1981. *Expedição internacional à Amazonia no território federal de Rondônia para a coleta de material botânico de seringueira Hevea brasiliensis*. Manaus, Brazil: Embrapa – CNPDS.
- Hashim I, Pereira JCR. 1989. Influence of resistance of *Hevea* on development of *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research* 4: 212–218.
- Jansen RC. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205–211.

- Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C. 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* 167: 113–127.
- Junqueira NTV, Chaves GM, Zambolim L, Alfenas AC, Gasparotto L. 1988. Reação de clones de seringueira a varios isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 23: 877–893.
- Junqueira NTV, Kalil Filho AN, Trindade DR. 1987. Fatores relacionados com a resistência da seringueira ao mal-das-folhas. *Pesquisa Em Andamento* 54: 1–6.
- Junqueira NTV, Lieberei R, Kalil Filho AN, Lima MIPM. 1990. Components of partial resistance in *Hevea* clones to rubber tree leaf blight, caused by *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira* 15: 211–214.
- Kolmer JA. 1996. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology* 34: 435–455.
- Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- Le Guen V, Garcia D, Mattos CRR, Clément-Demange A. 2002. Evaluation of field resistance to *Microcyclus ulei* of a collection of Amazonian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2: 141–148.
- Le Guen V, Lespinasse D, Oliver G, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M. 2003. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 160–167.
- Le Guen V, Rodier-Goud M, Troispoux V, Xiong T-C, Brottier P, Billot C, Seguin M. 2004. Characterization of polymorphic microsatellite markers for *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight of rubber trees. *Molecular Ecology Notes* 4: 122–124.
- Lebowitz RJ, Soller M, Beckmann JS. 1987. Trait-based analyses for the detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 73: 556–562.
- Lee H, Dekkers JCM, Soller M, Malek M, Fernando RL, Rothschild MF. 2002. Application of the false discovery rate to quantitative trait loci interval mapping with multiple traits. *Genetics* 161: 905–914.
- Lefèvre F, Pichot C, Pinon J. 1994. Intra- and interspecific inheritance of some components of the resistance to leaf rust (*Melampsora larici-populina* Kleb.) in poplars. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 501–507.
- Lespinasse D, Grivet L, Troispoux V, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M. 2000b. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 975–984.
- Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M. 2000a. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 127–138.
- Lins ACR, Silva G, Pd Nicolas D. 1981. Report of the Acre team in joint IRRDB/Brazil germplasm expedition. Manaus, Brazil: Embrapa/CNPDS.
- Mattos CRR, Garcia D, Pinard F, Le Guen V. 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 28: 502–507.
- Olivier JM, Lespinasse Y. 1982. Résistance du pommier à la tavelure *Venturia inaequalis* (CKE.) Wint. Sources de résistance, comportement du parasite, programme de sélection. *Cryptogamie, Mycologie* 3: 361–375.
- Paiva J, Rd. 1981. *Coleta de material sexuado e assexuado nos seringaís nativos do Estado de Mato Grosso*. Manaus, Brazil: Embrapa/CNPDS.
- Peralta AM, Furtado EL, Amorim L, Menten JOM, Bergamin Filho A. 1990. Melhoramento para resistência ao mal das folhas da seringueira: revisao. *Summa Phytopathologica* 16: 214–224.
- Pinon J, Frey P. 1997. Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *European Journal of Plant Pathology* 103: 159–173.
- Prakash CS, Heather WA. 1989. Inheritance of partial resistance to two races of leaf rust, *Melampsora medusae*. Eastern cottonwood, *Populus deltoides*. *Silvae Genetica* 38: 90–94.
- Rivano F. 1992. *La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa. Etude, en conditions naturelles et contrôlées, des composants de la résistance partielle à Microcyclus ulei (P. Henn.)*. Arx, France: Université de Paris-Sud, centre d'Orsay, 1–232.
- SAS Institute. 2001. *SAS/STAT user's guide*, version 8.02, Vol. I, II, III. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Tabor GM, Kubisiak TL, Klopfenstein NB, Hall RB, MacNabb HSJ. 2000. Bulk segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides*. *Phytopathology* 90: 1039–1042.
- Townsend CHT. 1960. Progress in developing superior hevea clones in Brazil. *Economic Botany* 14: 189–196.
- Van Ooijen JW. 1999. LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity* 83: 613–624.
- Van Ooijen JW. 2004. *MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations*. Wageningen, the Netherlands: Kyazma BV.
- Villar M, Lefèvre F, Bradshaw HDJ, Teissier du Cros E. 1996. Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Melampsora larici-populina* Kleb/ *Populus* sp.) by bulk segregant analysis in a 2x2 factorial mating design. *Genetics* 143: 531–536.

## Conclusions et perspectives

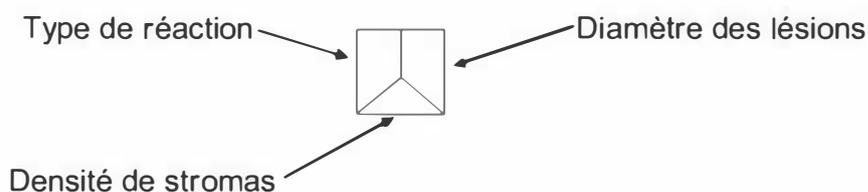
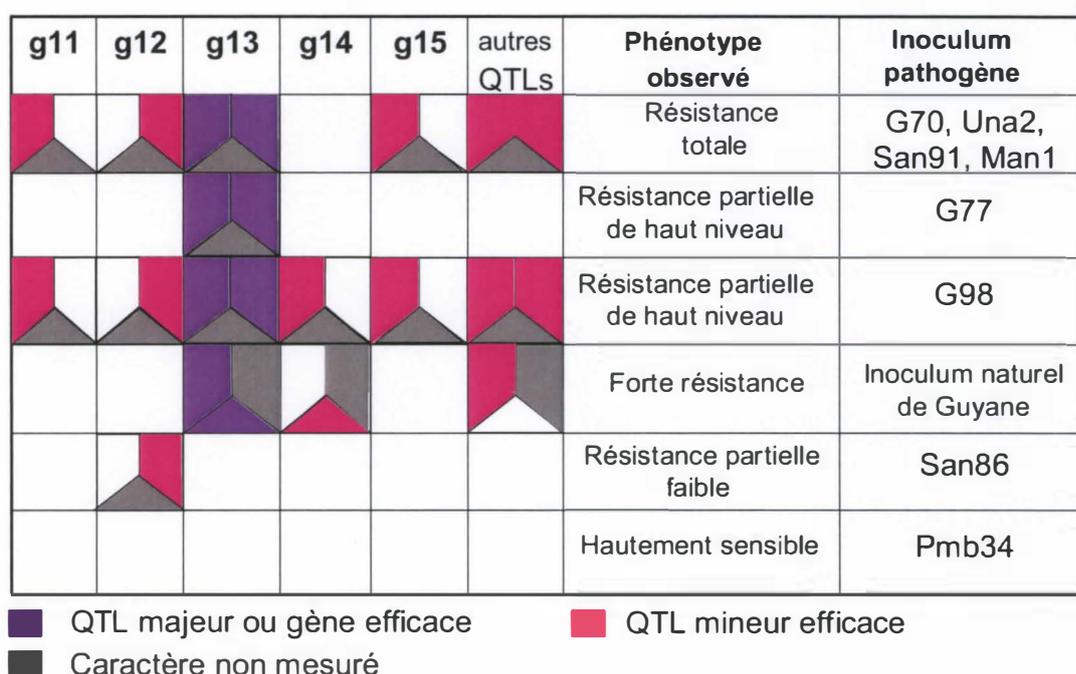
L'inoculation de trois nouvelles souches sur la descendance du croisement PB 260 x RO 38 a permis de mettre en lumière la complexité de la résistance du génotype RO 38, héritée de son parent *H. benthamiana*.

Quatre résultats majeurs peuvent être dégagés de cette étude (Figure 2.1).

1. Le même phénotype de résistance partielle de haut niveau, observé après inoculation par la souche G77 ou par la souche G98, ne met pas en jeu l'efficacité des mêmes QTLs. Dans le premier cas, seul le QTL majeur en g13 est efficace, alors que dans le second cas, six autres QTLs mineurs additionnels sont également efficaces.
2. Le QTL majeur en g13 est efficace à la fois sur le diamètre de lésions, sur le type de réaction et sur la densité de stromas. Les QTLs mineurs, en revanche ne sont généralement efficaces que sur un seul des composants de la résistance, à l'exception du QTL se trouvant sur le groupe de liaison g14, efficace à la fois pour le type de réaction avec la souche G98, et pour la densité de stromas en conditions naturelles d'infestation en Guyane.
3. L'absence d'efficacité du QTL majeur en g13 se traduit par une faible résistance voire une forte sensibilité. Ce QTL joue donc bien un rôle important dans l'expression de la résistance de RO 38.
4. Certaines souches, comme Pmb34 peuvent contourner simultanément tous les QTLs de résistance apportés par RO 38. La résistance polygénique de RO 38, qui peut dans certains cas procurer une résistance totale (souches G70, Una2, San91, Man1), peut aussi se révéler totalement inefficace.

Les modèles courants d'interaction hôte/pathogène ne rendent pas compte de façon satisfaisante des résultats obtenus ici. Une résistance totale n'est pas synonyme de résistance monogénique, une résistance partielle de haut niveau peut être monogénique, et une résistance polygénique peut être contournée par le pathogène. En conséquence il est difficile de prédire la durabilité d'une résistance dans le cas du pathosystème *M. ullei/Hevea*, même en ayant identifié les principaux facteurs génétiques de cette résistance. Un processus d'amélioration variétale efficace pour ce qui concerne la résistance au SALB ne peut pas faire l'économie d'une connaissance approfondie du comportement des génotypes ou cultivars possédant les résistances que l'on souhaite utiliser. Puisque l'identification des facteurs génétiques qui conditionnent la résistance d'un cultivar ne suffit pas à inférer ni l'universalité ni la durabilité

de cette résistance, il est nécessaire que des observations de terrain soient pratiquées dans des environnements les plus diversifiés possibles et sur une longue durée afin de repérer des résistances que l'on espère pouvoir utiliser dans un processus classique de sélection. Ce n'est qu'après avoir vérifié l'universalité d'une résistance (c'est-à-dire son maintien face à une gamme d'isolats la plus diversifiée possible) et son caractère durable en conditions naturelles d'infestation que l'on pourra envisager d'identifier les facteurs génétiques qui la conditionnent afin de les utiliser dans le cadre d'une sélection assistée par marqueurs (SAM).



**Figure 2.1.** Efficacité des différents locus de résistance en fonction de la nature de l'inoculum

### **Chapitre 3 - Détection de nouveaux facteurs génétiques liés à une résistance durable au SALB chez le cultivar MDF180**

Nous avons vu au chapitre précédent que l'identification des facteurs génétiques d'une résistance au SALB n'était pas une condition suffisante pour prédire l'universalité et la durabilité de cette résistance. L'objectif des généticiens et sélectionneurs étant la création de cultivars possédant une résistance durable alliée à un potentiel élevé de production en caoutchouc, la stratégie la plus appropriée semble donc (i) d'identifier un (des) génotype(s) présentant les caractéristiques de résistance recherchées ; (ii) de caractériser les facteurs génétiques qui sous-tendent cette résistance et de les localiser dans le génome au moyen de marqueurs moléculaires et (iii) de transférer tout ou partie de ces facteurs génétiques de résistance dans un fonds génétique issu de cultivars à fort potentiel de production.

Nous nous proposons dans ce chapitre de répondre aux points (i) et (ii) mentionnés ci-dessus en ce qui concerne un cultivar encore assez peu connu, bien que planté depuis plus de 30 ans : le clone MDF180. Ce clone est le résultat de la multiplication par greffage d'un arbre directement issu d'une population sauvage de la région de Madre de Dios, en Amazonie péruvienne. Comme il sera vu dans le chapitre 4, la population constituée d'arbres originaires de cette région est génétiquement très proche d'autres populations brésiliennes des états voisins de l'Acre et du Rondônia. Ces populations ont par ailleurs montré une forte proportion d'individus possédant un haut niveau de résistance au SALB (Le Guen et al 2002). Un certain nombre d'individus de ces diverses populations du Madre de Dios, de l'Acre et du Rondônia, sont rassemblés dans une collection *ex situ* à Combi.

La stratégie que nous comptons développer consiste à caractériser la résistance durable de MDF180, à localiser les gènes ou QTLs de résistance au moyen de marqueurs moléculaires, puis à rechercher la présence d'allèles de résistance au sein des populations disponibles en collection par génétique d'association dans les régions génomiques ainsi définies.

Ce chapitre sera donc divisé en deux parties, la première sous forme d'article à paraître dans la revue *Crop Protection* s'attachera à décrire la résistance du clone MDF180, et la seconde partie relatara la cartographie des facteurs génétiques impliqués dans cette résistance. Le travail de cartographie sur une descendance du clone MDF 180 présenté au cours de ce chapitre est réalisé dans le cadre du projet ANR-Génoplante "GENESALB" conduit en

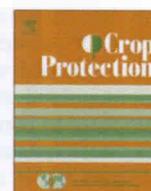
partenariat avec la société Michelin, le Cirad et l'Université d'Etat Santa Cruz (UESC) d'Ilheus dans l'état de Bahia au Brésil.

### 3.1. Article accepté pour publication dans la revue *Crop Protection*



Contents lists available at ScienceDirect

## Crop Protection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cropro](http://www.elsevier.com/locate/cropro)

## Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph

Vincent Le Guen<sup>a,\*</sup>, Jean Guyot<sup>b</sup>, Carlos Raimundo Reis Mattos<sup>c</sup>, Marc Seguin<sup>a</sup>, Dominique Garcia<sup>d</sup>

<sup>a</sup>CIRAD, UMR DAP, Avenue Agropolis, TA A-96/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France

<sup>b</sup>CIRAD, UPR Bioagresseurs de pérennes, BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana

<sup>c</sup>Plantações Michelin da Bahia, Cx. Postal 2, CEP 45435-000 Ituberá, BA, Brazil

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod Ilhéus – Itabuna, Km 16, Barrio Salobrinho, CEP 45.662-000 Ilhéus, BA, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 December 2007

Received in revised form 22 July 2008

Accepted 22 July 2008

## Keywords:

*Hevea brasiliensis*

South American leaf blight

Partial resistance

Durable resistance

## ABSTRACT

The resistance of the MDF 180 *Hevea brasiliensis* cultivar to South American leaf blight caused by *Microcyclus ulei* has been studied under both controlled conditions of inoculation, and under natural infestation in the Brazilian state of Bahia. Inoculated isolates on this cultivar in most cases developed sporulating lesions and produced conidiospores, but at a moderate level, characteristic of a race non-specific, partial resistance. The teleomorph of *M. ulei* has never been reported on this cultivar, either in controlled conditions or in natural infestation, whereas it is commonly observed on other susceptible cultivars. This type of resistance has seldom been described for other pathosystems. MDF 180 resistance having also endured for more than 30 years in areas very conducive to the disease can, therefore, be described as a durable resistance. Rubber productivity of this cultivar is not sufficient to allow planting on industrial scale, but its resistance characteristics make it a good progenitor candidate for rubber tree resistance breeding programs.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

South American Leaf Blight (SALB) caused by an Ascomycota fungus, *Microcyclus ulei*, is the most severe disease affecting *Hevea* spp. Its occurrence in nearly all rubber tree growing areas of Central and South America is a major impediment to natural rubber production expansion in this part of the world. Since all high yielding Asiatic clones are, without any exception, highly susceptible to SALB, its accidental introduction in West Africa or South East Asia would result in devastating economic consequences for millions of smallholders whose main income is based on rubber tree cultivation. Furthermore, as a pathogen of a strategic crop, *M. ulei* has been listed by the U.S. National Research Council as a potential biological weapon (Madden and Wheelis, 2003). Chemical control of this disease is achievable in nurseries and on young trees, but is only marginally economical on adult trees.

The biological cycle of *M. ulei* can be divided into two distinct phases (Chee and Holliday, 1986): the asexual phase produces huge quantities of conidia on the lower side of leaflets, 10–12 d after infection. Sexual structures (perithecia usually in denominated stromata) appear later on the necrotic margin on the upper part of

the leaflets, once the leaves reach maturity. Ascospores are assumed to be produced 1–5 months after infection (Langford, 1945; Holliday, 1970; Chee, 1976), though without experimental evidence. The mating system of *M. ulei*, whether homothallic or heterothallic, remains unknown. Survival of ascospores within stromata during the unfavourable dry season is an important feature (Chee and Holliday, 1986), along with long distance dispersion achieved through small ascospore size.

Genetic resistance against SALB has been sought for more than 50 years. Native *Hevea* trees from various parts of the Amazonian forest have been evaluated, and some of them were very promising when cultivated in *M. ulei* affected areas. Unfortunately, the resistance did not last more than a few years (Lima et al., 1992): presumably resistant *Hevea* clones suffering fungal attacks as severe as observed on known susceptible clones.

A survey carried out in the 1940s in Madre de Dios Peruvian region (Seibert, 1947) has to be singled out among various rubber tree agronomists and geneticists' attempts to enhance SALB genetic resistance in rubber trees. Rubber trees of *Hevea brasiliensis* displaying apparent fair SALB resistance were identified. In 1948, the Ministry of Agriculture of Peru organized jungle seed sampling in this region (Rands and Polhamus, 1955), and 40,000 seedlings provided to Firestone Plantations Co. were grown in Guatemala in a cooperation program with the USDA Rubber Investigations Group (Bos and McIndoe, 1965). Seedlings were evaluated and some of

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 61 55 35; fax: +33 4 67 61 57 93.  
E-mail address: [vincent.le\\_guen@cirad.fr](mailto:vincent.le_guen@cirad.fr) (V. Le Guen).

them demonstrated a high degree of SALB resistance. A generic name, MDF, (standing for "Madre de Dios Firestone"), was given to them. Budwood was sent to Liberia to the Harbel rubber tree plantation, and crosses were carried out with Asiatic clones, attempting to combine this good SALB resistance with the high latex yielding Asiatic clones. Various rubber tree clones were thus evaluated at the nursery stage and the more promising genetic material was sent to the Firestone plantation of Fazenda Três Pancadas (Bahia, Brazil), either as pure MDF clones or crossed with Asiatic clones, for field evaluation. When this plantation was acquired by the Michelin group in the 1980s (and its name changed to "Plantações Michelin da Bahia", or PMB), field trials were still young and available data on resistance performance and yielding potential of these new clones were few. Field evaluation of this material by Michelin agronomists and phytopathologists are still running today. Among all evaluated cultivars, the MDF 180 clone has been noted for its outstanding agronomic performance during SALB epidemic periods for many years. The present paper intends to describe its features regarding SALB resistance. It synthesizes studies carried out by Plantações Michelin da Bahia (Brazil) research department and Cirad research centre of Kourou (French Guiana), as parts of a common research project on SALB.

Brazil is the only country where the MDF 180 clone has been planted on a significant scale, predominantly in the state of Bahia. Rubber tree cultivation was initiated in this state in the 1950s, and plantations were rapidly infected by SALB (Gonçalves, 1968). In an attempt to avoid severe losses due to SALB attacks, rubber tree growers chose to grow diversified clones. Various studies also showed a great diversity of the pathogen in Bahia state (Chee et al., 1986; Mattos et al., 2003). MDF 180 was planted on 852 ha between 1972 and 1997, including 650 ha on the PMB plantation, either as based budded trees or as crown budded on high producing Asiatic trunks. The remaining 200 ha were planted on other plantations, in the neighbouring plantation to the PMB, and in a radius of 300 km from it. Such plantations were all surrounded by various other rubber tree cultivars, most of them more susceptible to SALB than MDF 180, so providing this clone with a regular exposure to a huge natural inoculum.

MDF 180 has also been evaluated in genetic trials planted in the PMB between 1991 and 2004. Ultimately, the MDF 180 clone is also present in a germplasm *ex situ* collection located on the PMB plantation. MDF 180 resistance to *M. ulei* natural infestation was observed on every type of plot: industrial, pre-development, genetic trial and germplasm collection.

## 2. Material and methods

Results presented in this paper were obtained from inoculations under controlled conditions in the PMB plantation and in French Guiana, and from field observations in the PMB plantation.

### 2.1. Inoculation under controlled conditions for test of SALB resistance

Fungal isolates were regularly collected in the field from rubber tree clones representative by their cultivated areas and their resistance performance to SALB, and assessed for their spectrum of virulence under controlled conditions, in order to monitor the high *M. ulei* inoculum diversity in the PMB plantation. Such evaluation was carried out by inoculating a rubber tree host range of nine cultivars, including MDF 180 (Table 1). All nine cultivars, except FX 2784, had already been characterized for their ability to discriminate between *M. ulei* isolates (Junqueira et al., 1988), and all of them, except PA 31, had been planted for latex production purposes on significant areas in the PMB plantation. The present paper presents an analysis based on resistance data of these nine cultivars

**Table 1**  
Genetic background of tested Hevea clones, expressed in proportion of their specific parentage

	Asiatic cv		Primary Brazilian clone	
	<i>H. bras</i>	<i>H. bras</i>	<i>H. benth</i>	<i>H. pauc</i>
FX 2784	0.5	0.5	–	–
FX 985	0.5	0.5	–	–
FX 2261	0.5	0.5	–	–
FX 4098	0.5	0.5	–	–
MDF 180	–	1	–	–
FX 2804	0.5	–	0.5	–
FX 3899	0.5	–	0.5	–
IAN 6158	0.875	–	0.125	–
PA 31	–	–	–	1

*H. bras* = *Hevea brasiliensis*.

*H. benth* = *Hevea benthamiana*.

*H. pauc* = *Hevea pauciflora*.

to 160 isolates. Among these isolates, 113 were collected between 1992 and 2006 on 48 different genotypes in the PMB plantation and the other 47 isolates originated either from field plantations in French Guiana or from other rubber tree growing areas in Brazil (mainly in Mato Grosso and Amazonas states). All these isolates were inoculated on the same set of nine host rubber trees. The evaluation process of clone resistance under controlled conditions, described hereafter, was identical in the PMB plantation (for isolates collected there) and in French Guiana (for the other isolates).

In order to purify isolates collected in the field, conidia obtained from a single lesion were re-inoculated three to four times under controlled conditions, on leaflets of a susceptible clone. For each re-inoculation, we used conidia from a single lesion. The isolates could then either be transferred onto culture medium for long term conservation (Mattos, 1999) or directly used to assess spectra of virulence. Cultures were not derived from single spore inoculation and there was thus no certainty of their genetic homogeneity. In case of conservation on culture medium, isolates were re-activated by inoculation on a very susceptible clone, before being tested on a *Hevea* host range under controlled conditions.

Young trees were clonally propagated by grafting on rootstocks and then grown in a greenhouse. Because dynamics of spore and lesion formation with the age of inoculated leaves has been pointed out (Junqueira et al., 1990; Lieberei, 2007), leaf stage B<sub>2</sub> as described by Halle and Martin (1968) was chosen for inoculation. This leaf stage, considered as the most susceptible, was consequently used by several authors (Junqueira et al., 1986; Hashim and Pereira, 1989; Mattos et al., 2003) for leaf inoculation by *M. ulei*. Plants presenting leaves at this B<sub>2</sub> stage were thus transferred from the greenhouse to the inoculation chamber, enabling a tight control of environmental parameters: temperature of 24° ± 2 °C, r.h. >95%, and a 12:12 h photoperiod.

Conidia were suspended in sterile water with 0.05% Tween 80, and the final concentration was adjusted to 2 × 10<sup>5</sup> conidia ml<sup>-1</sup> (Mattos, 1999). The lower surfaces of three young leaves were inoculated with a conidial suspension, using a Paasche airbrush set. Sporulation was scored 12 d after inoculation on all inoculated leaflets, and trees were then transferred from the inoculation chamber to a greenhouse. Stromata score (as described below) was recorded 3 months after inoculation.

### 2.2. Field trials

Field trials consisted of the survey of a small scale clonal trial where MDF 180 and eight other cultivars used for testing isolate virulence under controlled conditions were present (Table 1) and of an *ex situ* collection made of 190 accessions.

The clonal trial consisted of three replications of 12 trees in randomized blocks. It was planted in 1992 with a 500 trees ha<sup>-1</sup> density, which is the density used for latex production. Trees were assessed for sporulation intensity, stromata and foliar density, at least three times a year, at the beginning, during and at the end of the rainy season, respectively.

In the *ex situ* collection, each accession was represented by 10 trees planted at a 3300 trees ha<sup>-1</sup> density. This high planting density calls for a periodic cutting of all trees to avoid their excessive development and is usually made between 50 cm and 1 m above the grafting junction during the dry season. Branches and leaves are totally eliminated, so that new contaminations always occur with natural inoculum coming from adult rubber trees in the neighbourhood of the collection. This collection was assessed for sporulation intensity and stromata density at least twice a year during the rainy season. Foliar density assessment was not possible in the collection because of high planting density and annual cutting of trees.

### 2.3. Disease assessment

Scoring of sporulation from inoculated plants was performed under a stereo microscope ( $\times 40$ ) using a 1–6 scale for sporulation intensity adapted from Junqueira et al. (1988), where 1 = necrotic non-sporulating lesions, 2 = chlorotic non-sporulating lesions, 3 = slight sporulation on lower side of leaflets, 4 = moderate sporulation on lower side of leaflets, 5 = high sporulation on lower side of leaflets, and 6 = high sporulation on both sides of leaflets. Stromata density was assessed using a 0–4 scale where 0 = no stroma, 1 = 1–5 stromatas per leaflet, 2 = 6–15 stromatas per leaflet, 3 = 16–50 stromatas per leaflet, and 4 = more than 50 stromatas per leaflet. For both sporulation and stromatal ratings, the score for each tree was the highest score observed on its leaflets.

For field evaluation, a global score was given to each tree, corresponding to the leaf with the most severe symptoms, using the above scales.

Foliar density in the field was visually estimated once a year, in November, *i.e.* after refoliation, with comparison to a drawn reference 0–100% scale with a 10% step, as already used by Guyot et al. (2001), where 0% was the total absence of foliage and 100% was the leaf density of a tree with all its branches totally covered by mature leaves.

### 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis of sporulation data observed under controlled conditions was made with Statistica<sup>®</sup> software. An analysis of variance was performed with 'clone' treated as random effect in a general linear model.

## 3. Results

### 3.1. Symptoms observed under controlled conditions

There was a significant difference among clones for their global resistance to the 113 PMB isolates ( $F = 27.9$ ,  $P < 0.001$ ) and to 47 other isolates ( $F = 8.54$ ,  $P < 0.001$ ). An effective production of conidiospores by all 113 *M. ulei* isolates collected on the PMB plantation was observed after inoculation onto MDF 180 indicating that there was no kind of complete resistance to these isolates, either due to a hypersensitive reaction or to other mechanisms (Table 2). On the other hand, the maximum score of 6 for sporulation intensity was never recorded for this clone. Sporulation intensity on cultivar MDF 180 always ranged from 3 to 5, indicating a limited to intense (but not maximal) spore production. On eight other clones of the

**Table 2**

Percentages of scores of sporulation intensity obtained by MDF 180 and eight other *Hevea* cultivars when infected by different isolates of *M. ulei* under controlled conditions of inoculation

Hevea cultivars		FX985	MDF180	FX2261	FX4098	FX2784	FX2804	FX3899	IAN6158	PA31
Score 113 Isolates from PMB plantation (Bahia, Brazil)										
1	38.1	0.0	16.5	9.9	28.3	26.1	32.7	15.0	29.5	
2	13.3	0.0	26.6	5.4	66.4	10.8	5.3	0.9	16.1	
3	13.3	<b>8.2</b>	24.8	16.2	0.0	24.3	22.1	38.9	24.1	
4	13.3	<b>65.5</b>	26.6	46.8	0.0	11.7	20.4	24.8	30.4	
5	8.0	<b>26.4</b>	2.8	15.3	0.0	23.4	8.8	12.4	0.0	
6	14.2	0.0	2.8	6.3	5.3	3.6	10.6	8.0	0.0	
Score 47 Isolates from various locations of Brazil and French Guiana										
1	57.4	12.8	27.7	0.0	30.8	19.6	42.6	6.3	na	
2	19.1	12.8	19.1	0.0	69.2	58.7	27.7	75.0	na	
3	10.6	<b>17.0</b>	14.9	30.8	0.0	4.3	8.5	6.3	na	
4	10.6	<b>40.4</b>	10.6	30.8	0.0	4.3	4.3	12.5	na	
5	0.0	<b>17.0</b>	6.4	7.7	0.0	6.5	4.3	0.0	na	
6	2.1	0.0	21.3	30.8	0.0	6.5	12.8	0.0	na	

1: Necrotic lesion without sporulation; 2: chlorotic lesion without sporulation; 3–5: slight to intensive sporulation on lower side of leaflets; 6: intensive sporulation on both sides of leaflets. na: not available.

differential host range, absence of sporulation was observed for 15.9% (IAN 6158), to 94.7% (FX 2784) of isolates. Furthermore, except for PA 31, scores 5 and 6 were recorded for all other clones. Considering that these 113 isolates collected on 48 rubber tree cultivars, they are assumed to be representative of natural *M. ulei* inoculum in the PMB plantation, so that MDF 180 resistance performance can reasonably be generalized for all isolates of this area.

Sporulation intensity scores reached after inoculation with isolates from other areas of Brazil and from French Guiana were consistent with scores obtained with isolates from PMB, except for the MDF 180 cultivar, where over 25% of isolates gave scores 1 and 2 (Table 2). This indicates that, unlike PMB isolates, some of the isolates from French Guiana and from other regions of Brazil were not able to sporulate on MDF 180. However, similar to the 113 PMB plantation isolates, none among the 47 tested in Table 2 gave a score 6 on MDF 180.

Stromata density was only noted and assessed on 48 of the 113 isolates from the PMB plantation, and none produced stroma on MDF 180. This important observation means that, though these 48 isolates could produce asexual spores, none of them was able to complete sexual reproduction on MDF 180. Regarding the other eight clones mentioned in Table 1, stromata could be observed for all strains able to produce conidiospores (scores 4–6).

### 3.2. SALB evaluation in the field

Table 3 presents data of sporulation intensity and stromata presence scored on six of the nine clones given in Table 1. Data were collected during 3 consecutive years (1994–1996) on the above described small scale clonal trial. Both MDF 180 and IAN 6158 clones behaved identically with moderate sporulation and absence of stromata. Partial resistance of MDF 180 observed under controlled conditions is thus confirmed with field evaluation. The other four tested clones exhibited high sporulation (scores 5–6) and abundance of stromata (scores 2–3). Surprisingly, cultivar FX 2784 behaved in the field as a highly susceptible one, with constant high sporulation intensity and abundance of stromata, in contrast to scores obtained under controlled conditions (where more than 90% of isolates did not succeed in producing conidial sporulation). From 1997 to 1999, cultivars MDF 180, IAN 6158, FX 3899 and FX 2784 maintained a high leaf density in the same small scale clonal trial (Table 4), whereas cultivars FX 2261 and FX 4098, both as resistant

**Table 3**

Sporulation intensity and presence of stromata for six *Hevea* cultivars observed in a field experiment in PMB plantation (Bahia, Brazil)

Symptom	Sporulation intensity			Stromata density		
	1994	1995	1996	1994	1995	1996
MDF 180	4	4	4	0	0	0
IAN6 158	4	4	4	0	0	0
FX 2261	5	5	6	3	3	3
FX 2784	6	5	6	2	3	3
FX 4098	5	5	5	3	3	3
FX 3899	5	6	5	3	3	3

Each cultivar was represented by three replications of 12 trees in a randomly design experiment planted on a total area of 7.3 ha in 1992.

Sporulation intensity: 1 = necrotic non-sporulating lesions; 2 = chlorotic non-sporulating lesions; 3 = slight sporulation on lower side of leaflets; 4 = moderate sporulations on lower side of leaflets; 5 = high sporulation on lower side of leaflets; 6 = high sporulation on both sides of leaflets.

Stromata density: 0 = no stroma; 1 = 1–5 stromatas per leaflet; 2 = 6–15 stromatas per leaflet; 3 = 16–50 stromatas per leaflet; 4 = more than 50 stromatas per leaflet.

as the four previous ones under controlled conditions, had a decreasing foliar density. When compared, leaf density of the two highly susceptible cultivars FX 3864 and RRIM 725 dropped under 50% from 1999, 6 years after planting.

The scores for SALB resistance routinely carried out in *ex situ* collection in PMB plantation (Table 5) are consistent with those presented in Table 3, except for IAN 6158 which exhibited, during 4 non-consecutive years, low to moderate abundance of stromata. The resistance of PA 31, showing moderate production of conidiospores and no stromata is also worth noting. Unfortunately, this cultivar is *Hevea pauciflora*, a species with very low rubber production potential.

#### 4. Discussion

Field conditions are not as optimal as controlled conditions for disease development and susceptibility to SALB measured by sporulation intensity under artificial inoculation is globally higher to that observed with natural infestation in the field. However, FX 2784, showing much greater sporulation in the field than in controlled inoculations, constitutes an exception to this rule. This feature can be explained by the fact that FX 2784 has a monogenic and complete resistance efficient against the majority of isolates naturally present in the field (unpublished results). However, this resistance has been bypassed by some isolates from the PMB, scoring maximum sporulation. Because these isolates increased their adaptive fitness on this particular clone, they were positively selected on monoclonal FX 2784 plots, so that sporulation and stromata scores always reach maximum levels under natural conditions in the PMB.

SALB resistance type expressed by MDF 180 can be characterized by four important features.

**Table 4**

Foliar density (in %) on MDF 180 and seven other clones in a genetic trial planted in 1993 in PMB plantation (Bahia, Brazil)

Cultivar	Year of observation					
	1997	1998	1999	...	2001	2002
MDF 180	99	94	98		100	96
IAN 6158	100	100	100		98	88
FX 2261	83	83	57		–	–
FX 2784	97	96	91		–	–
FX 4098	96	95	75		–	–
FX 3899	97	98	96		–	–
RRIM 725 <sup>a</sup>	96	86	41		–	–
FX 3864 <sup>a</sup>	86	65	27		–	–

<sup>a</sup> Highly susceptible clones.

**Table 5**

Sporulation intensity and presence of stromata on MDF 180 and seven *Hevea* cultivars in an *ex situ* collection in Bahia (Brazil)

	Sporulation intensity						Presence of stromata					
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	1996	1997	1998	1999	2000	2001
MDF 180	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0
IAN 6158	4	4	6	6	4	5	1	0	1	2	0	2
FX 2784	6	5	6	6	6	6	3	3	3	3	3	3
FX 4098	6	6	6	6	6	5	3	3	3	3	3	3
FX 3899	6	5	6	6	6	6	3	2	3	3	3	3
FX 2804	6	5	6	6	6	6	3	3	3	3	3	3
FX 985	5	6	6	6	6	6	3	3	3	3	3	3
PA 31	4	4	4	3	3	3	0	0	0	0	0	0

For significance of scores of sporulation intensity and presence of stromata, see Table 3.

- (i) Sporulation intensity in Bahia state is always restricted to 3–5 score interval in inoculation chamber experiments, and most often 3–4 in the field. The fact that every *M. ulei* isolate seems to be able to sporulate on this clone, although sporulation remains moderate, indicates the genetic nature of this resistance. This type of resistance is usually polygenic and, presumably, more durable than single gene resistance (Geiger and Heun, 1989).
 

Some isolates, unable to sporulate on MDF 180 were detected in other areas of South America. Although interactions between these isolates and MDF 180 were not further investigated, we hypothesize that absence of sporulation was due to weakly pathogenic isolates in these areas, rather than gene for gene interactions. Isolates unable to produce conidia on MDF 180 were already described by Junqueira et al. (1986), principally in what was denominated by the authors as “group 1 of physiological strains”.
- (ii) *M. ulei* is unable to produce its teleomorph on MDF 180. The special SALB resistance feature of this clone has already been described (Sambugaro et al., 2004) and is explained by phenolic compounds accumulating from 45 days after inoculation and lasting – at least – 90 more days. Absence of stromata associated with partial resistance has been reported for other rubber tree cultivars, but only following infection with one single isolate (Garcia et al., 1999), or with an unspecified number of isolates (Junqueira et al., 1990), and in both cases without field confirmation. MDF 180 cultivar displays the first occurrence of a partial resistance associated with total absence of the teleomorph of *M. ulei*. This was observed after inoculation with more than 150 isolates and confirmed in natural conditions of infestation for more than 30 years. We were not able to find any literature describing this phenomenon in other pathosystems, which does not necessarily mean this case unique. Phytopathologists frequently focus their attention on the initial epidemic process when small variations in resistance traits can have a great influence on infestation speed and on disease final spread and intensity. For instance, in a Nicks and Rubiales (2002) review, all stages of an infection process that can be subjected to genetic variation contributing to partial resistance are discussed, but circumstances where partial resistance of a cultivar is associated with absence of a teleomorph is neither discussed nor documented with an existing pathosystem. In the same way, this characteristic is not mentioned among various parameters used in models for predicting resistance durability (McDonald and Linde, 2002).
- (iii) MDF 180 is planted in field conditions among susceptible clones able to sporulate abundantly. However, severe defoliation (either on young or on adult trees) was never consequently observed. This suggests that MDF 180 presents other factors of partial resistance to SALB: reduced lesion size,

tolerance to the disease or phenological behaviour propitious to disease avoidance.

- (iv) As mentioned above, MDF 180 has been planted in the state of Bahia since 1972 on a total area of 850 ha, and all plantations are still living with a fairly good density of plants. According to the generally accepted definition of durable resistance "...a resistance that remains effective while being extensively used in agriculture for a long period in an environment conducive to the disease" (Johnson, 1981), it can be asserted without any doubt that MDF 180 resistance belongs to this category. This resistance durability is all the more remarkable since the Bahia plantation rubber tree cultivated area is characterized by a high diversity of *M. ulei* virulence (Mattos et al., 2003). Furthermore, resistance durability of a perennial crop to fungal disease is difficult to maintain because there is no way to achieve alternated cultivars in a same field from one year to the next.

This is the first occurrence in the literature of a thoroughly documented durable SALB resistance in a rubber tree clone. The combination of all above described characteristics is a good indication that this resistance will remain effective, though it is not clear whether the resistance parameters are related. Many studies focused on resistance mechanisms that are triggered during the first hours after penetration (Blasquez and Owen, 1963; Hashim and Pereira, 1989; Garcia et al., 1995), however, the physiological process through which mycelium development and conidiospore production are possible, but stromata formation never occurs, has never been described. Studies of differentially expressed genes during a compatible interaction between *M. ulei* and MDF 180 and other clones which allow stromata formation would certainly help in determining what are, in this particular case, the genetic factors induced in delayed pathogen defence, as suggested by Lieberei (2007).

Though IAN 6158 cultivar appears in Table 3 as having a field resistance similar to that of MDF 180, it has already been documented for the failure of its resistance in the field (Lima et al., 1992) and in controlled inoculations (Lima et al., 1994). Such loss of resistance has never been observed for MDF 180, despite greater area and longer duration of planting than for IAN 6158.

To date, RO 38 is the only clone for which the genetic basis for resistance is fully characterized. RO 38 issued from an interspecific cross between *H. brasiliensis* and *Hevea benthamiana*. A genetic map was established (Lespinasse et al., 2000a), quantitative trait loci (QTLs) for resistance against various *M. ulei* strains under controlled conditions of inoculation were located (Lespinasse et al., 2000b) and a major gene for resistance in natural infestation conditions was identified (Le Guen et al., 2003). However, despite its multi-genic determinism and like other already identified resistant clones, RO 38 resistance has been bypassed by some highly pathogenic strains of the fungus (Le Guen et al., 2007) so that this clone can in no way be used as a source of sustainable resistance in a breeding program.

The MDF 180 clone has also been planted on an experimental scale in two other locations distant from Bahia. The first location is Plantações Edouard Michelin, located in Itiquira (Mato Grosso, Brazil), where SALB is severe during the rainy season (4 months per year). The second one is on the experimental research station of Combi (French Guiana), located inside the natural area of occurrence of the genus *Hevea*, where *M. ulei* is endemic. In both places, some MDF 180 trees are present in *ex situ* collections and in progeny tests. In Mato Grosso, MDF 180 performance looks similar to that observed in Bahia: moderate sporulation, no teleomorph and no observable defoliation of the affected trees. In French Guiana, no sporulation and obviously no teleomorph were observed on this clone. This might be due to the lower aggressiveness of the natural inoculum, as suggested by Table 2 data.

Despite these favourable resistance characteristics, MDF 180 is not a widely planted clone and has not been adopted by South American rubber tree growers for rubber production because of its rather low latex yield potential. Dry rubber production generally ranges from 0.9 to 1.1 t ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>, compared with modern Asiatic clones one, which frequently exceed 2.0 t ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>. However, it may be a good parent in breeding programs that attempt to combine its SALB durable resistance with the high yield potential of very susceptible Asiatic clones. Such a breeding scheme began in 2002 as a cooperative program between Brazil and French Guiana.

## References

- Blasquez, C.H., Owen, J.H., 1963. Histological study of *Dothidella ulei* on susceptible and resistant *Hevea* clones. *Phytopathology* 53, 58–65.
- Bos, H., McIndoe, K.G., 1965. Breeding of *Hevea* for resistance against *Dothidella ulei*. *P. Henn. J. Rubber Res. Inst. Malaya* 19, 98–107.
- Chee, K.H., 1976. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: Spore dispersal of *Microcyclus ulei*. *Ann. Appl. Biol.* 84, 147–152.
- Chee, K.H., Holliday, P., 1986. South American Leaf Blight of *Hevea* Rubber, Kuala Lumpur, pp. 1–50.
- Chee, K.H., Kai-Ming, Z., Darmono, T.W., 1986. Occurrence of eight races of *Microcyclus ulei* on *Hevea* rubber in Bahia, Brazil. *Trans. Br. Myc. Soc.* 87, 15–21.
- Garcia, D., Cazaux, E., Rivano, F., Auzac, J.D., 1995. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. *Eur. J. Forest Pathol.* 25, 282–292.
- Garcia, D., Troispoux, V., Grange, N., Rivano, F., d'Auzac, J., 1999. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. *Eur. J. Forest Pathol.* 29, 323–338.
- Geiger, H.H., Heun, M., 1989. Genetics of quantitative resistance to fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 317–341.
- Gonçalves, J.R.C., 1968. The resistance of Fx and IAN rubber clones to leaf diseases in Brazil. *Trop. Agr. Trin.* 45, 331–336.
- Guyot, J., Ntawanga Omanda, E., Ndoutoume, A., Mba Otsaghe, A., Enjalric, F., Ngoua Assoumou, H.G., 2001. Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. *Crop Prot.* 20, 581–590.
- Halle, F., Martin, R., 1968. Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa. *Adansonia* 2, 475–503.
- Hashim, I., Pereira, J.C.R., 1989. Influence of resistance of *Hevea* on development of *Microcyclus ulei*. *J. Nat. Rubber Res.* 4, 212–218.
- Holliday, P., 1970. South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. C.A.B. Surrey, pp. 1–31.
- Johnson, R., 1981. Durable resistance: definition of genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* 71, 567–568.
- Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolim, L., Gasparotto, L., Alfenas, A.C., 1986. Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei*. *Fitopatol. Bras.* 11, 823–833.
- Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolim, L., Alfenas, A.C., Gasparotto, L., 1988. Reação de clones de seringueira a varios isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 23, 877–893.
- Junqueira, N.T.V., Lieberei, R., Kalil Filho, A.N., Lima, M.I.P.M., 1990. Components of partial resistance in *Hevea* clones to rubber tree leaf blight, caused by *Microcyclus ulei*. *Fitopatol. Bras.* 15, 211–214.
- Langford, M.H., 1945. South American leaf blight of *Hevea* rubber trees. *Tech. Bull. USDA*, 1–31.
- Le Guen, V., Lespinasse, D., Oliver, G., Rodier-Goud, M., Pinard, F., Seguin, M., 2003. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theor. Appl. Genet.* 108, 160–167.
- Le Guen, V., Garcia, D., Mattos, C.R.R., Doaré, F., Lespinasse, D., Seguin, M., 2007. Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytol.* 173, 335–345.
- Lespinasse, D., Rodier-Goud, M., Grivet, L., Leconte, A., Legnate, H., Seguin, M., 2000a. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 100, 127–138.
- Lespinasse, D., Grivet, L., Troispoux, V., Rodier-Goud, M., Pinard, F., Seguin, M., 2000b. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theor. Appl. Genet.* 100, 975–984.
- Lieberei, R., 2007. South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. *Ann. Bot.* 100, 1125–1142.
- Lima, M.P.I.M., Gasparotto, L., Araujo, A.E., Dos Santos, A.R., 1992. Surto do mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*) em seringal enxertado com copa do clone IAN 6158 em Manaus – AM. *Fitopatol. Bras.* 17, 192.
- Lima, M.I.P.M., Gasparotto, L., Araujo, A.E., Dos Santos, A.F., 1994. Caracterização fisiológica de um isolado de *Microcyclus ulei* virulento ao clone IAN 6158. *Fitopatol. Bras.* 19, 216.
- Madden, L.V., Wheelis, M., 2003. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 155–176.
- Mattos, C.R.R., 1999. Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. *Fitopatol. Bras.* 24, 470.

- Mattos, C.R.R., Garcia, D., Pinard, F., Le Guen, V., 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste da Bahia. *Fitopatol. Bras.* 28, 502–507.
- McDonald, B.A., Linde, C., 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124, 163–180.
- Niks, R.E., Rubiales, D., 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica* 124, 201–216.
- Rands, R.D., Polhamus, L.G., 1955. Progress Report on the Cooperative Hevea Rubber Development in Latin America, Washington DC.
- Sambugaro, R., Furtado, E.L., Rodella, R.A., Mattos, C.R.R., 2004. Anatomia foliar de seringueira (*Hevea* spp.) e desenvolvimento da infecção por *Microcyclus ulei*. *Summa Phytopathol.* 30, 51–56.
- Seibert, R.J., 1947. A study of *Hevea* (with its economic aspects) in the Republic of Peru. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 34, 261–353.

## **3.2. Cartographie de facteurs de résistance chez le cultivar MDF180**

Ainsi que nous l'avons exposé dans l'introduction de ce chapitre, la localisation de ces facteurs de résistance a pour objectif de définir les régions du génome au sein desquelles se concentrera la recherche d'allèles favorables par génétique d'association dans les populations en collection. L'objectif n'est donc pas d'obtenir une localisation précise des locus de résistance, mais d'identifier les régions du génome dans lesquelles on cherchera à caractériser l'étendue du déséquilibre de liaison entre marqueurs et de possibles associations génétiques entre marqueurs et caractères d'intérêt. L'identification de ces régions génomiques étant un préalable nécessaire à la poursuite des travaux, nous avons donc privilégié dans un premier temps la rapidité d'établissement de la carte génétique par rapport à la densité de marquage. Pour cela, nous avons utilisé les informations disponibles sur la localisation des marqueurs microsatellites établie à partir d'autres descendance, afin d'optimiser leur cartographie dans la descendance PB260 x MDF180. Nous avons donc sélectionné dans la mesure du possible les marqueurs microsatellites afin d'uniformiser leur répartition le long du génome de l'hévéa, évitant ainsi d'avoir des régions excessivement denses en marqueurs alors que d'autres pourraient ne pas être couvertes du tout.

### **3.2.1. Matériel et méthodes**

#### **3.2.1.1. Matériel végétal**

La cartographie génétique ainsi que les tests de phénotypage ont été réalisés sur la descendance du croisement PB260 x MDF180. Cette descendance a été réalisée par pollinisation manuelle sur la Plantation Edouard Michelin (PEM) située dans l'état du Mato Grosso au Brésil, et introduite sous forme de graines en Guyane en février 2003. Les plants issus de graines ont été multipliés par greffage en écusson sur porte-greffe non clonal (10 greffes à partir de chaque plant) dès le stade pépinière. Les clones de greffe ainsi obtenus ont permis la mise en place de deux dispositifs expérimentaux : un essai planté au champ à Combi en conditions naturelles d'infestation par le SALB, et un essai établi en serre à Kourou, afin d'effectuer des inoculations en conditions contrôlées. Des prélèvements de feuilles ont été effectués sur 351 clones de cette descendance en pépinière afin d'en extraire l'ADN.

L'essai au champ porte l'identifiant Combi 16 et comporte 298 descendants du croisement PB260 x MDF180, ainsi que les 2 parents. Chaque clone est représenté par une parcelle élémentaire de 4 arbres, avec randomisation complète des parcelles.

Un total de 195 clones de la descendance PB260 x MDF180 à raison de 3 plants greffés pour chaque clone a été maintenu en sacs de pépinière et placés en serre à Kourou afin de pouvoir y être inoculé en conditions contrôlées d'infestation. Ces 195 clones constituent un sous-ensemble des 298 clones plantés dans le dispositif Combi 16.

### 3.2.1.2. Souches de *M. ulei*

Trois souches ont été utilisées pour cette étude, deux souches (FTP39 et PMB23.1) provenant de la Plantation Michelin de Bahia (PMB) au Brésil, et une autre (CB101) de la station expérimentale de Combi. Elles ont été isolées sur des feuilles d'arbres sensibles au SALB puis multipliées et purifiées par inoculations successives de cultivars sensibles, ainsi qu'il en est fait description au paragraphe 2.1 de la première partie du présent chapitre. De plus, la souche PMB23.1 a fait l'objet d'un isolement complémentaire à partir d'une seule conidie permettant l'obtention de cultures monospores génétiquement homogènes.

Ces souches ont été testées sur la gamme hôte habituellement destinée à caractériser les nouveaux isolats, et les résultats figurent dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1. Notes de type de réaction (TR) observées sur la gamme hôte pour les 3 souches utilisées

	F 4542	FX 985	FX 2261	FX 2784	FX 2804	RO38	FX 4098	IAN 6158	MDF 180
FTP 39	-	1	4	6	4	6	1	4	3
PMB 23.1	4	1	1	2	6	6	4	4	3
CB101	1	-	1	-	1	1	3	-	2

↓  
PB260

Les deux souches brésiliennes FTP39 et PMB23.1 diffèrent nettement par leur pathogénicité sur les clones FX2261, FX2784, FX2804 et FX4098 de la gamme hôte. La souche guyanaise CB101 présente un faible niveau général de pathogénicité, et notamment sur le clone RO38.

### 3.2.1.3. Inoculation en conditions contrôlées

Le protocole d'inoculation a également été décrit d'une façon générale au paragraphe 2.1 de la première partie du présent chapitre. Nous le reprendrons cependant ici de façon détaillée en soulignant les particularités propres aux installations expérimentales du site de Kourou, car ce protocole est également celui utilisé au chapitre 5 de cette thèse.

Les plants sont maintenus en sacs de pépinière pendant toute la durée de l'expérimentation dans la serre à proximité de la chambre d'inoculation. La serre est visitée une à deux fois par semaine afin de repérer les plants dont l'étage foliaire terminal est au stade de développement propice à l'inoculation. Ce stade de développement est le stade B2 tel que défini par Hallé & Martin (1968) (Figure 1.5.). Les plants ayant atteint ce stade sont transférés en chambre d'inoculation dans une limite de 30 plants par jour d'expérimentation, limite imposée par la superficie disponible dans les box de la chambre d'inoculation (Photo 3.1.). Les autres plants de la serre dont l'étage foliaire terminal a dépassé ce stade B1 sont systématiquement recépés à la base de cet étage foliaire. Les plants en serre sont en permanence maintenus à un maximum de 3 étages foliaires afin d'éviter un encombrement végétatif préjudiciable à une optimisation de l'expression et de l'observation des symptômes.

Trois paramètres climatiques sont contrôlés en permanence dans la chambre d'inoculation : la température qui varie dans un intervalle de 23-25°C, l'humidité relative de l'air, maintenue en permanence au-dessus de 85%, et la photopériode, réglée sur une alternance 12h-12h.

La suspension de conidies utilisée pour l'inoculation est obtenue en passant délicatement un pinceau sur une lésion sporulante provenant d'une feuille d'un clone multiplicateur préalablement inoculée. Les conidies ainsi prélevées sont mises en suspension dans de l'eau distillée additionnée d'un agent mouillant (0.05% Tween 80). Un comptage est fait sous microscope sur cellule de comptage de Neubauer, et la concentration en conidies ajustée à  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ . Une goutte de suspension est prélevée avant inoculation et placée sur lame de microscope pendant 24h à 25 °C afin de contrôler le taux de germination des conidies.

L'inoculation est pratiquée au moyen d'un aérographe qui permet de recouvrir uniformément la face inférieure des folioles de fines gouttelettes de suspension (Photo 3.2.). Après l'inoculation, l'étage foliaire est recouvert pendant 24h d'un sachet plastique humidifié permettant ainsi de maintenir localement des conditions d'humidité saturante (Photo 3.3). Pendant cette même durée de 24h qui suit l'inoculation, le box est maintenu à l'obscurité



Photo 3.1. Plants au stade B2 en chambre d'inoculation



Photo 3.2. Nébulation de la suspension de conidies sur la face inférieure des folioles



Photo 3.3. Feuilles inoculées maintenues en atmosphère confinée



Photo 3.4. Feuilles inoculées 11 jours auparavant

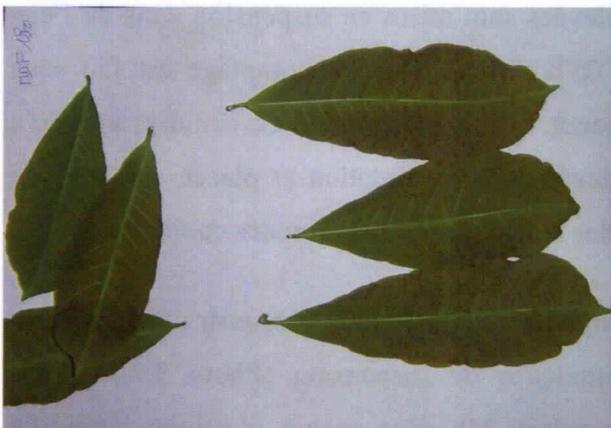


Photo 3.5. Lésions de petite taille, sporulation faible



Photo 3.6. Lésions de grande taille, sporulation abondante

complète afin de favoriser la germination des conidies.

Les feuilles sont prélevées 11 jours après inoculation (Photo 3.4.) et amenées au laboratoire pour notation des symptômes. L'étage foliaire duquel provient la feuille inoculée est alors coupé à sa base, et les plants quittent la chambre d'inoculation pour retourner en pépinière afin de faire la place pour une nouvelle série d'inoculations.

#### **3.2.1.4. Observation de l'essai Combi 16 en conditions naturelles d'infestation**

L'évaluation précise du niveau de maladie au champ est plus compliquée que sur des plants inoculés artificiellement, pour trois raisons essentielles.

1. Le stade foliaire favorable à l'établissement de la maladie et à une lecture correcte des symptômes ne dure que quelques jours. Or l'observation au champ ne peut être pratiquée que sur de jeunes arbres, afin de réduire le temps déjà très long entre le planting d'un essai et les premières observations, et pour une raison pratique d'accessibilité aux feuilles. A cet âge il n'y a aucune synchronisation entre arbres de l'émission des étages foliaires, ce qui fait qu'à chaque passage d'observation seul un faible pourcentage des arbres plantés est au stade adéquat pour effectuer une notation.
2. Ainsi qu'il a été démontré par Guyot (2008), d'importantes variations saisonnières dans l'expression de la maladie au champ peuvent être observées. Ces variations sont essentiellement d'origine climatique, les conditions météorologiques ayant une influence à la fois sur la quantité d'inoculum utile présent dans l'air et sur la cinétique du processus épidémique. De plus, de fortes pluies peuvent laver les lésions et engendrer une sous-estimation systématique des notations en minorant l'intensité de sporulation apparente.
3. La date exacte d'infestation d'une feuille ne peut pas être connue avec précision. On ne peut donc pas être certain que l'observation est effectuée au moment de l'expression maximale des symptômes.

Pour ces trois raisons, il est indispensable de multiplier les passages d'observation sur l'essai planté au champ, afin d'obtenir suffisamment de données pour chaque clone, et qu'en moyenne ces données aient été obtenues dans des conditions similaires.

### 3.2.1.5. Lecture des symptômes

Les notations de feuilles provenant d'inoculations en conditions contrôlées ont porté sur le diamètre des lésions et sur le type de réaction (Photos 3.5. et 3.6.), deux paramètres qui ont déjà été estimés comme héréditaires et pour lesquels des QTLs ont été identifiés sur une autre descendance (Lespinasse et al 2000b, Le Guen et al 2007). Les notations au champ ont porté quant-à elles sur le type de réaction, le niveau d'attaque et la densité de stromas, paramètres déjà utilisés dans une étude antérieure (Le Guen et al 2003).

#### *Type de réaction (TR)*

Cette notation est une synthèse du type de lésion observée : nécrotique, chlorotique ou sporulante, et dans ce dernier cas de l'intensité de la sporulation produite par la lésion. La notation s'effectue en attribuant pour chaque feuille observée une note discrète de 1 à 6 en se référant au descriptif suivant :

Note 1 : Lésions nécrotiques non sporulantes

Note 2 : Lésions chlorotiques non sporulantes

Note 3 : Lésions avec sporulation faible sur la face inférieure des folioles

Note 4 : Lésions avec sporulation moyenne sur la face inférieure des folioles

Note 5 : Lésions avec sporulation abondante sur la face inférieure des folioles

Note 6 : Lésions avec sporulation abondante sur les faces inférieures et supérieures des folioles

#### *Diamètre des lésions (DIL)*

Le diamètre des lésions est noté par comparaison avec un gabarit de lecture représentant des folioles avec des lésions de tailles variables. Une note est attribuée pour chaque feuille, représentant le diamètre majoritaire des lésions de 0.5mm à 7.0mm avec un pas de lecture de 0.5mm.

### *Niveau d'attaque (AT)*

Le niveau d'attaque vise à quantifier à la fois le pourcentage de superficie foliaire atteint par des lésions ainsi que le degré de déformation des folioles provoqué par ces lésions. Cette notation s'effectue également par référence à un gabarit de lecture (Figure 3.1.), sur une échelle de 0 à 4. La note 0 non représentée sur la figure concerne les feuilles ne présentant aucun symptôme attribuable à la présence de *M. ulmi*.

### *Densité de stromas (DS)*

Nous avons effectué cette notation de densité de stromas uniquement sur de jeunes arbres au champ en conditions naturelles d'infestation. La notation s'effectue sur le dernier étage foliaire possédant des feuilles matures (feuilles au stade D selon la description de Hallé & Martin 1968). Cette notation est purement quantitative et discrète et s'effectue sur une échelle de 0 à 4 selon les critères suivants :

Note 0 : Absence totale de stromas

Note 1 : De 1 à 5 stromas par foliole

Note 2 : De 6 à 20 stromas par foliole

Note 3 : De 21 à 50 stromas par foliole

Note 4 : Plus de 50 stromas par foliole

Une seule note est attribuée par plant à chaque passage d'observation, correspondant à la feuille visiblement la plus attaquée de tout l'étage foliaire considéré. Un total de douze passages d'observation a été effectué sur cet essai, de mai 2004 à novembre 2007. Les variables utilisées pour la détection de QTLs de résistance ont été calculées en faisant la moyenne par clone des notations sur les 4 arbres de la parcelle élémentaire et sur les douze passages d'observation.

### 3.2.1.6. Extraction d'ADN

L'extraction des ADN a été réalisée entièrement au laboratoire du Cirad de Kourou. La procédure utilisée est une adaptation de celle mise au point par Dellaporta et al. (1983).

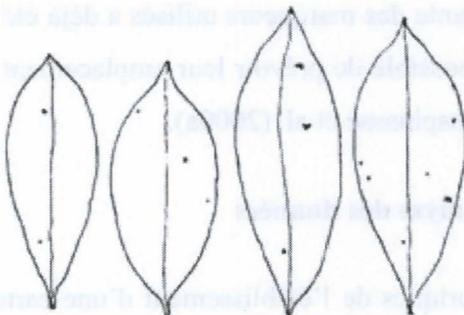
L'ADN a été isolé à partir d'échantillons de 500mg de feuilles fraîches. Le limbe des folioles est découpé en petits morceaux puis broyé dans de l'azote liquide en présence de polyvinylpyrrolidone. L'extraction est effectuée avec un tampon composé de MATAB (mixed alkyltri-methylammonium bromide) à 2%, NaCl 1.4M, 1% de polyéthylène glycol, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> à 0.5%, EDTA pH 8.0 à 20 mM, et Tris HCl pH8.0 à 100 mM, à 74°C pendant 30mn.

La séparation des phases est obtenue par addition d'un mélange de chloroforme : alcool isoamylique (24 :1 v/v) et une centrifugation à 7000 g pendant 10 mn. L'ADN est ensuite précipité dans la phase aqueuse par addition d'alcool isopropylique, la pelote d'ADN est séchée à l'air et suspendue à nouveau dans 200 µl de tampon TE (Tris-HCl à 10 mM et EDTA à 0.1 mM à pH 8.0) pendant 2 à 7 jours à température ambiante.

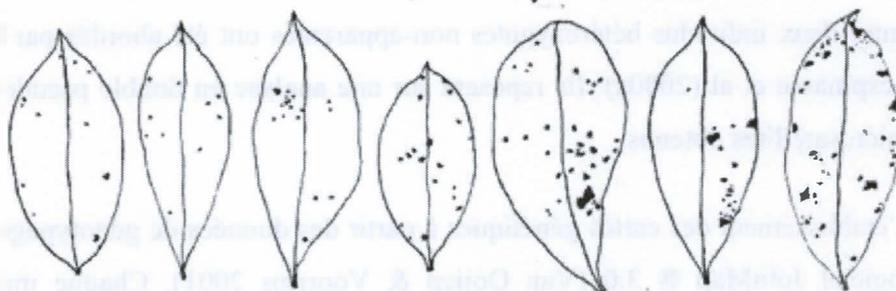
### 3.2.1.7. Analyse des marqueurs SSR

Les PCR ont été réalisées avec des amorces de fragments contenant des microsatellites polymorphes sélectionnés dans une banque enrichie en séquences microsatellites dans des régions non codantes du génome de l'hévéa, ainsi que dans des extrémités de clones BAC (Seguin et al. 2006). Chaque PCR a été réalisée dans un volume final de réaction de 20µl contenant 0.2 mM de chaque dNTP, 1.0 X de tampon PCR, 0.5 nM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1µM de chaque amorce, 1 unité de *Taq* polymérase, et 50 ng d'ADN matrice. Le protocole de PCR réalisée en thermocycleur comprend un cycle de dénaturation de 5 mn à 95°C, suivi de 35 cycles [dénaturation à 94°C pendant 45 s, appariement à 50°C pendant 1 mn, extension à 72°C pendant 1 mn 30s], et d'une étape finale d'extension à 72°C pendant 8 mn. Les produits de PCR ont été dénaturés à 94°C pendant 3 mn, puis mis à migrer dans un gel de polyacrylamide à 6.5% sur un appareil analyseur Li-Cor 4300 DNA et visualisés grâce à une amorce M13 marquée avec un fluorochrome réagissant à 700 ou à 800 nm. L'analyse des gels a été réalisée grâce au logiciel Quantar Pro<sup>TM</sup>, (Keygen, Wagenigen, Pays Bas) selon les recommandations formulées par les éditeurs du logiciel.

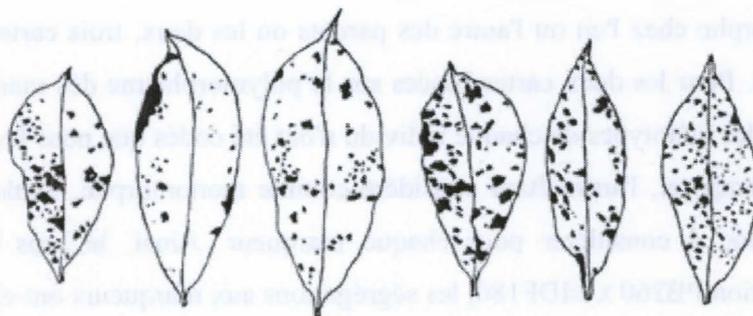
Note d'attaque 1



Note d'attaque 2



Note d'attaque 3



Note d'attaque 4



Figure 3.1. Echelle de notation du niveau d'attaque (AT), modifiée d'après Chee (1976) et Guyot (2007)

### **3.2.1.8. Tri des marqueurs microsatellites**

Une part importante des marqueurs utilisés a déjà été cartographiée sur d'autres descendances et il était donc possible de prévoir leur emplacement sur les groupes de liaison tels qu'ils ont été définis par Lespinasse et al. (2000a).

### **3.2.1.9. Analyse des données**

Les aspects théoriques de l'établissement d'une carte génétique dans le cas d'un croisement entre deux individus hétérozygotes non-apparentés ont été abordés par Ritter et al (1990) et Lespinasse et al (2000a). Ils reposent sur une analyse en double pseudo-testcross des profils microsatellites obtenus.

L'établissement des cartes génétiques à partir des données de génotypage a été réalisé avec le logiciel JoinMap ® 3.0 (Van Ooijen & Voorrips 2001). Chaque marqueur pouvant être polymorphe chez l'un ou l'autre des parents ou les deux, trois cartes différentes ont donc été établies. Pour les deux cartes basées sur le polymorphisme des marqueurs vis-à-vis d'un seul parent, les génotypes de chaque individu n'ont été codés que pour leur allélisme du seul parent à cartographier, l'autre étant considéré comme monomorphe. Seules 2 classes génotypiques sont donc à considérer pour chaque marqueur. Ainsi, le sens du croisement étant par convention PB260 x MDF180, les ségrégations aux marqueurs ont-elles été codées :

<lmxl> pour la cartographie de PB260, avec observation des classes génotypiques ll et lm  
<nnxnp> pour la cartographie de MDF180, avec observation des classes nn et np.

Pour la carte consensus, les marqueurs polymorphes chez les 2 parents ont servi de ponts entre les 2 cartes et ont été codés <abxcd>, avec observation des classes ac, ad, bc et bd. Pour les marqueurs réellement polymorphes chez un seul des deux parents, la codification exposée ci-dessus pour les 2 cartes monoparentales a été maintenue.

La valeur seuil de LOD pour établissement des groupes de liaison a été fixée à 2.0. L'ordonnement des marqueurs sur un même groupe de liaison a été effectué en utilisant la distance de Kosambi, pour tous les couples de marqueurs ayant un taux de recombinaison inférieur à 0.49 et un LOD supérieur à 1.0.

La cartographie de QTLs a été effectuée avec le logiciel MapQTL® 5 (Van Ooijen 2004).

Trois méthodes ont été successivement utilisées.

Tout d'abord, pour tenir compte du fait que les caractères phénotypiques étudiés ne présentent pas dans l'ensemble une distribution normale, nous avons appliqué le test non paramétrique de somme des rangs de Kruskal-Wallis à chaque locus en ségrégation. Ce test présente l'avantage de ne pas nécessiter de conditions particulières concernant la distribution des caractères observés. Il n'est notamment pas affecté par la non-normalité des distributions. Ce test a donc été pratiqué sur les deux cartes parentales avec un seuil de probabilité  $P=0.001$ . Ensuite, la détection de QTLs par "interval mapping" (Lander & Botstein 1989) a été effectuée sur les deux cartes parentales, avec une valeur seuil de LOD de 3.0 correspondant à une erreur globale de type I de 5% pour l'ensemble du génome. Cette valeur seuil de LOD a été calculée par permutations sur l'ensemble du génome (Churchill & Doerge 1994). Les marqueurs avec des valeurs de LOD supérieures à 3.0 ont enfin été utilisés comme cofacteurs pour une analyse en "Multiple QTL Model" mapping (Jansen 1993). Lorsqu'un QTL a été détecté à proximité d'un marqueur pour un des caractères étudiés, quelle que soit la méthode utilisée (Kruskal-Wallis, Interval Mapping, Multiple QTL Model), la présence de QTLs à proximité du même marqueur pour tous les autres caractères étudiés a été systématiquement testée avec les trois méthodes de détection.

### **3.2.2. Résultats**

#### **3.2.2.1. Ségrégation des paramètres de résistance**

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes de distribution des valeurs prises par les variables phénotypiques observées (six variables en conditions contrôlées d'inoculation et trois variables en conditions naturelles d'infestation), un tableau de corrélation pour les deux répétitions de chaque variable en conditions contrôlées, et un tableau des coefficients de corrélation de Pearson entre toutes ces variables.

### *Corrélation entre les deux répétitions de chaque variable en conditions contrôlées*

Ces corrélations sont élevées et très hautement significatives ( $P < 0.001$ ). La corrélation est légèrement plus faible, mais reste très hautement significative, pour le diamètre des lésions après inoculation par la souche CB101.

### *Histogrammes de distribution en conditions contrôlées (Figure 3.2.)*

D'une manière générale, les histogrammes de distribution de la variable "diamètre des lésions" (DIL) sont similaires pour les deux souches brésiliennes, et différents de celui de la souche guyanaise. Il en va de même pour la variable "type de réaction" (TR). La variable DIL présente chez les souches brésiliennes un mode décalé vers les valeurs faibles et une distribution s'écartant sensiblement de la normalité. La distribution de DIL pour la souche CB101 est pratiquement normale, avec un mode centré sur la valeur 3. Les distributions de TR sont systématiquement bimodales, avec les modes 4 et 6 pour les deux souches brésiliennes, et les modes 2 et 5 pour la souche guyanaise. Ces distributions ne sont pas non plus normales. Quelles que soient les variables observées et les souches inoculées, les valeurs prises par les individus de la descendance étudiée sont comprises entre les valeurs parentales, ce qui nous permet d'inférer l'absence de transgression dans cette population pour les paramètres observés. Les souches FTP39 et PMB23.1, bien que distinguables par trois facteurs de virulence sur la gamme hôte (Tableau 3.1.), génèrent des distributions similaires des paramètres DIL et TR lorsqu'elles sont inoculées sur la descendance PB260 x MDF180.

### *Histogrammes d'infestation naturelle au champ (Figure 3.3.)*

La densité de stromas (DS) présente une distribution nettement bimodale, avec un mode centré sur la valeur 0,2 et un autre sur la valeur 2,0. Ces deux modes correspondent aux valeurs moyennes enregistrées respectivement chez les parents MDF180 et PB260. Cette distribution n'est évidemment pas gaussienne.

### *Coefficients de corrélation de Pearson entre les variables*

Dans le Tableau 3.2. sont représentés les coefficients de corrélation de Pearson entre toutes les variables mesurées, en conditions contrôlées d'inoculation ainsi qu'en infestation naturelle. La plupart des corrélations observées sont hautement significatives ( $P < 0.001$ ), excepté pour

certaines corrélations entre les souches brésiliennes en conditions contrôlées et les variables en conditions naturelles à Combi.

Les points marquants de ce tableau sont les suivants:

- Très bonne corrélation entre les variables DIL et TR pour une même souche inoculée.
- Très bonne corrélation générale entre les variables des deux souches brésiliennes FTP39 et PMB23.1
- Très bonne corrélation entre les trois variables mesurées en conditions naturelles d'infestation à Combi
- Corrélation plus faible, bien que toujours très significative, entre les deux souches brésiliennes d'une part et la souche guyanaise d'autre part.
- Bonne corrélation entre TR en conditions contrôlées pour CB101 et les conditions naturelles à Combi.
- Corrélation encore plus faible entre les souches brésiliennes et les conditions naturelles à Combi.

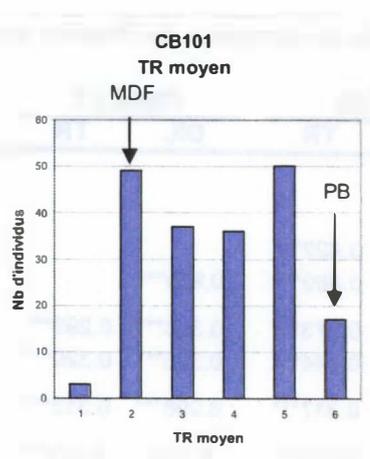
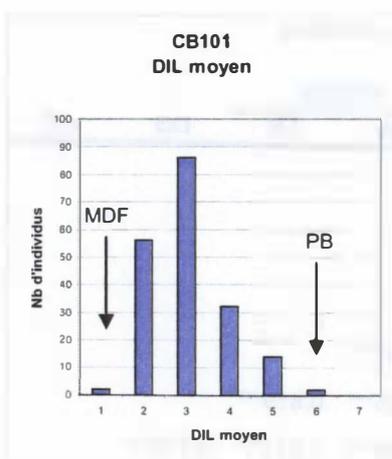
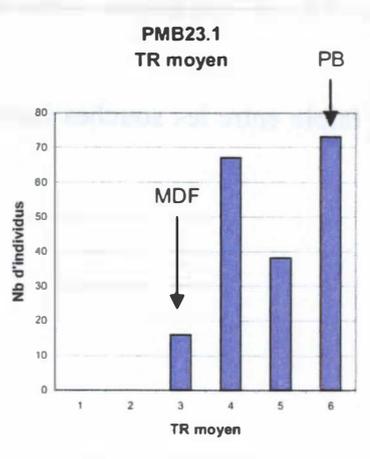
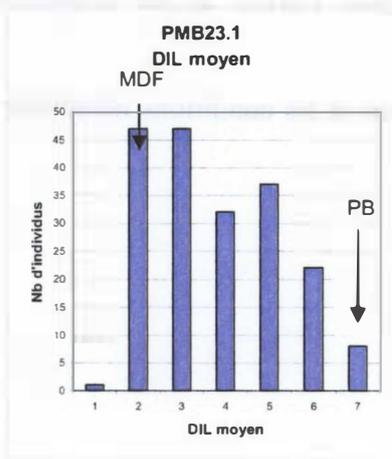
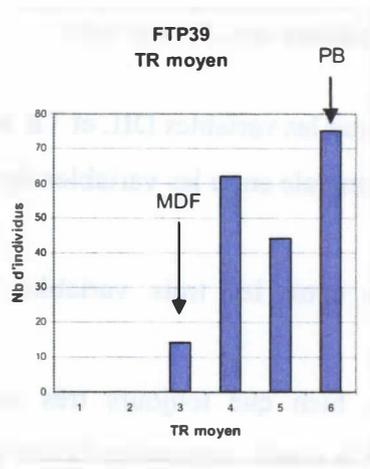
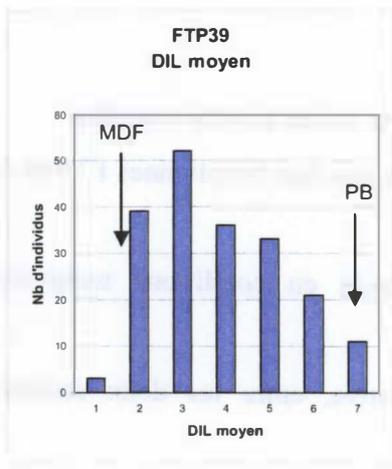
**Tableau 3.2.** Coefficients de corrélation de Pearson entre les variables

		FTP39		PMB23.1		CB101		DS	AT
		DIL	TR	DIL	TR	DIL	TR		
FTP39	DIL								
	TR	0.898***							
PMB23.1	DIL	0.815***	0.822***						
	TR	0.793***	0.860***	0.939***					
CB101	DIL	0.300***	0.273***	0.353***	0.293***				
	TR	0.316***	0.344***	0.325***	0.320***	0.667***			
DS		0.293***	0.317***	0.298***	0.313***	0.455***	0.819***		
AT		0.232***	0.217**	0.159*	0.174**	0.284***	0.571***	0.730***	
TR		0.219**	0.261***	0.207**	0.236***	0.441***	0.761***	0.900***	0.743***

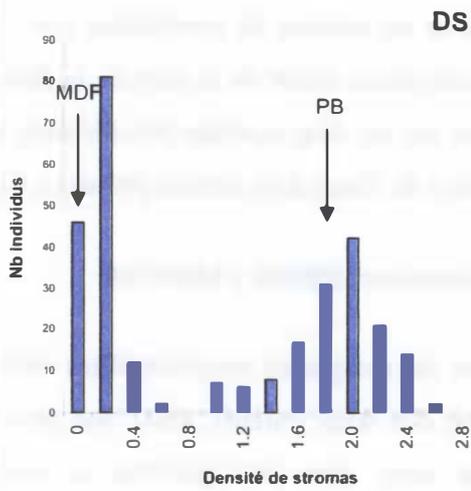
\* P < 0.05

\*\* P < 0.01

\*\*\* P < 0.001



**Figure. 3.2.** Histogrammes de distribution des variables DIL moyen et TR moyen pour les 3 souches utilisées. MDF : valeur moyenne du parent MDF 180; PB : valeur moyenne du parent PB 260

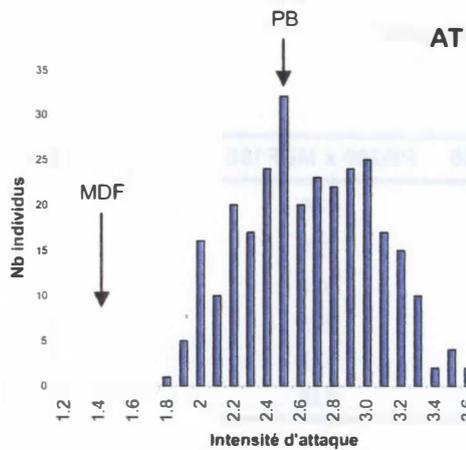
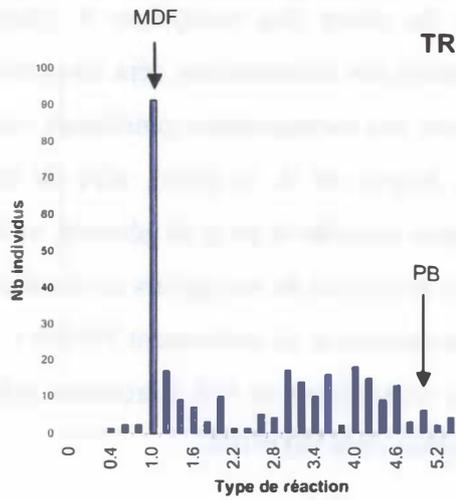


**Figure 3.3.**

Histogrammes de distribution de la densité de stromas (DS), du type de réaction (TR) et de l'intensité d'attaque (AT).

MDF: valeur moyenne du parent MDF 180;

PB: valeur moyenne du parent PB 260



Il ressort donc de l'analyse de ces distributions et du tableau de corrélation que la souche guyanaise inoculée en conditions contrôlées d'infestation induit de la part de la descendance étudiée une réaction différente de celle provoquée par les deux souches brésiliennes, mais que cette souche guyanaise est assez bien représentative de l'inoculum naturel présent à Combi.

### 3.2.2.2. Cartographie génétique de la descendance PB260 x MDF180

Dans le tableau 3.3. sont indiqués les nombres de marqueurs microsatellites utilisés pour l'établissement des cartes génétiques sur chacun des deux parents, ainsi que pour la carte consensus. Un total de 434 marqueurs a été testé, dont 264 (60.8%) se sont révélés polymorphes sur PB260, 233 (53.7%) polymorphes sur MDF180, et 321 (74.0%) polymorphes sur l'un ou l'autre parent. Lors du choix des marqueurs à génotyper sur l'ensemble de la descendance nous avons tiré partie des informations déjà disponibles sur la localisation d'une partie de ces marqueurs, à partir des cartographies génétiques réalisées sur d'autres croisements (Lespinasse et al. 2000a; Seguin et al. in prep), afin de répartir les marqueurs analysés de la manière la plus homogène possible le long du génome, en évitant les régions non couvertes ainsi qu'une concentration excessive de marqueurs en d'autres régions. Le génotypage a porté sur 351 individus de la descendance du croisement PB260 x MDF180. Un total de 203 marqueurs a été analysé, qui se répartissent en 155 marqueurs polymorphes chez le parent PB260 et 161 marqueurs polymorphes chez MDF180.

**Tableau 3.3.** Nombre de marqueurs microsatellites utilisés pour l'établissement des cartes génétiques

<b>Nombres marqueurs</b>	<b>PB260</b>	<b>MDF180</b>	<b>PB260 x MDF180</b>
Testés	434	434	434
Polymorphes	264	233	321
% polymorphes	60.8	53.7	74.0
Génotypés sur descendance	155	161	203
Cartographiés	145	146	177
Déjà cartographiés	121	115	145

### *Construction de la carte PB260*

Des 155 marqueurs microsatellites polymorphes chez PB260, 145 ont pu être cartographiés au seuil de  $Lod = 3.0$ , définissant ainsi 21 groupes de liaison et une longueur totale de carte de 2093 cM. Par référence aux cartes obtenues avec les mêmes marqueurs sur d'autres descendances, on constate que les 3 groupes de liaison surnuméraires par rapport aux 18 chromosomes de base de l'espèce *H. brasiliensis* correspondent à une fragmentation en deux des groupes de liaison g9, g13 et g14 préalablement définis (Lespinasse et al. 2000a).

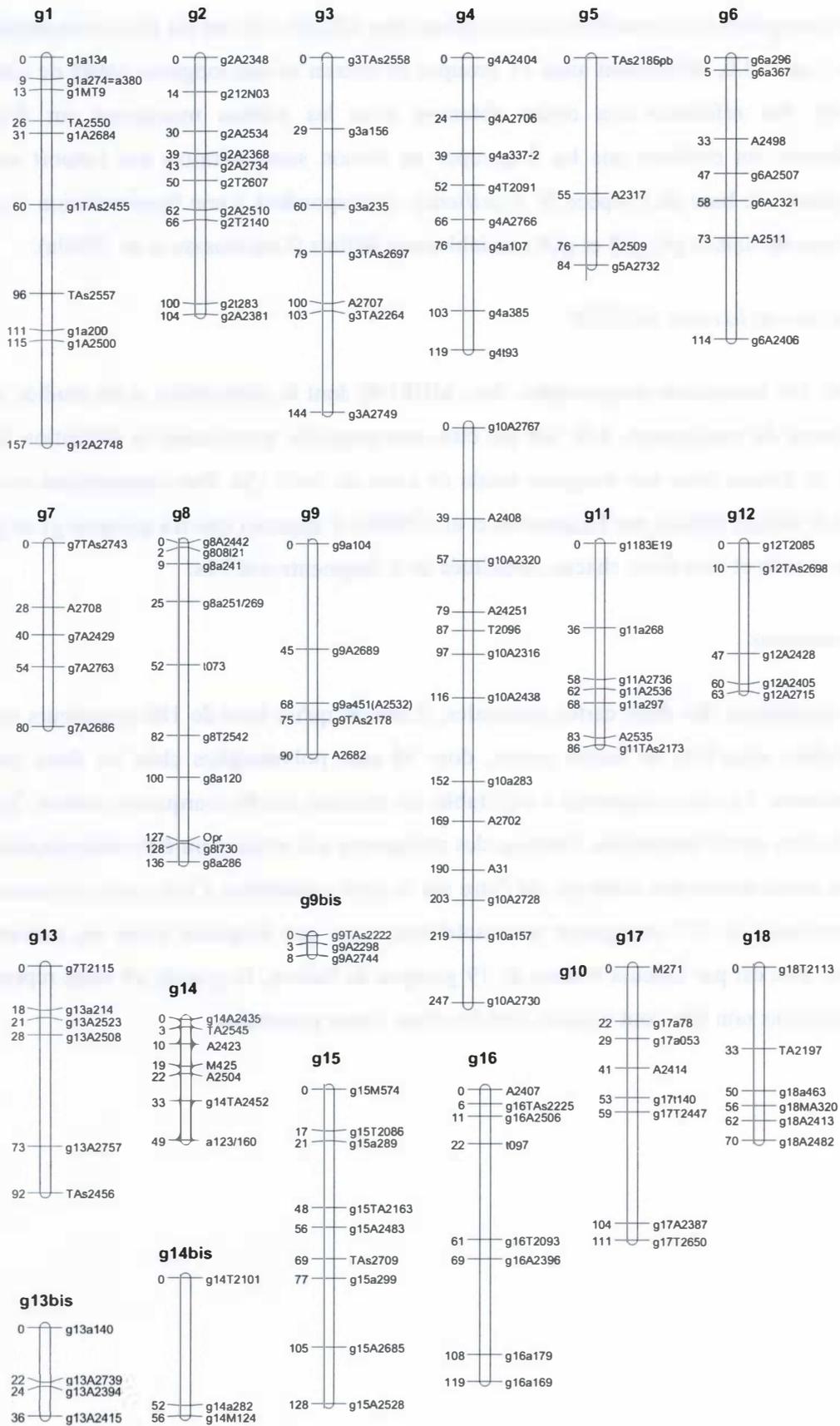
### *Construction de la carte MDF180*

Parmi les 161 marqueurs polymorphes chez MDF180 dont la ségrégation a été étudiée sur la descendance du croisement, 146 ont pu être cartographiés, permettant la définition de 20 groupes de liaison pour une longueur totale de carte de 1643 cM. Par comparaison avec les groupes de liaison définis par Lespinasse et al. (2000a) il apparaît que les groupes g1 et g9 ne sont pas saturés et sont donc chacun constitués de 2 fragments non liés.

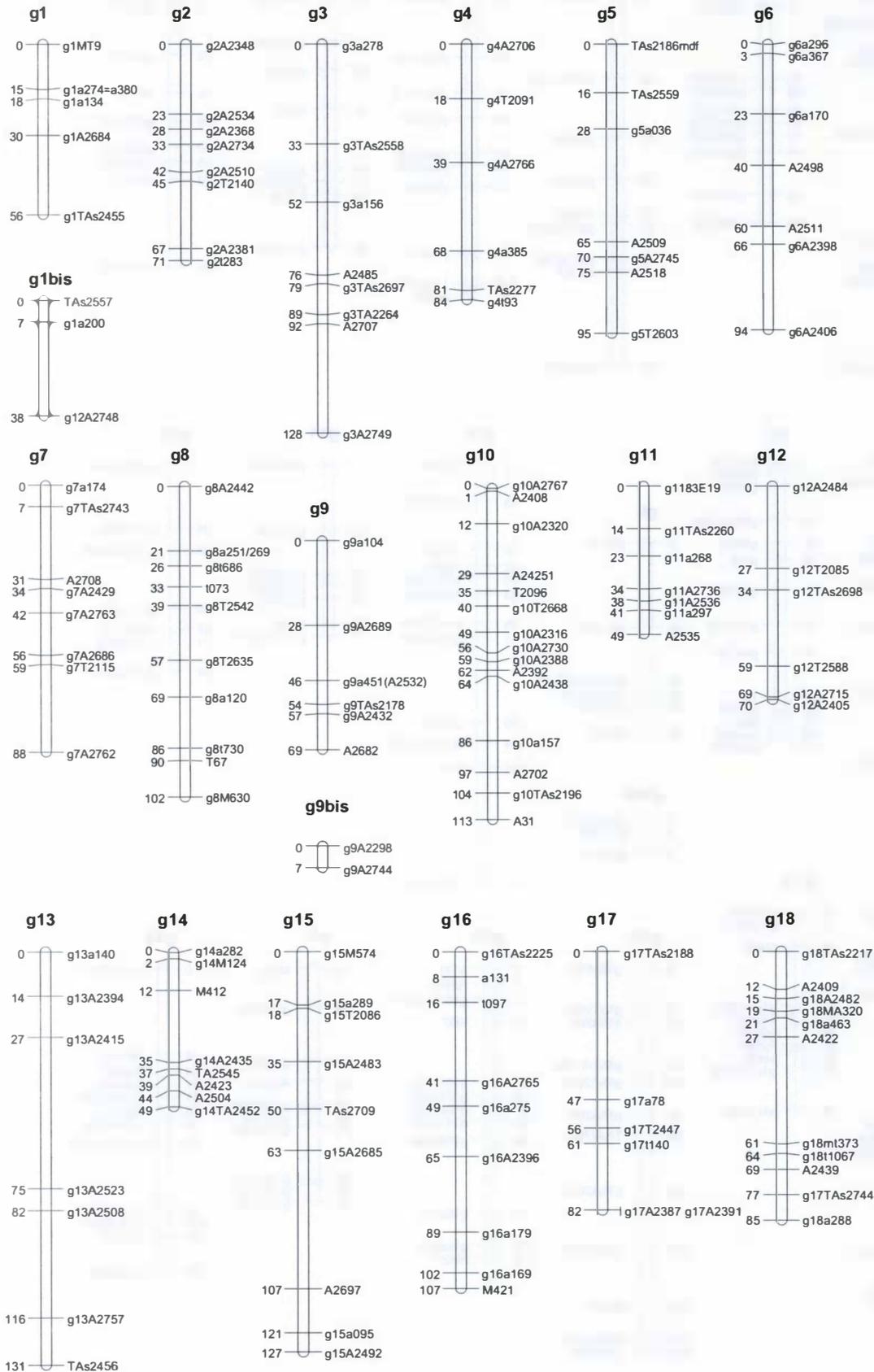
### *Carte consensus*

De la comparaison des deux cartes parentales, il ressort qu'un total de 189 marqueurs ont été cartographiés chez l'un ou l'autre parent, dont 98 sont polymorphes chez les deux parents simultanément. La carte consensus a été établie en utilisant ces 98 marqueurs comme "ponts" entre les deux cartes parentales. Certains des marqueurs qui avaient pu être cartographiés sur l'une des cartes parentales n'ont pas pu l'être sur la carte consensus. Cette carte consensus est donc constituée de 177 marqueurs microsatellites, pour une longueur totale du génome de 2053 cM. Elle est par ailleurs formée de 19 groupes de liaison, le groupe g9 étant représenté par 2 fragments non liés, tout comme dans les deux cartes parentales.

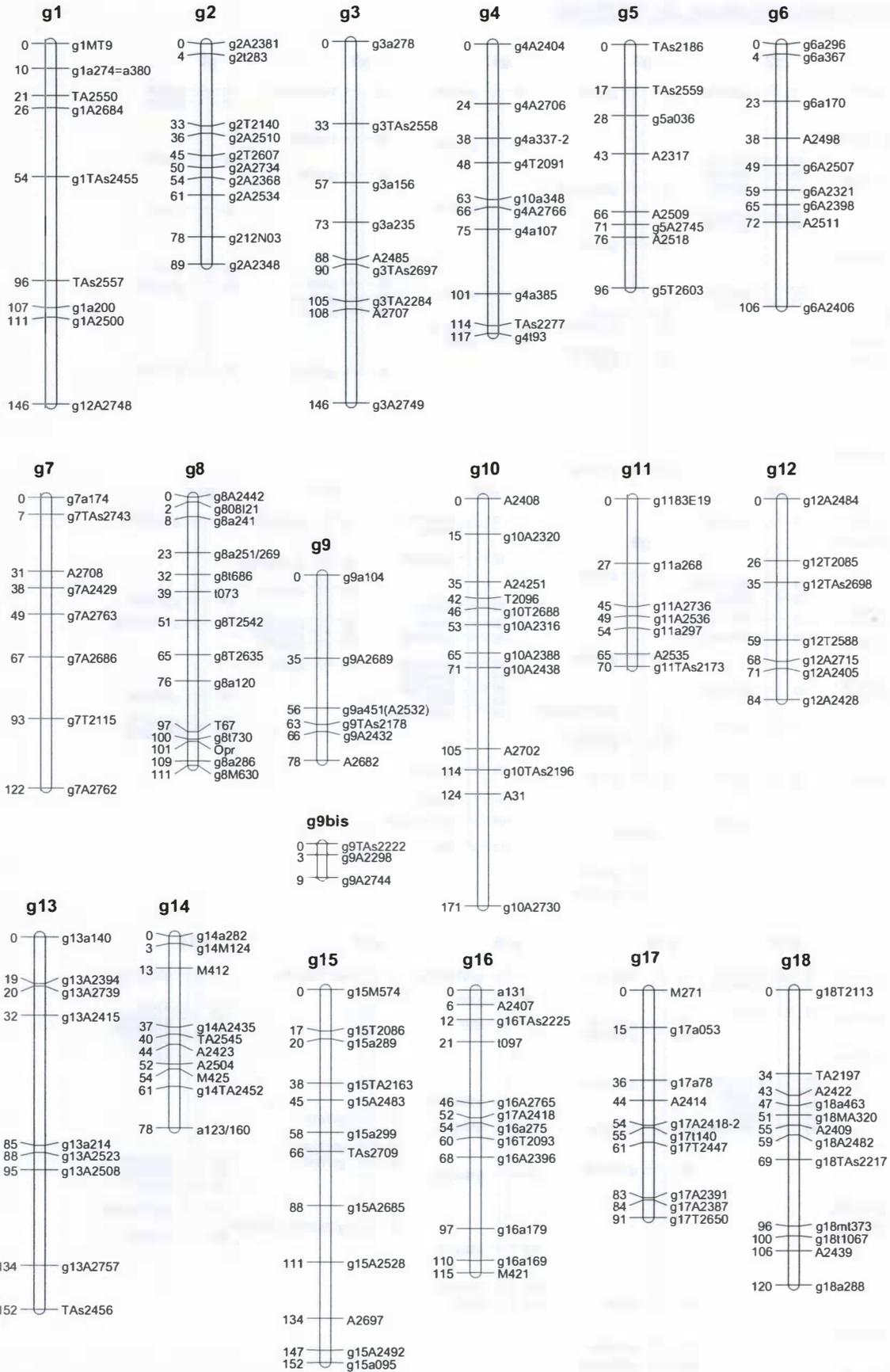
## Cartographie génétique de PB260



## Cartographie génétique de MDF180



## Carte génétique consensus PB260 x MDF180



### 3.2.2.3. Cartographie de QTLs de résistance

Les résultats des trois tests de détection de QTL (Kruskal-Wallis, Interval Mapping et Multiple QTL Model) sur la carte génétique de MDF180 pour tous les caractères étudiés sont présentés dans le tableau 3.4. De l'analyse des 3 caractères en conditions naturelles d'infestation et des 6 caractères en conditions contrôlées (3 souches x 2 caractères observés), ne ressortent que 6 QTLs distincts parmi lesquels 2 ont un effet très important.

**Tableau 3.4.** QTLs de résistance détectés par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, par Interval Mapping (MP) et par Multiple QTL Model (MQM). Les variables étudiées sont la densité de stromas (DS), le niveau d'attaque (AT), le type de réaction (TR) et le diamètre des lésions (DIL).

Souche	Caractère	Groupe liaison	Marqueurs <sup>a</sup>	Kruskal Wallis		IM		MQM		
				K <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	LOD <sup>d</sup>	R <sup>2</sup> (%) <sup>e</sup>	LOD	R <sup>2</sup> (%)	cofacteurs <sup>f</sup>
<i>Infestation naturelle au champ</i>										
	DS	g1	a134	10.0	<0.005	1.8	2.9	4.6	1.1	T2086
		g14	M124 <sup>(1)</sup>	8.2	<0.005	1.2	1.9	3.3	0.9	T2086 et A2757
		g15	T2086	181.7	<0.0001	143.7	91.6	143.9	91.2	A2757
	AT	g1	a134	14.5	<0.0005	4.0	6.8	4.7	4.8	T2086
		g14	M124 <sup>(1)</sup>	15.2	<0.0001	3.8	6.0	4.7	4.3	T2086 et A2757
		g15	T2086	111.5	<0.0001	33.7	45.3	34.5	42.9	A2757
	TR	g15	T2086	168.5	<0.0001	92.4	83.5	93.0	83.8	A2757
<i>Inoculation en conditions contrôlées</i>										
FTP39	TR	g10	A31	13.5	<0.0005	2.9	6.8	3.6	7.5	T2086
		g13	A2757	92.9	<0.0001	43.1	74.4	43.7	67.5	T2086
		g14	A2435/TA2545 <sup>(2)</sup>	9.1	<0.005	2.1	4.9	3.3	5.3	T2086 et A2508
		g15	T2086	21.8	<0.0001	4.6	10.9	5.6	6.5	A2757
PMB23.1	DIL	g13	A2757	94.2	<0.0001	33.1	65.3	32.4	59.6	T2086
		g15	a289	18.4	<0.0001	3.7	8.7	4.2	6.3	A2757
		g13	A2757	94.2	<0.0001	44.4	77.2	42.5	68.2	T2086
PMB23.1	DIL	g15	T2086	17.3	<0.0001	4.1	9.8	5.3	5.5	A2757
		g13	A2757	91.8	<0.0001	34.0	68.2	32.4	60.5	T2086
		g15	a289	17.0	<0.0001	3.8	9.0	4.2	5.8	A2757
CB101	TR	g13	A2508	13.5	<0.0005	3.2	9.0	0.7	1.0	T2086
		g15	T2086	109.3	<0.0001	49.4	72.8	48.7	71.2	A2757
		DIL	g15	a289	40.7	<0.0001	9.5	20.8	9.0	19.5

<sup>a</sup> Marqueur avec la plus forte valeur de K pour le test KW ou le plus proche du pic de LOD-score pour les tests IM et MQM

<sup>b</sup> Valeur prise par le test KW, à comparer avec la valeur du chi-deux pour 1 degré de liberté

<sup>c</sup> Probabilité associée à la valeur de K

<sup>d</sup> Valeur du LOD score

<sup>e</sup> Proportion de la variance phénotypique expliquée

<sup>f</sup> Marqueurs utilisés comme cofacteurs pour le test MQM

(1) et (2) correspondent à deux QTLs différents sur g14

### *Infestation naturelle au champ*

Un QTL situé sur le groupe de liaison g15 à proximité du marqueur T2086 présente des valeurs de LOD score très importantes pour les 3 caractères observés au champ : 143.7, 92.4 et 33.7 pour la densité de stromas (DS), le type de réaction (TR) et le niveau d'attaque (AT) respectivement. Ces valeurs de LOD élevées sont associées à des ratios très importants d'explication de la variance phénotypiques des caractères observés : 91.6, 83.5 et 42.9 % respectivement. Deux autres QTLs à effet bien plus modeste se retrouvent pour les caractères DS et AT, mais pas TR. Il s'agit d'un QTL situé sur le groupe de liaison g1 près du marqueur a134, et dont le LOD score obtenu en analyse MQM est de 4.6 pour DS et 4.7 pour AT, et d'un autre QTL situé sur g14 à proximité du marqueur M124 et dont le LOD score en MQM vaut respectivement 3.3 et 4.7 pour DS et AT. Toutefois, la participation de ces 2 QTLs à la variance phénotypique des caractères observés est faible, entre 1 et 5% selon les caractères. Ceci est compréhensible dans la mesure où le QTL situé en g15 explique déjà une forte proportion de cette variance phénotypique, celle expliquée par des QTLs mineurs ne peut être que très réduite.

### *Inoculations en conditions contrôlées*

Le même QTL situé près du marqueur T2086 est également mis en évidence en conditions contrôlées. Toutefois, son effet ne peut être considéré comme très important que pour le caractère TR après inoculation par la souche CB101, pour lequel il présente en analyse IM un LOD de 49.4 et une participation de 72.8% à la variance phénotypique observée. Pour le caractère DIL sur cette même souche, le LOD score prend en analyse MQM une valeur de 9.5, et des valeurs comprises entre 4.2 et 5.6 pour les 2 caractères observées et les 2 autres souches. La participation à la variance observée reste de l'ordre de 6% dans ces 4 derniers cas. Un autre QTL situé près du marqueur A2757 sur g13 se révèle très important pour expliquer la résistance de la population observée en conditions contrôlées d'inoculation. Ce QTL obtient des valeurs de LOD comprises entre 33 et 44 pour les caractères TR et DIL pour les 2 souches FTP39 et PMB23.1. Un QTL situé sur g13 est également présent pour TR après inoculation par la souche CB101 (LOD = 3.2,  $R^2=9.0\%$ ), mais pas exactement au même endroit. Celui-ci serait plus proche du marqueur A2508 situé sur la carte de MDF180 à 34 cM de A2757. Cette région de la carte est peu dense en marqueurs et ne permet donc pas pour l'instant de savoir si l'on est en présence d'un QTL ou de deux QTLs différents. Par ailleurs, deux autres QTLs mineurs sont mis en évidence pour le caractère TR et la souche FTP39 : le premier situé sur

g10 près du marqueur A31 (LOD = 3.6 en MQM,  $R^2= 7.5\%$ ), et le second sur g14, entre les marqueurs A2435 et TA2545 (LOD = 3.3 en MQM et  $R^2=5.3\%$ ).

Le Tableau 3.5 synthétise les résultats concernant les 6 QTLs détectés. L'importance du QTL en g15 y est manifeste, puisqu'il contribue à l'expression des 9 caractères analysés, avec des valeurs de LOD allant de 4 à plus de 140, et des participations de 5 à 90% à la variance phénotypique des caractères. Le rôle joué par ce locus dans l'expression de la résistance au SALB en conditions naturelles en Guyane est tellement important qu'il n'y a plus lieu de le considérer comme un QTL mais bien comme un gène majeur de résistance. L'examen de l'histogramme de distribution du paramètre de résistance pour lequel ce locus en g15 présente la plus forte valeur de LOD - la densité de stromas en conditions naturelles (DS) - montre une rupture très nette dans la population en ségrégation entre les individus ayant une valeur de DS inférieure à 0.8, et ceux ayant une valeur supérieure à 0.8, avec des effectifs respectivement de 143 et 154 individus pour ces 2 classes (Figure 3.3.). On peut donc considérer ce caractère phénotypique comme un marqueur génétique au sens strict et le coder d'une manière analogue aux marqueurs moléculaires: aa pour les individus avec un  $DS < 0.8$  et ab pour ceux ayant un  $DS > 0.8$ . Ce nouveau marqueur que, par analogie avec *M13-1bn* identifié chez le parent RO38 nous dénommerons *M15md* (pour résistance à *Microcyclus*, groupe de liaison g15, origine **M**adre de **D**ios) a été ajouté à la liste des marqueurs utilisés pour la cartographie du parent MDF180. Une nouvelle cartographie avec le logiciel JoinMap ® 3.0, à l'issue de laquelle *M15md* se cartographie sur le groupe de liaison g15, à 1cM du marqueur T2086 et à 2cM de a289 (Figure 3.4.). Il existe donc apparemment une forte liaison entre le gène majeur de résistance et le marqueur microsatellite T2086.

### 3.3. Discussion générale chapitre 3

#### 3.3.1. Description d'une nouvelle résistance de l'hévéa au SALB

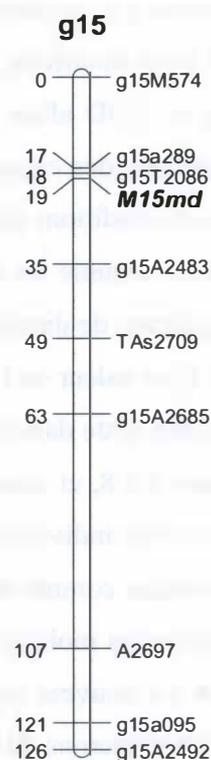
Une source de résistance à *M. ulei* encore non décrite a été caractérisée dans ce chapitre, celle du clone MDF180, provenant d'une prospection effectuée en 1947 dans l'état péruvien du Madre de Dios. Il a d'abord été montré que cette résistance était partielle et qu'elle se

**Tableau 3.5.** Synthèse des QTLs de résistance à *M. ulei* observés dans la descendance PB260 x MDF180

Groupe liaison	Marqueur	Inoculum	Caractère	Intensité du QTL
g15	T2086	Naturel (Guyane)	DS	+++++
		Naturel (Guyane)	TR	+++++
		Naturel (Guyane)	AT	+++
		CB101	TR	+++
		CB101	DIL	+
		FTP39	TR	+
		FTP39	DIL	+
		PMB23.1	TR	+
		PMB23.1	DIL	+
g13	A2757	FTP39	TR	+++
		FTP39	DIL	+++
		PMB23.1	TR	+++
		PMB23.1	DIL	+++
		CB101	TR	+
g1	a134	Naturel (Guyane)	DS	+
		Naturel (Guyane)	AT	+
g14	M124	Naturel (Guyane)	DS	+
		Naturel (Guyane)	AT	+
g14	A2435/TA2545	FTP39	TR	+
g10	A31	FTP39	TR	+

+++++ : LOD > 90  
 +++ : 50 > LOD > 30  
 + : 10 > LOD > 3

**Figure 3.4.** Localisation du gène majeur *M15md* sur le groupe de liaison g15 de MDF180



caractérisait par une faible intensité de sporulation conidienne. Une particularité remarquable de cette résistance est qu'elle ne permet pas le développement de la phase sexuée du champignon (téléomorphe), et ce quelle que soit la pathogénicité de l'inoculum utilisé. Cette résistance se maintient à un niveau stable depuis plus de 30 ans sur plusieurs centaines d'hectares plantés et peut donc être considérée comme durable. Outre la valeur intrinsèque de la résistance au SALB de MDF180 pour les programmes d'amélioration génétique de l'hévéa en Amérique Latine, son intérêt réside également dans le fait que ce clone est issu d'une population peu distante génétiquement des populations de l'Acre qui comportent, ainsi que celles du Rondônia, une forte proportion d'individus résistants au SALB (Le Guen et al 2002). Le clone MDF180 peut donc servir de base à la définition de régions du génome des individus de ces populations où pourrait être recherché du polymorphisme de facteurs génétiques de résistance.

### 3.3.2. Cartographie de QTLs de résistance

A cette fin, une cartographie de QTLs de résistance a été menée à partir d'une population en ségrégation de 351 individus issus du croisement entre MDF180 et le parent sensible PB260. Une carte génétique a tout d'abord été établie sur l'ensemble de ces 351 descendants avec des marqueurs SSR. Ce sont au total 146 marqueurs microsatellites qui ont pu ainsi être cartographiés chez le clone MDF180, définissant 20 groupes de liaison, pour 18 attendus. Une partie de ces descendants a par ailleurs été évaluée pour sa résistance au SALB à la suite d'inoculations en conditions artificielles ou bien d'infestations naturelles en plantation. Les histogrammes de distribution obtenus en conditions naturelles d'infestation pour les caractères DS et TR sont nettement bimodaux, ce qui suggère l'implication d'un gène majeur provenant du parent résistant.

Ce type de distribution bimodale a déjà été signalé pour la résistance du peuplier hybride *Populus deltoides* x *P. trichocarpa* à la rouille *Melampsora larici-populina* où l'hypothèse a été émise que cette résistance correspondait à l'effet d'un gène majeur associé aux effets de gènes mineurs (Dowkiw et al. 2003). Cette hypothèse a par la suite pu être vérifiée par cartographie de QTLs pour la composante "taille des urédinies" sur une descendance en ségrégation (Jorge et al. 2005). Le même type de distribution a été observé pour la résistance de l'hybride *P. deltoides* x *P. trichocarpa* à une autre rouille, *Melampsora medusae* f.sp. *deltoidae* (Newcombe et al. 1996; Newcombe 1998).

L'analyse conjointe sur l'ensemble de la population en ségrégation des génotypes individuels et des phénotypes de résistance a permis la mise en évidence de 2 régions du génome comportant des gènes majeurs de résistance ainsi que 4 QTLs à effet réduit sur la résistance. Un des gènes majeurs est situé sur le groupe de liaison g13 dans la région du gène majeur déjà détecté chez le clone RO38, hérité de son parent *H. benthamiana* F4542 (Lespinasse et al 2000b). La faible densité en marqueurs dans cette région ne permet pas de savoir si ce gène et le QTL identifié également chez MDF180 pour la résistance après inoculation par la souche CB101 constituent un seul et même locus de résistance ou s'il s'agit de locus différents. La faible densité de la carte ne permet pas non plus de savoir si ce gène majeur identifié chez MDF180 est le même que celui présent chez RO38, ou s'il s'agit de 2 gènes de résistance localisés dans la même région ("cluster" de résistance). En tout état de cause, il est possible d'affirmer que si le même gène majeur est impliqué dans la résistance des clones RO38 et MDF180, alors il s'agit nécessairement de 2 formes alléliques différentes d'un même gène. En

effet, le test des souches FTP39 et CMB23.1 sur gamme hôte (Tableau 3.1.) indique clairement une résistance différentielle des 2 clones concernés : TR de 6 pour RO38 soit très forte sensibilité de ce clone à ces 2 souches, et TR de 3 pour MDF180 soit une résistance partielle forte. Considérant l'important l'effet du gène majeur *M13\_1bn* chez RO38 et celui tout aussi important du gène majeur situé dans la même région chez MDF180, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que si le même allèle au même gène était impliqué dans la résistance de ces deux cultivars, alors leur réaction à l'inoculation par les deux souches mentionnées ci-dessus serait identique ou pour le moins très voisine. Etant donné que ce n'est pas le cas, l'hypothèse minimale qui peut rendre compte des résultats observés est qu'il s'agit du même gène mais avec deux formes alléliques différentes. L'hypothèse alternative est que nous sommes en présence de deux gènes distincts de résistance et physiquement proches.

L'autre gène majeur de résistance, que nous avons appelé *M15md*, est à l'origine des distributions bimodales des caractères DS et TR en plantation. Il prend d'ailleurs pour ces deux composantes de la résistance des valeurs de LOD très élevées, supérieures à 90. De telles valeurs rappellent à nouveau les résultats obtenus dans la résistance du peuplier hybride à *M. larici-populina* (Jorge et al. 2005).

L'importance relative des différents locus de résistance en fonction de l'origine de l'inoculum n'est pas encore totalement élucidée. Dans le Tableau 3.5, il apparaît clairement qu'en conditions contrôlées d'inoculation le gène majeur en g13 est plus efficace dans l'expression de la résistance aux 2 souches de Bahia, quelque soit le paramètre considéré (TR ou DIL). L'inverse est observé pour la seule souche guyanaise : le gène majeur en g15 est plus efficace que celui en g13 pour les 2 paramètres TR et DIL. Cette indication de meilleure efficacité du gène majeur en g15 que celui en g13 pour les isolats provenant de Guyane est renforcée par les observations réalisées à Combi en conditions naturelles d'infestation : *M15md* y est très efficace, alors que le gène majeur en g13 ne l'est pas du tout. Pour que ce tableau soit complet, il manque évidemment les observations en conditions naturelles d'infestation dans l'état de Bahia. Seule une expérimentation de ce type pourra confirmer si la meilleure efficacité du gène en g13 observée en conditions contrôlées pour la résistance aux isolats de Bahia est confirmée également pour le paramètre TR en infestation naturelle. Cette expérimentation est prévue dans le cadre du projet "GENESALB" mentionné dans l'introduction de ce chapitre. Il est également important de savoir lequel des 2 gènes contrôle la densité de stromas pour les isolats originaires de Bahia et si d'autres QTLs n'interviennent

pas dans le contrôle de ce paramètre. En effet, une précédente étude réalisée en infestation naturelle en Guyane sur une population en ségrégation issue du croisement PB260 x RO38 a permis de montrer l'efficacité d'un QTL sur le groupe de liaison g14 qui n'avait jamais été identifié jusqu'alors en conditions contrôlées d'inoculation (Le Guen et al 2003; voir également chapitre 2 du présent document). On peut donc supposer que la densité de stromas pour les isolats de Bahia est contrôlée par le gène majeur en g13, comme pour les autres paramètres caractérisant la résistance à ces isolats, mais il est également possible que ce caractère soit contrôlé par le gène majeur en g15, voire par un autre gène ou QTL non encore identifié à ce jour.

### **3.3.3. Universalité des locus identifiés**

Les tests de résistance menés jusqu'à présent sur la descendance du croisement PB260 x MDF180 n'ont porté que sur des isolats provenant soit de l'état de Bahia au Brésil, soit de Combi en Guyane. L'aire géographique de plantation du clone MDF180 est encore assez peu étendue. La seule autre localisation où ce clone a pour le moment été observé attentivement est la Plantation Edouard Michelin, dans le Mato Grosso, où son comportement est en tout point semblable à celui observé à Bahia et en Guyane : résistance partielle de haut niveau, émission réduite de conidiospores, absence de téléomorphe. Depuis 2005, le clone MDF180 est également systématiquement incorporé comme témoin résistant dans un réseau expérimental d'essais clonaux en diverses localités du Brésil (états de Bahia, du Mato Grosso, de l'Espirito Santo, de l'Amazonas, de l'Acre), ainsi qu'en Equateur, Colombie et Guatemala, dans des régions à pression modérée à forte du SALB (Rivano communication personnelle). Il sera ainsi bientôt possible de savoir si la résistance de MDF180, considérée comme durable dans une région à forte pression de SALB et grande diversité de l'inoculum naturel, conserve ces caractéristiques dans d'autres régions d'Amérique Latine où *M. ulei* est également présent de façon endémique.

Par ailleurs, une étude de la diversité génétique de *M. ulei* au moyen de marqueurs microsatellites est en phase de démarrage (stage post-doctoral de B. Barrès, Cirad). Lorsque l'on aura des informations sur la structuration de cette diversité, il sera possible de réaliser des tests avec des isolats génétiquement éloignés de ceux utilisés jusqu'à présent et d'observer ainsi l'étendue de l'efficacité des locus et QTLs de résistance identifiés.

### 3.3.4. Adéquation aux modèles d'interaction hôte-pathogène

#### 3.3.4.1. Rappel des principaux concepts

La conceptualisation des phénomènes mis en jeu dans la génétique de la résistance des plantes aux parasites est généralement basée sur l'étude de pathosystèmes au sein desquels les interactions hôte-pathogène sont relativement simples. Un des premiers éclairages sur la génétique de la résistance a été apporté par Van der Plank (1963), qui à partir de l'étude de la rouille du blé (*Puccinia graminis tritici*) ou du mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*) a développé les concepts de résistances verticale (ou race-spécifique) et horizontale (non race-spécifique). Des études portant sur la rouille du lin (*Melampsora lini*) ont ensuite permis à Flor (1971) de montrer que la résistance verticale était dans un grand nombre de cas régulée par un processus de reconnaissance entre un gène de résistance de l'hôte et un gène d'avirulence du pathogène (concept gène-pour-gène) et que cette reconnaissance se traduisait par une réaction d'hypersensibilité de l'hôte. Généralement, les allèles de résistance et d'avirulence sont dominants par rapport aux allèles respectifs de sensibilité et de virulence. Il est à noter que dans le cadre de ce concept, la virulence n'est qu'une absence d'avirulence, il n'existe pas à proprement parler de "gènes de virulence" (Ribeiro do Vale et al 2001). Une approche complémentaire consiste à différencier les résistances quantitatives gouvernées par un nombre important de gènes (Geiger & Heun 1989) des résistances qualitatives pour lesquelles un nombre restreint de gènes (souvent un seul) est en jeu. Dans le cas des résistances quantitatives, il est alors possible de considérer la résistance comme une variable quantitative au même titre que tout autre paramètre agronomique (croissance, production...) pour laquelle des analyses de variance appropriées permettront de déterminer les composantes environnementales, génétiques additives et de dominance, de prédire les nombres de gènes en jeu et les gains génétiques réalisables par génération. Cependant, une sérieuse limitation à cette approche quantitative est que les caractères observés servant à quantifier la résistance étudiée ont fréquemment une distribution non normale (Newcombe et al 1996; Ghesquière et al 1997; Sallaud et al 2003; Dowkiw et al 2003; Le Guen et al 2003), ce qui constitue un obstacle théorique aux analyses de variance. D'autres auteurs se sont intéressés aux différences entre résistance partielle et complète, montrant que les résistances partielles étaient souvent dues aux effets de plusieurs composantes de la résistance dont la résultante contribue à minimiser le processus épidémique (Parlevliet 1979). Dans une optique différente, de nombreux auteurs ont cherché à caractériser la durabilité d'une résistance (Johnson 1981;

Niks & Rubiales 2002), afin d'examiner s'il était possible de mettre en œuvre des stratégies visant l'obtention de cultivars durablement résistants (McDonald & Linde 2002). Bien que d'un point de vue évolutionniste toute résistance soit considérée comme transitoire, des variations importantes de longévité de l'efficacité des résistances sont observées, parfois pour un même pathosystème (Parlevliet 2002). Il a longtemps été considéré que les résistances partielles et polygéniques étaient potentiellement les plus durables (Vanderplank 1975). Toutefois, certains auteurs admettent maintenant que ce n'est pas une loi générale et que parmi des résistances considérées comme durables on peut trouver des résistances complètes ou incomplètes, et soumises à un contrôle génétique simple ou complexe (Johnson 2000; Parlevliet 2002).

D'une manière générale, les hypothèses sur la nature polygénique ou oligogénique des résistances étaient basées jusqu'aux années 1990 sur des résultats issus indirectement de l'analyse de données au moyen de la génétique quantitative. La possibilité depuis une quinzaine d'années d'identifier des marqueurs moléculaires situés à proximité de locus impliqués dans des mécanismes de résistance a permis d'avoir une vision plus objective du nombre de gènes mis en jeu et de leurs contributions respectives. Il serait toutefois illusoire de penser que la détection de QTLs de résistance apportera toutes les réponses à ces questions. Il est en effet peu vraisemblable que dans le cas d'une résistance polygénique, tous les gènes impliqués puissent être identifiés par cartographie de QTL. La puissance de ce type d'analyse ne permet pas d'isoler du bruit de fond les contributions des gènes les plus faibles. La cartographie de QTLs peut aussi contribuer à rendre encore plus compliqués des modèles établis alors que cet outil n'existait pas. Un exemple significatif est fourni par les résistances partielles pour lesquelles avaient été identifiées des composantes contribuant à limiter la rapidité ou l'étendue du processus épidémique (taille des lésions, nombre de lésions, durée de latence infectieuse, AUDPC etc.). Il était couramment admis que ces composantes étaient chacune contrôlées par un gène (ou un groupe de gènes) différent(s) et que la multiplicité de ces composantes était donc une manifestation de la nature polygénique de la résistance observée, et - par un prolongement abusif du raisonnement - une indication du caractère durable de cette résistance. Or la cartographie de QTL montre souvent l'existence de QTLs ubiquistes qui peuvent avoir une incidence majeure sur deux ou plusieurs composantes différentes d'une même résistance (Lespinasse et al 2000b; Talukder et al 2004), ce qui signifie qu'une résistance partielle pour laquelle plusieurs composantes phénotypiques ont été caractérisées n'est pas nécessairement une résistance polygénique.

### 3.3.4.2. Quel modèle pour la résistance de MDF180 ?

Trois faits présentés dans la première partie de ce chapitre caractérisent bien cette résistance :

- Elle est durable, puisqu'elle se maintient depuis plus de 30 ans sur plusieurs centaines d'hectares
- Elle est partielle, puisque tout isolat inoculé sur MDF180 provoque un développement restreint de la maladie
- Elle est non race-spécifique, puisque elle est efficace vis-à-vis de tous les isolats testés jusqu'à présent

On peut de la même façon inférer que cette résistance n'est pas caractérisée par une réaction d'hypersensibilité, et qu'elle ne fait donc vraisemblablement pas intervenir de réaction gène pour gène.

Au moins trois composantes indépendantes sont impliquées dans cette résistance partielle : TR qui traduit à la fois la nature de l'interaction hôte-pathogène et l'intensité d'émission de conidies; DIL qui est une mesure indirecte du pourcentage de surface foliaire infectée; DS qui indique la possibilité pour l'hôte de bloquer une partie du cycle de développement du pathogène. La variable AT qui mesure l'intensité d'attaque au champ ne peut pas être considérée comme une composante de la résistance indépendante des autres composantes puisqu'elle rend compte à la fois de la pression de l'inoculum – donc de l'intensité de sporulation liée à TR - et des déformations provoquées sur les folioles – donc du pourcentage de surface foliaire infectée lié à DIL. De plus le niveau visible d'attaque en plantation est assez fortement dépendant des conditions environnementales.

Que ce soit en conditions naturelles d'infestation ou en inoculation contrôlée, pour un inoculum donné toutes les variables observées sont sous le contrôle du même gène majeur auquel viennent s'ajouter les effets d'un nombre restreint (de 1 à 3) de QTLs mineurs. Le gène majeur impliqué est *M15md* dans le cas de la souche guyanaise et de l'infestation naturelle en Guyane, et un gène majeur sur le groupe de liaison g13 proche de *M13-1bn* dans le cas des souches provenant de l'état de Bahia.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la nature de la résistance au SALB de MDF180 peut donc être assimilée à la conjonction au sein d'un même génotype de deux résistances partielles

monogéniques (ou pratiquement monogéniques), n'impliquant pas de phénomène d'hypersensibilité. Cette configuration est particulièrement originale dans le cas d'un génotype non issu d'un processus de sélection. En effet, chez certaines espèces pérennes, il peut être fait mention au sein d'une population en ségrégation de l'existence de deux gènes majeurs de résistance mais provenant chacun d'un des parents de la descendance, comme c'est le cas pour la résistance du peuplier hybride *P. trichocarpa* x *P. deltoides* à *M. larici-populina* (Jorge et al. 2005). De même, plusieurs gènes majeurs peuvent conférer une résistance importante du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*), mais ces gènes majeurs proviennent tous de variétés ou d'espèces différentes (Olivier & Lespinasse 1982). Tout se passe chez MDF180 comme si on était en présence d'un "pyramiding" naturel de deux gènes majeurs de résistance partielle.

### **3.3.5. Applications à la SAM**

Si les expérimentations ultérieures confirment l'importance du rôle joué dans la résistance au SALB chez le cultivar MDF180 par les deux gènes majeurs identifiés sur g13 et g15, alors une stratégie de sélection assistée par marqueurs pourrait être mise en place. Il convient évidemment tout d'abord d'identifier des marqueurs plus proches des locus d'intérêt, et si possible encadrant ces locus. Lorsque ce marquage resserré sera disponible, il sera alors possible d'éliminer dès le stade pépinière les individus ne présentant pas les formes alléliques désirées, et ne conserver dans le processus ultérieur de sélection que les 25% d'individus ayant aux locus marqueurs les allèles liés aux allèles ciblés chez les deux locus de résistance. Cette densification de la carte génétique de MDF180 dans les régions intéressantes des groupes de liaison g13 et g15 a déjà commencé avec des marqueurs AFLP.

### **3.3.6. Génétique d'association**

Rappelons que l'objectif de cette cartographie de QTLs ou gènes de résistance était d'identifier des régions du génome au sein desquelles serait recherchée de façon privilégiée parmi les populations amazoniennes sauvages d'*H. brasiliensis* une éventuelle association entre marqueurs moléculaires et phénotype résistant.

Lorsqu'aucune information ne permet *a priori* d'inférer la localisation probable d'un gène d'intérêt agronomique, les études d'association marqueur-caractère doivent nécessairement être basées sur une couverture du génome complet avec une densité de marqueurs dépendant

de l'étendue moyenne du déséquilibre de liaison chez l'espèce considérée (Gupta et al 2005). Cette stratégie a permis notamment d'identifier des gènes de résistance aux pathogènes chez *Arabidopsis* (Aranzana et al 2005), des gènes majeurs de résistance à *Puccinia hordei* chez l'orge (Kraakman et al 2006). Cependant de telles études nécessitent un nombre important de marqueurs, et ne sont pour l'instant réalisées que sur des plantes modèles ou sur des plantes de très grande culture.

En revanche, lorsque des travaux antérieurs ont mis en évidence sur des populations en ségrégation des marqueurs liés à l'expression d'une résistance, une stratégie possible et plus économe consiste à ne rechercher au sein de collections de génotypes que des associations au moyen de ces marqueurs proches de gènes de résistance. Cette option a donné des résultats particulièrement satisfaisants dans le cas de la pomme de terre, pour des gènes de résistance à *Phytophthora infestans* (Gebhardt et al 2004). Cette stratégie peut également être développée avec des gènes candidats orthologues, ainsi que cela a été fait pour la détection d'association allèles-phénotypes dans une collection de pommes de terre pour un gène orthologue de résistance à *Verticillium dahliae* caractérisé chez la tomate (Simko et al 2004).

Pour ce qui concerne notre étude, et étant donné la proximité génétique entre la population dont est originaire le génotype résistant MDF180 et d'autres populations amazoniennes (voir chapitre suivant), il apparaît légitime de tirer partie des informations concernant l'identification des facteurs génétiques de résistance chez MDF180 pour déterminer les régions du génome dans lesquelles on recherchera une association marqueur-caractère. Les études ultérieures d'association génétique seront donc focalisées sur une des deux régions où sont situés les gènes majeurs de résistance au SALB chez MDF180, sur le groupe de liaison g15 (voir chapitre 5).

## Chapitre 4 – Structure de la diversité dans les populations sauvages d'*Hevea brasiliensis* d'Amazonie occidentale

Dans le chapitre précédent nous avons montré que le cultivar MDF180 était doté d'une résistance partielle de haut niveau au SALB qui se maintient depuis plus de trente ans en conditions de forte infestation et de grande diversité de l'inoculum naturel de *M. ulei*. Cette résistance est en grande partie due à la présence chez MDF180 d'un allèle favorable pour chacun des deux locus importants de résistance situés sur les groupes de liaison g13 et g15. Ainsi qu'il a été exposé, le cultivar MDF180 est issu d'une sélection massale pratiquée sur un nombre important de génotypes sauvages qui ont été prospectés en 1947 dans la région de Madre de Dios au Pérou. D'autres génotypes provenant de la même prospection sont toujours disponibles dans diverses collections *ex situ*, notamment sur la station expérimentale du Cirad à Combi en Guyane. Par ailleurs, il a été procédé dans les années 1970 et 1980 à d'autres prospections dans les zones d'origine de l'espèce *H. brasiliensis*, particulièrement dans les états brésiliens de l'Acre, du Rondônia et du Mato Grosso. Dans le but de diversifier les sources de résistance au SALB mises à disposition des programmes d'amélioration génétique, il peut donc se révéler intéressant d'essayer de mettre en évidence dans ces populations sauvages de nouveaux locus et/ou de nouveaux allèles impliqués dans les mécanismes de résistance. La possibilité d'identifier et de marquer précisément des locus de résistance directement dans des populations représenterait un avantage majeur pour une espèce comme l'hévéa. Il s'agirait d'une méthode complémentaire et alternative à la cartographie de QTLs sur descendance, méthode particulièrement longue et difficile à mettre en œuvre chez une plante pérenne peu fertile. Ainsi que nous l'avons vu au chapitre 1, la manière la plus rationnelle pour mener ce genre d'investigation est d'utiliser la génétique d'association entre des marqueurs génétiques et des phénotypes de résistance. Ceci suppose qu'un certain niveau de déséquilibre de liaison existe au sein des populations étudiées et qu'on soit en mesure de révéler ce déséquilibre de liaison avec des techniques appropriées. Cela suppose également que si un déséquilibre de liaison était observé, il soit bien dû à une proximité physique entre marqueurs, et non à une structuration génétique sous-jacente non décelée de l'échantillon étudié. C'est pourquoi il est très important, préalablement à toute étude portant sur l'étendue et l'intensité du déséquilibre de liaison, de bien caractériser la structuration de la diversité

génétique de l'échantillon que l'on se propose d'étudier, afin de quantifier ce qui relève du déséquilibre de liaison d'origine physique et ce qui est plus du domaine du "déséquilibre de structure".

L'objectif du présent chapitre est donc de décrire la structuration de la diversité génétique au sein de diverses populations d'*H. brasiliensis* originaires du Pérou et des états brésiliens de l'Acre, du Rondônia et du Mato Grosso. Il est présenté sous forme d'un manuscrit soumis pour publication dans la revue *Tree Genetics and Genomes*. Il sera suivi d'une partie reprenant quelques résultats qui ne figurent pas dans le projet d'article, et enfin d'une conclusion.

#### 4.1. Article soumis à la revue *Tree Genetics and Genomes*

##### **Genetic structure of Amazonian populations of *Hevea brasiliensis* assessed by SSR markers, and application to germplasm management**

V. Le Guen

F. Doaré

C. Weber

M. Seguin

##### **Affiliations and addresses**

V. Le Guen – C. Weber – M. Seguin

CIRAD, Umr DAP, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

F. Doaré

CIRAD, Upr Bioagresseurs de Pérennes, BP 701, 97387 Kourou Cedex, French Guiana

##### **Keywords**

*Hevea brasiliensis*; population genetic structure; germplasm management

##### **Communicating author**

V. Le Guen

CIRAD, Umr DAP, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Fax : 33 4 67 61 57 93

[vincent.le\\_guen@cirad.fr](mailto:vincent.le_guen@cirad.fr)

## Abstract

Current *ex situ* collections of wild rubber tree (*Hevea brasiliensis*) have been constituted more than 25 years ago. They mainly gather individuals from South West Amazonia populations. Available information about the structure of genetic diversity among these populations is fragmented and needs to be refined. Analyzing polymorphism at 15 microsatellites loci all distributed on different *Hevea* chromosomes, we report genetic diversity of 307 clonally propagated individuals representing 19 populations. All analysed loci were highly polymorphic, with an average number of 21.7 alleles per locus, and displayed an important heterozygote deficiency. Differentiation among populations was analysed on a more balanced subsample of 220 individuals issued from 14 populations. The overall  $F_{ST}$  was low but significant (0.123), suggesting a moderate differentiation. Out of 91 pairwise population comparisons estimated by  $\theta$ , all but 9 were significant. Non significant comparisons were related to geographically close populations from Acre or Rondônia (Brazil). Mato Grosso (Brazil) populations were genetically more distant from all other populations. A highly significant correlation between genetic and geographical distances was shown by Mantel test. Differentiation among populations could be explained by an important effect of 'isolation by distance' and by a secondary effect of 'hydrographical network'. The Bayesian algorithm implemented in STRUCTURE software allowed identification of 3 clusters of populations thus confirming data obtained with  $F_{ST}$  estimators. It is likely that some of these populations do not exist anymore because of severe deforestation in their area of origin. Suggestions are made for improvement of the understanding of existing *ex situ* collections structure, maintenance of genetic diversity, and sampling of areas not yet represented in existing collections.

## Introduction

In spite of numerous recent studies on its global negative impact (Fearnside 2005; Ferraz *et al.* 2005; Laurance *et al.* 2004a), destruction of tropical rainforest continues at an alarming rate. Continuous deforestation during the last decades and recent climatic changes both enhance reduction and fragmentation of tropical forest areas, with consequent alteration of gene flow (Young *et al.* 1996) and global loss of genetic diversity, coming along with the reduction of population size of tropical forest species (Billington 1991; Templeton *et al.* 1990). Such loss of genetic diversity particularly affects trees with high economic value (Roth Novick *et al.* 2003), but also cultivated crops originating from tropical rainforest. Because long term genetic improvement of cultivated crops depends upon available genetic diversity, plant geneticists and breeders hopefully anticipated this threat on *in situ* populations by establishing *ex situ* collections thus grouping together a maximized genetic diversity on reduced areas.

This is of particular relevance regarding the genetic improvement of *Hevea brasiliensis* since all high yielding cultivars in the world originated from breeding programs initially developed in South East Asia with a very narrow genetic basis. According to various sources (Dean 1987; Webster & Baulkwill 1989), exportation of rubber tree seeds from Pará (Brazil) by Wickham in 1876 resulted in the introduction of 22 seedlings in Singapore botanical garden. Plantations of seedlings were first derived from these few trees and then rapidly spread over most of South East Asia countries. The budding technique developed in the 1920s (Dijkman 1951), contributed to the generalization of clone cultivation. The first clones were derived by mass selection of elite trees within these seedlings plantations.

Several *Hevea* germplasm surveys were carried out during the 2nd half of the 20<sup>th</sup> century in order to enlarge the genetic basis. They resulted in *ex situ* collections located in the main rubber tree research countries (Priyadarshan & Gonçalves 2003), all such collections planted with clonally propagated trees. An important collection of *H. brasiliensis* genotypes issuing from various Colombian areas was gathered by Schultes after 1945 and then duplicated in Côte d'Ivoire (Nicolas 1985). In 1948, a survey was organized by the Peruvian Ministry of Agriculture in the Madre de Dios region (Rands & Polhamus 1955). The resulting seedlings were multiplied by grafting (under the name of MDF clones), and then introduced and studied in Liberia, Guatemala, and in the Brazilian state of Bahia (Bos & McIndoe 1965). In 1974,

another collecting expedition was carried out by both Brazilian EMBRAPA and French IRCA rubber research institutes, in Brazilian states of Acre and Rondônia (Hallé & Combe 1974; Seguin *et al.* 2003). Forty two wild elite tapped trees were thus collected and propagated by grafting. The largest survey was organized by the International Rubber Research Development Board (IRRDB) in 1981 (Ong *et al.* 1983), and collected numerous genotypes originating from Brazilian states of Acre, Rondônia and Mato Grosso (Gonçalves 1981; Lins *et al.* 1981; Paiva 1981). More than 64.000 seeds and 1,500 m of budwood from 194 trees resulted from these collections (Onokpise 2004), 50% out of which were retained in Brazil, while the balance was distributed to Malaysia (35%) and Côte d'Ivoire (15%). These three countries were in charge of conservation of this wild germplasm (further denominated as IRRDB germplasm) and its redistribution to other IRRDB member countries, where it was characterized and evaluated (Ong & Tan 1987; Clément-Demange *et al.* 1998; Reghu *et al.* 2004).

A precise understanding of the structure of genetic diversity among these different collections would be of great interest to optimize their management and evaluate the necessity of further sampling in Amazonian areas not yet covered by rubber tree collections. However, previous studies on this topic led to fragmented information due to markers heterogeneity and to limited coverage of sampled material. A first study was carried out with 10 isozyme markers on a sample of 263 individuals from the 1981 IRRDB collection (Chevallier 1988). Another study was later performed on 92 individuals from the same 1981 IRRDB populations with RFLP markers, (Besse *et al.* 1994; Seguin *et al.* 2003). Then, a third study (Lekawipat *et al.* 2003), used PCR-derived markers, but was restricted to 68 individuals and 12 microsatellite markers. This last study can thus be seen as a preliminary investigation upon possibilities of assessing a genetic structure among rubber tree populations using this type of polymorphic marker.

*H. brasiliensis* is an assumed outcrossing species, but self pollination has already been described in artificially planted populations (Webster & Baulkwill 1989; Leconte *et al.* 1994). This feature has never been studied in natural populations, although considering the generally low rubber tree standing density in Amazonian forest and its high longevity (Laurance *et al.* 2004b), crosses between related individuals may occur. *Hevea* seeds cannot be wind-dispersed due to their size and weight, and dissemination by birds or mammals should not exceed few hundreds of meters. Seasonal flooding in some parts of Amazon basin could

possibly help in seeds dissemination. Previous studies (Yeang & Chevallier 1992) suggested that *Hevea* pollen could travel up to 1.1 km in artificially planted populations, which might be considered as a maximum dispersal distance in natural Amazonian populations.

In this study we report the characterization of genetic structure of *H. brasiliensis* natural populations collected from a large area, using microsatellite markers. Trees issuing from three of the above described collections were analysed with microsatellite markers that have been recently developed for *Hevea* genetic mapping (Lespinasse *et al.* 2000; Seguin *et al.* 2001). Microsatellite markers are well adapted to genetic diversity analyses because of their neutrality, their locus specificity, their multi-allelism, their co-dominant segregation pattern, and their easiness to use. Our specific goals were to describe within and among population diversity, to test for association between geographical and genetic distances, to define homogeneous groups of populations and to provide recommendations for existing or future collections management.

## **Materials and Methods**

### **Plant Material**

An *ex situ* collection was established in French Guiana during the 1980s and since then continuously supplied with grafted trees coming from various other collections. This collection was thus increased with numerous trees resulting from the survey in the Peruvian Madre de Dios region (MDF clones), from 1974 EMBRAPA/IRCA collection and from 1981 IRRDB collection. We defined a panel of 307 individuals from this *ex situ* French Guiana collection in order to get trees from the largest geographical area, and to maximize the number of studied populations, even with few trees per population. This panel thus consisted of 6 genotypes from MDF origin, 15 genotypes from 1974 EMBRAPA/IRCA survey and 286 genotypes from IRRDB germplasm. Among these 286 genotypes, 72 were collected from 5 distinct locations in Acre, 96 from 7 locations in Rondônia and 108 from 4 locations in Mato Grosso (Table 1). The 307 individuals were thus globally originating from 19 locations with very unbalanced population sizes, some populations (MT/A, MT/VB) being represented by only one individual in the *ex situ* French Guiana collection. The harvesting places are illustrated in Figure 1.

### DNA extraction

DNA was isolated from 500 mg samples of fresh leaves per genotype. Leaflets were cut in small pieces and crushed in liquid nitrogen in presence of polyvinylpyrrolidone. Extraction was carried out with buffer made of 2% MATAB (mixed alkyltrimethylammonium bromide), 1.4M NaCl, 1% polyethylene glycol, 0.5% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 20 mM EDTA pH 8.0, and 100 mM Tris HCl pH 8.0, at 74 °C during 30 min. Solvent phasing was made by addition of chloroform:isoamyl-alcohol (24:1 v/v) and centrifugation at 7000 g during 10 min. DNA precipitated from the aqueous phase by adding cold isopropanol, DNA pellet was then air dried and resuspended in 200 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0) during 2 to 7 days at room temperature.

### SSR analysis

The microsatellite loci were selected either within a library enriched for microsatellite sequences in assumed non coding regions of *H. brasiliensis* genome (Seguin *et al.* 2001) or in BAC-ends (Seguin *et al.* 2006). The 18 SSR markers used in this study were chosen on each of the 18 *Hevea* linkage groups, corresponding to the 18 chromosomes of the *H. brasiliensis* genome ( $2n= 2x = 36$ ) as defined on a reference map based on segregating data from the PB260 x RO38 cross (Seguin *et al.* in prep). This can be considered as an optimized strategy for sufficient *Hevea* genome coverage and sampling with a reasonable number of markers. The sequences of corresponding primers for DNA amplification were previously deposited in public database (Table 2). The PCR was performed in a volume of 10 µl containing 0.2 mM of each dNTP, 1.0 X PCR buffer, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 µM of each primer, 1 U of *Taq* polymerase and 50 ng DNA. PCR procedure involved a denaturation cycle at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 50 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min 30 s and a final extension step at 72 °C for 8 min. PCR products were denaturated for 3 min at 94 °C before their separation on a 6.5% polyacrylamide gel on a Li-Cor 4300 DNA analyzer and visualized thanks to a fluorescence-labelled M13 primer. Gel analysis was performed with SAGA Generation 2 software, according to manufacturer's recommendations. Technical adjustments of the analyzer as well as calibration of the software enabled to choose between a 1 or 2 base pair precision according to the expected variation of microsatellite length. The results were visually checked. Samples of PCR products from 3 *Hevea* control clones were systematically included in each electrophoresis run for homogenization of fragment length among runs.

## Data analysis

All 18 loci were scored for the 307 individuals included in Table 1 (sample 1). For each of these loci, genetic variability was characterized by the observed number of alleles ( $N_a$ ), within sample gene diversity or expected heterozygosity  $H_E$  (Nei 1978) and observed heterozygosity ( $H_O$ ). Significance levels of departure from Hardy-Weinberg proportions were based on 1,000 randomisations of alleles within populations. These statistics were calculated using Fstat version 2.9.3.2 (Goudet 1995). Detection of eventual null alleles was implemented with the Genepop 4.0.7 software (Raymond & Rousset 1995) by computing maximum likelihood estimates with EM algorithm (Dempster et al 1977). Allelic richness was computed by rarefaction method (El Mousadik & Petit 1996) on 14 populations and 11 loci for which at least 6 individuals were genotyped per population, using Fstat software.

## *Differentiation among populations*

Important size differences among populations (from 1 to 66 individuals) make comparisons of their genetic diversity meaningless. Consequently, populations represented by less than 6 individuals were not considered for further analyses. The size of larger populations was reduced to 20 to 25 individuals by randomized sub-sampling. Individuals from Jaru district (in Rondônia) collected in 1974 and in 1981 were grouped to form a unique population of 8 trees. A more balanced sample was thus defined, with 220 individuals from 14 populations, and will be referred hereafter as sample 2 (Table 1). For each population, expected and observed heterozygosity ( $H_E$  and  $H_O$ ), and fixation index ( $f$ ) were computed overall loci, using GDA, version 1.0 (Lewis & Zaykin 2001). Confidence interval of fixation index was calculated for each population from 100 Bootstraps over individuals with all loci. Single locus and overall loci estimates of Wright's  $F$  statistics, and confidence interval from 1000 Bootstraps over loci were also computed with Fstat software. Significant differentiation among populations was characterized by  $F_{ST}$  statistics (Weir & Cockerham 1984) between pairs of populations, with corresponding  $P$  values determined over 10,000 permutations of individuals among populations, using GENETIX version 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2000). In order to test for a contribution of geographic distance to population differentiation, a nonparametric pairwise correlation test between the matrices of  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  and the logarithm of geographical distances (Mantel 1967; Rousset 1997) was implemented, and  $P$  value for  $Z$  Mantel association parameter calculated with 10,000 permutations among genetic distances, using also GENETIX.

### *Genetic structure*

Sample genetic structure was also investigated using the Bayesian clustering algorithm implemented in STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al* 2000). As the selected markers were each located on a different chromosome, we were sure that there was no linkage disequilibrium due to close proximity between markers, a prerequisite for using STRUCTURE software. We used the admixture model on the whole dataset (sample 1 in Table 1) with no previous population information, and chose the "correlated allele frequencies between populations" option. Ten runs with a burn-in of 100,000 and a run length of 500,000 iterations were performed for a number of clusters varying from K=1 to K=9. Graphical display of population structure was implemented with DISTRUCT software (Rosenberg 2004). To determine the most probable number of clusters, we used the ad hoc statistic defined by Evanno *et al.* (2005) as  $\Delta K$ , the mean of the absolute values of  $L''(K)$  divided by the standard deviation, where  $L(K)$  stands for mean likelihood plotted over 10 runs for each K.

## **Results**

### *Genetic diversity over sample 1*

A global rate of 3.2% missing value was registered after genotyping of all individuals over 18 loci. All 18 SSR loci were highly polymorphic in the sample of 307 individuals (Table 2), with an average number of 21.7 alleles per locus. Mean gene diversity ( $H_E$ ) and mean observed heterozygosity ( $H_O$ ) were globally different (0.739 and 0.599 respectively), which indicated an important heterozygote deficiency regarding every analysed locus. Departure from overall Hardy Weinberg proportions was significant for all loci, except BAC55B02. For three SSR loci (namely A2762 T2603 and TAs2172) were detected high possible percentages of null alleles, corresponding for two of them to an important number of missing values. These three loci were consequently discarded from further analyses. Allelic richness standardized to 6 individuals per population varied from 4.8 to 6.5 alleles (Table3).

### *Population differentiation over sample 2*

The second sample was derived from the original sample by randomized sub-sampling within larger populations and elimination of smaller ones. Both populations of Mato Grosso, with highest number of individuals but rather low allelic richness, were adjusted to 25 individuals. Differences between expected and observed heterozygosity were slightly lower when compared for each population overall loci (Table 3). However these differences remained

generally high, and important fixation index values indicated significant departures from Hardy-Weinberg expectations for 10 out of 14 populations. Overall  $\theta$  value, the estimate of Wright's  $F_{ST}$ , was significantly positive ( $F=0.116$ ,  $P<0.01$ ), indicating that allelic frequency heterogeneity among populations was also globally responsible for global heterozygosity deficiency (Table 2). A Bonferroni correction was applied to P-values computed on pairwise  $F_{ST}$  between populations (Table 4) to take into account possible significant values obtained by chance. These pairwise  $F_{ST}$  were generally moderate but significantly positive (Table 5), except for five comparisons among Acre populations, three comparisons among Rondônia populations and the comparison between AC/T and RO/J. Maximum  $F_{ST}$  values for pairwise comparisons were encountered between the population of Itauba in Mato Grosso and almost all Acre and Rondônia populations. Mantel test based on matrices of  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  and the logarithm of geographical distances showed very significant value ( $P<0.0001$ ) for Z coefficient, thus indicating that geographically distant populations got a high probability of being genetically distinct (Table 4).

#### *Genetic structure*

The STRUCTURE analysis coupled with computation of Evanno  $\Delta K$  statistics (Fig 2 a and b) suggests a primary partition of individuals into two clusters ( $K=2$ ) with globally few admixed samples, and a secondary partition into three clusters ( $K=3$ ). The first primary cluster is only made of individuals from Mato Grosso origin, and remains unchanged whether K value is 2 or 3. The second primary cluster includes individuals from Acre and Rondônia (either from EMBRAPA/IRCA or IRRDB collections), the only individual from Vila Bela population (Mato Grosso) and individuals from Madre de Dios (Peru). This second cluster is divided for  $K=3$  into two sub-clusters corresponding on the one hand to Acre and Madre de Dios individuals, and on the other hand to Rondônia individuals (Fig 3). The Pimenta Bueno population in the Rondônia cluster is characterized for nearly all individuals by an important admixture with Mato Grosso populations. Otherwise, little admixture is globally observed between these three clusters. Pairwise  $F_{ST}$  values between the three clusters were 0.137 for MT-AC comparison, 0.114 for MT-RO, and 0.062 for AC-RO. These three values were highly significant ( $P<0.001$ ).

#### **Discussion**

Our work is the first one combining sufficient number of genetically independent multi-allelic microsatellite markers and a large sample of each prospected population, including the Madre

de Dios population which had never been previously characterized. The three previous studies on genetic structure among wild rubber tree populations cited above led to globally similar conclusions, but with noticeable differences regarding comparative amount of diversity between Acre, Rondônia and Mato Grosso, and definition of homogeneous groups of populations. Such differences may result from low allele numbers in isozyme markers (Chevallier 1988) or insufficient sample sizes (Besse *et al.* 1994; Lekawipat *et al.* 2003).

Deficit of observed heterozygosity in relation to expected heterozygosity for nearly all loci and populations may principally result from the probable existence of non detected null alleles, which erroneously led to consider heterozygous individuals with a null and a visible allele as homozygous ones (Dakin & Avise 2004), thus contributing to a significant fixation index for 10 out of 14 populations. This hypothesis of null alleles is reinforced by the observed rate of missing value, which was globally low but could be explained for some loci by homozygous null-allele individuals. Consequent elimination of 3 from the 18 genotyped loci was done according to recommendations from Bonin *et al.* (2004). An alternative explanation for significant fixation index is the possibility of self pollination or crosses between relatives, as mentioned in the introduction.

Our analysis of microsatellite data on a large sample of individuals clearly suggests a “isolation by distance” model where spatial distance between populations is sufficient to account for genetic differentiation (Fig 4). That means that geographical distance is the main parameter for genetic differentiation but not necessarily the only one. In a previous study based on RFLP and isozyme markers (Besse 1993; Seguin *et al.* 2003), it was suggested that the genetic structure of Amazonian *H. brasiliensis* populations could be partly explained by the hydrographical network, with preferential gene flow between populations located on a same Amazon tributary basin. This hypothesis could thus explain the observed genetic proximity between geographical distant populations such as MT/IT and MT/C on the one hand and "Wickham" cultivated clones originating from downstream on the Tapajos river (see Fig. 1) on the other hand (Besse *et al.* 1994; Lekawipat *et al.* 2003). Our results also suggest that the “hydrographical network” is a secondary factor determining genetic differentiation between *Hevea* populations: for instance the Sena Madureira population (AC/S) is located at 220-250 km from the Feijo (AC/F), Tarauaca (AC/T), and Brasileira populations (AC/B), but at 320 km far from the MDF one. In contrast, irrespective of the geographic distance, AC/S appears genetically much closer to the two populations located on the same river basin of the

rio Purus ( $F_{ST}$  of 0.028 and 0.037 respectively) than the two other ones located on the rio Jurua basin ( $F_{ST}$  of 0.077 and 0.066 respectively). It is thus likely that genetic distance between populations would be best explained by a combination of a strong "isolation by distance" effect with a secondary "hydrographical network" effect. This combined "isolation-by-distance / hydrographical network" hypothesis would thus explain the partition in three clusters obtained with STRUCTURE, as administrative boundaries between Brazilian states were determined on hydrographical basis: Rio Jurua and Rio Purus for Acre (and Madre de Dios), Rio Madeira for Rondônia and Rio Tapajos for Mato Grosso (Fig 1). Confirmation of this partition into three clusters lies in significant pairwise  $F_{ST}$  values between clusters.

Other studies evidenced isolation by distance over a similar range of distances for tropical trees (Collevatti *et al.* 2001; Roth Novick *et al.* 2003; Lemes *et al.* 2003) or for temperate trees (Dyer & Sork 2001; Heuertz *et al.* 2001). This type of genetic differentiation is generally linked to rather limited dispersion of seeds and pollen.

Analysis with STRUCTURE also allowed assignation of Vila Bela population (in Mato Grosso state) to the Rondônia group in accordance with Besse *et al.* (1994), although this population could not be classified with  $F_{ST}$  statistics or Mantel test due to its size reduced to one individual. Similarly, STRUCTURE analysis confirmed that individuals prospected in 1974 respectively in Acre and Rondônia states were assigned to the right groups. Finally, the important admixture observed in RO/PB individuals is compatible with low pairwise  $F_{ST}$  values observed between RO/PB population and Mato Grosso populations (Table 4). These two results indicate that, though located in Rondônia state, the Pimenta Bueno population is genetically intermediate between Rondônia and Mato Grosso populations. The geographical situation of Pimenta Bueno is probably analogous to that of a contact zone between two sets of populations, in which migration rate between sets, though lower than migration rates within sets, is enough to maintain a noticeable gene flow.

No rubber tree demographic study has recently been undertaken, although recent satellite pictures suggested that the majority of rubber tree populations which were prospected in Rondônia until 1981 and analysed here, as well as part of populations from Acre and Mato Grosso, do not exist any more because of intense deforestation. Situation seems to be more favourable in Madre de Dios region of Peru where deforestation has not yet become a great matter of concern.

Our results on genetic structure of rubber tree populations can help designing *in situ* conservation policies as well as management strategies for existing *ex situ* collections. Although the analysed sample included populations as distant as 1.700 km one from the other, the total area under study in our work did not, and by far, exhaustively cover *H. brasiliensis* natural area. However, in this limited area, the main genetic feature is isolation by distance among rubber tree populations, suggesting that a maximum of genetic diversity could be preserved in small *in situ* reserves regularly distributed in the whole distribution area of rubber tree in Brazil and neighbouring countries (Bolivia, Peru and Colombia). Brazilian extractive reserves, which seek to integrate conservation of natural resources, sustainable development and human welfare (Fearnside 1989), are some of the existing structures well adapted to the preservation of rubber tree genetic diversity.. Current results should reinforce the interest in maintaining and multiplying such reserves.

Alternative solution to rubber tree *in situ* genetic preservation is the management of existing *ex situ* collections. Although the best preservation strategy would be to carry on with maintenance and evaluation of all genetic diversity represented by thousands of genotypes gathered in these collections, the present overall tendency is to reduce funding devoted to these activities. Information on structure of genetic diversity could help establishing global collections for long-term preservation with a minimum maintenance activity, and defining working collections for medium-term targeted utilization and breeding purposes.

Finally, whatever strategy will be preferred for the future of *H. brasiliensis* preservation either *in situ* or *ex situ*, structure of diversity on an “isolation by distance” pattern suggests that known genetic diversity represents only part of the actual one. It therefore emphasizes the urgent need for additional surveys in areas not yet covered by anterior collections, such as Amazonian basin in Colombia, Peru and Bolivia, and Brazilian states of Pará and Amazonas. Such surveys do not necessary need to collect at first seeds and budwood as was the case on previous surveys, since genetic analysis and modern techniques of geographical localization allow characterization and precise identification of individual trees from now on.

**Acknowledgement:** Genotyping was carried out on the "Plateforme de génotypage de la Région Languedoc Roussillon" in Montpellier, France. We are grateful to Brigitte Courtois for valuable comments on the manuscript.

## References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Goudet J, Bonhomme F (2000) GENETIX version 4.02. Logiciel sous Windows<sup>MT</sup> pour la génétique des populations
- Besse P (1993) Identification des clones cultivés et analyse de la diversité génétique chez *Hevea brasiliensis* par R.F.L.P. Thèse, Université Paris XI Orsay
- Besse P, Seguin M, Lebrun P, Chevallier MH, Nicolas D, Lanaud C (1994) Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 88:199-207
- Billington HL (1991) Effect of population size on genetic variation in a dioecious conifer. *Conserv. Biol.* 5:115-119
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13:3261-3273
- Bos H, McIndoe KG (1965) Breeding of *Hevea* for resistance against *Dothidella ulei* P. Henn. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaya* 19:98-107
- Chevallier MH (1988) Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozyme markers. *Journal of Natural Rubber Research* 3:42-53
- Clément-Demange A, Legnate H, Chapuset T, Pinard F, Seguin M (1998) Characterisation and use of the IRRDB germplasm in Ivory Coast and French Guyana : status in 1997. Symposium on natural rubber (*Hevea brasiliensis*). Volume 1. General, soils and fertilization, and breeding and selection sessions, Ho Chi Minh City, Vietnam, 14-15 october 1997. IRRDB, Brickendonbury (UK)
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10:349-356
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504-509
- Dean W (1987) Brazil and the struggle for rubber. Cambridge University Press, Cambridge UK
- Dempster AP, Laird NM, Rubin DB (1977) Maximum Likelihood from incomplete data via the EM algorithm (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society* 39:1-38
- Dijkman MJ (1951) *Hevea*. Thirty years of research in the Far East. University of Miami Press

- Dyer RJ, Sork VL (2001) Pollen heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Mol. Ecol.* 10:859-866
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92:832-839
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611-2620
- Fearnside PM (1989) Extractive reserves in Brazilian Amazonia. *BioScience* 39:387-393
- Fearnside PM (2005) Deforestation in Brazilian Amazonia: history, rates and consequences. *Conserv. Biol.* 19:680-688
- Ferraz SFB, Vettorazzi CA, Theobald DM, Ballester MRV (2005) Landscape dynamics of Amazonian deforestation between 1984 and 2002 in central Rondônia, Brazil: assessment and future scenarios. *For. Ecol. Manage.* 204:67-83
- Gonçalves PS (1981) Expedição internacional à Amazonia no território federal de Rondônia para a coleta de material botânico de seringueira *Hevea brasiliensis*. Embrapa - CNPSD, Manaus, pp 59 p
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86:485-486
- Hallé F, Combe J-C (1974) Mission en Amazonie brésilienne pour la récolte de matériel génétique nouveau destiné à l'amélioration de l'hévéa. Rapport de mission. IRCA, Paris, France, pp 19p.
- Heuertz M, Hausman J-F, Tsvetkov I, Frascaria-Lacoste N, Vekemans X (2001) Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Mol. Ecol.* 10:1615-1623
- Laurance WF, Albernaz AKM, Fearnside PM, Vasconcelos HL, Ferreira LV (2004) Deforestation in Amazonia. *Science* 304:1109-1111
- Laurance WF, Nascimento HEM, Laurance SG, Condit R, D'Angelo S, Andrade A (2004) Inferred longevity of Amazonian rainforest trees based on a long-term demographic study. *For. Ecol. Manage.* 190:131-143
- Leconte A, Lebrun P, Nicolas D, Seguin M (1994) Electrophorèse. Application à l'identification clonale de l'hévéa. *Plantations, recherche, développement* 1:28-36
- Lekawipat N, Teerawatanasuk K, Rodier-Goud M, Seguin M, Vanavichit A, Toojinda T, Tragoonrung S (2003) Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones

- of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite markers. *Journal of Rubber Research* 6:36-47
- Lemes MR, Gribel R, Proctor J, Grattapaglia D (2003) Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae), across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Mol. Ecol.* 12:2875-2883
- Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M (2000) A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 100:127-138
- Lewis PO, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Lins ACR, Silva GPd, Nicolas D (1981) Report of the Acre team in joint IRRDB/Brazil germplasm expedition. Embrapa/CNPSD, Manaus, pp 24 p.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Nicolas D (1985) Acquisition of *Hevea* material derived from Colombian Schultes collections. Paper presented at International Rubber Conference 18-19 October 1985. Kuala Lumpur, Malaysia
- Ong SH, Ghani MN, Tan AM, Tan H (1983) New *Hevea* germplasm -its introduction and potential. Paper presented at Rubber Research Institute of Malaysia Planters' Conference. Kuala Lumpur
- Onokpise OU (2004) Natural rubber, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., germplasm collection in the Amazon basin, Brazil: a retrospective. *Econ. Bot.* 58:544-555
- Paiva JRd (1981) Coleta de material sexuado e assexuado nos seringais nativos do Estado de Mato Grosso. Embrapa/CNPSD, Manaus, pp 26 p.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Priyadarshan PM, Gonçalves PS (2003) *Hevea* gene pool for breeding. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50:101-114
- Rands RD, Polhamus LG (1955) Progress report on the cooperative *Hevea* rubber development in Latin America. U.S.D.A., Washington DC, pp 79 p

- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2) Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249
- Reghu CP, Abraham ST, Nair RB, Varghese YA (2004) Performance of certain wild *Hevea* accessions in the early phase of further evaluation. *Natural Rubber Research* 17:103-107
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137-138
- Roth Novick R, Dick CW, Lemes MR, Navarro C, Caccone A, Bermingham E (2003) Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 12:2885-2893
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145:1219-1228
- Seguin M, Attard A, Bataillon T (2006) Analysis of linkage disequilibrium patterns in perennial or annual, autogamous or allogamous plant species. *Les Actes du BRG*:57-74
- Seguin M, Flori A, Legnate H, Clément-Demange A (2003) Rubber tree. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (eds) Genetic diversity of tropical crops. CIRAD & Science Publ. Inc., Montpellier, France & Enfield (NH), USA pp 277-305
- Seguin M, Gay C, Xiong T-C, Rodier-Goud M (2001) Microsatellite markers for genome analysis of rubber tree (*Hevea spp.*). Paper presented at IRRDB Symposium 2001. Montpellier (France), 25-28 September 2001
- Sériér J-B (2000) Les Barons du caoutchouc
- Templeton AR, Shaw K, Routman E, Davis SK (1990) The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 77:13-27
- Webster CC, Baulkwill WJ (1989) Rubber. Longman Singapore Publishers Ltd
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Yeang HY, Chevallier MH (1992) Estimation of pollen dispersal distances in *Hevea brasiliensis* by esterase isoenzyme markers. 1992
- Young A, Boyle T, Brown T (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11:413-418

**Table 1.** Number of *Hevea brasiliensis* trees per population and collection which are considered for the first and the second genetic analyses

Collection origin	State of origin	Population	Abbreviation	Number of genotypes	
				Sample 1	Sample 2
Peruvian Minist. Agric.(1948)	Madre de Dios (Peru)	Madre de Dios	MDF	6	6
EMBRAPA/IRCA (1974)	Acre (Brazil)	São José	AC/SJ	3	0
		Plácido de Castro	AC/PC	5	0
	Rondônia (Brazil)	Jaru	RO/J	3	3
		Calama	RO/C	4	0
IRRDB (1981)	Acre (Brazil)	Brasileira	AC/B	17	17
		Feijo	AC/F	15	15
		Sena Madureira	AC/S	29	20
		Tarauaca	AC/T	7	7
		Xapuri	AC/X	4	0
	Mato Grosso (Brazil)	Araçatuba	MT/A	1	0
		Juruena	MT/C	66	25
		Itauba	MT/IT	40	25
		Vila Bela	MT/VB	1	0
	Rondônia (Brazil)	Ariquemes	RO/A	14	14
		Calama	RO/C	23	23
		Costa Marques	RO/CM	22	19
		Jaru	RO/J	5	5
		Ji-Parana	RO/JP	22	22
		Ouro Preto	RO/OP	7	7
		Pimenta Bueno	RO/PB	13	12
<i>Total</i>				307	220

**Table 2.** Number of alleles, heterozygosity and Wright's F statistics on sample 1 and sample 2. A is the total number of alleles;  $H_E$ , within sample expected heterozygosity;  $H_O$ , observed heterozygosity; *P-value*, significance level of departure from Hardy Weinberg proportions; F, estimate of Wright's  $F_{IT}$ ;  $\theta$ , estimate of Wright's  $F_{ST}$ ; f, estimate of Wright's  $F_{IS}$ .

Marker name	EMBL identification	Sample 1				Sample 2		
		A	$H_E$	$H_O$	<i>P-value</i>	F	$\theta$	f
A2365	AY486666	17	0.771	0.670	< 0.001	0.228	0.090	0.151
A2368	AY486668	18	0.788	0.711	< 0.001	0.199	0.117	0.094
A2387	AY486690	16	0.799	0.701	< 0.001	0.239	0.146	0.108
A2389	AY486679	25	0.790	0.748	< 0.01	0.201	0.146	0.065
A2406	AY486697	27	0.830	0.586	< 0.001	0.302	0.077	0.244
A2413	AY486681	16	0.789	0.563	< 0.001	0.323	0.128	0.223
A2508	AY486740	41	0.894	0.821	< 0.05	0.081	0.057	0.026
A2684	AY486821	22	0.781	0.679	< 0.001	0.309	0.123	0.211
A2689	AY486822	25	0.815	0.638	< 0.001	0.272	0.110	0.181
A2736	AY486841	21	0.808	0.619	< 0.001	0.272	0.094	0.195
A2762	AY486852	29	0.772	0.509	< 0.001	-	-	-
BAC55B02	DQ115609	9	0.432	0.396	NS	0.356	0.311	0.064
T2083	AY486904	5	0.119	0.107	< 0.05	0.325	0.295	0.037
T2101	AY486604	31	0.721	0.633	< 0.001	0.281	0.158	0.146
T2603	AY486768	26	0.839	0.538	< 0.001	-	-	-
TA2163	AY486617	29	0.841	0.713	< 0.001	0.387	0.106	0.315
TAs2172	AY486619	18	0.671	0.391	< 0.001	-	-	-
TAs2558	AY486760	16	0.850	0.767	< 0.001	0.178	0.064	0.121
Mean overall loci		21.7	0.739	0.599		0.258	0.123	0.155
2.5% lower bound						0.217	0.098	0.114
97.5% upper bound						0.296	0.156	0.195

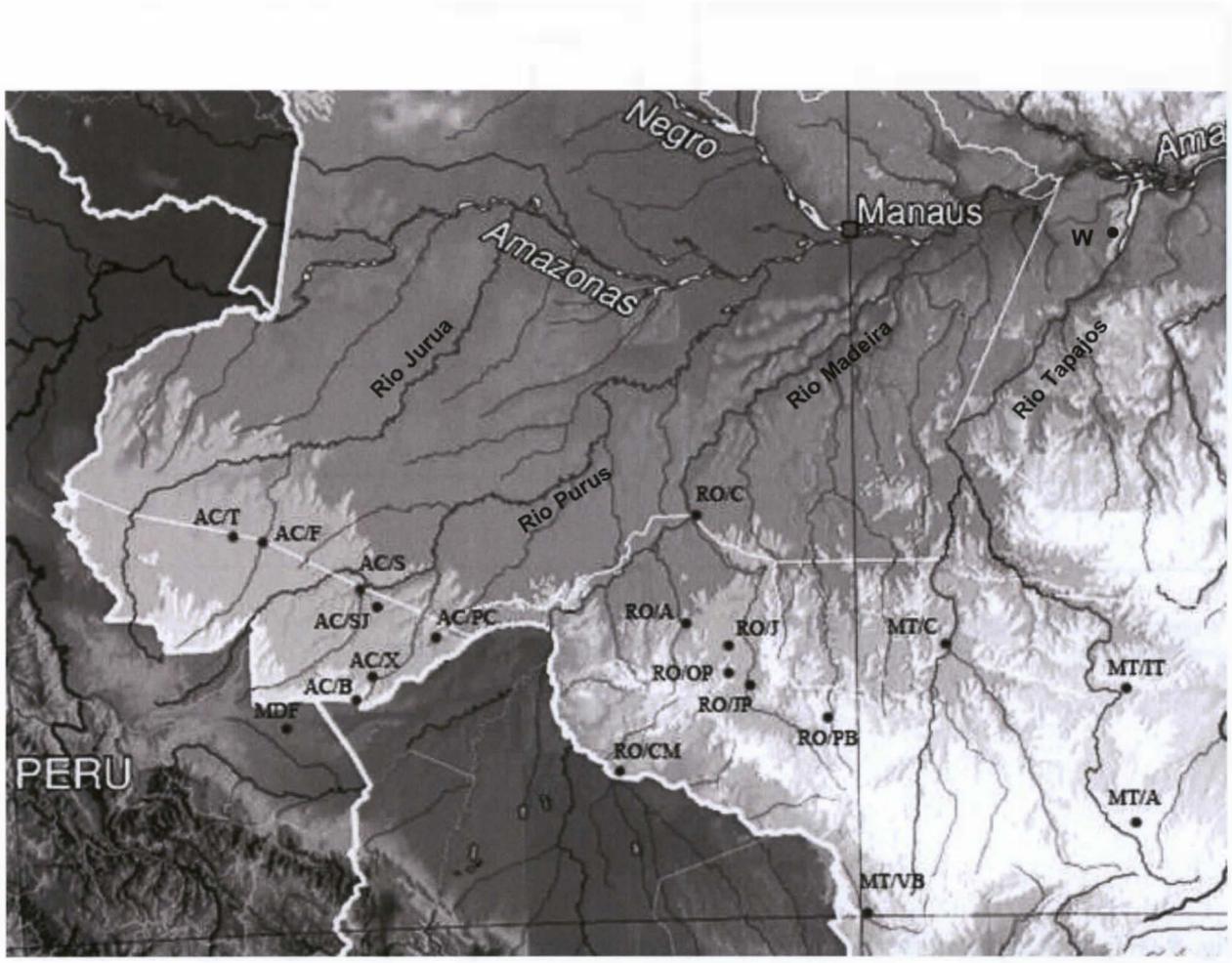
**Table 3.** Within population genetic diversity of sample 2 over 15 microsatellite loci.  $R_S$ , allelic richness standardized to 6 individuals from the original number of trees per population;  $n$ , mean sample size per locus;  $A$ , mean number of alleles per locus;  $H_E$ , expected heterozygosity (gene diversity);  $H_O$ , observed heterozygosity;  $f$ , fixation index; NS, non significant.

Population	Sample 2					
	$R_S$	$n$	$A$	$H_E$	$H_O$	$f$
AC/B	6.15	16.5	8.6	0.787	0.702	0.110
AC/F	5.38	14.8	6.5	0.696	0.639	0.085 <sup>NS</sup>
AC/S	6.14	19.3	9.1	0.781	0.684	0.127
AC/T	6.47	6.8	6.1	0.730	0.584	0.213
MDF	5.82	5.4	5.5	0.767	0.733	0.048 <sup>NS</sup>
MT/C	5.71	24.1	8.7	0.722	0.603	0.168
MT/IT	4.81	24.2	7.0	0.661	0.523	0.213
RO/A	6.20	13.6	7.9	0.768	0.674	0.125
RO/C	6.48	22.7	11.1	0.793	0.685	0.139
RO/CM	6.42	18.7	8.8	0.722	0.593	0.183
RO/J	5.77	7.8	5.7	0.756	0.643	0.159 <sup>NS</sup>
RO/JP	5.71	21.7	7.9	0.738	0.644	0.130
RO/OP	5.18	7.0	5.1	0.712	0.552	0.239 <sup>NS</sup>
RO/PB	5.98	12.0	7.4	0.754	0.567	0.257
Over all populations	5.87	15.3	7.5	0.742	0.631	0.156

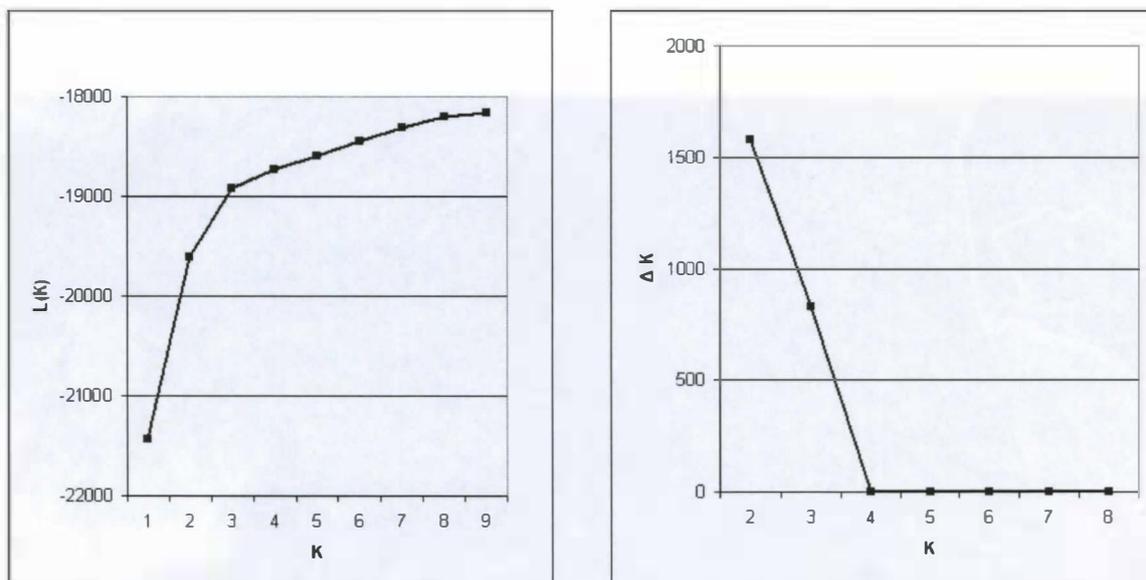
**Table 4.** Triangular distances matrices for computation of Mantel test. Above the diagonal: pairwise  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$  values. After Bonferroni correction all values are significantly  $>0$  ( $P < 0.001$ ), except for comparisons in *italic*. Below the diagonal: logarithm of geographic distances between populations in km.

	AC/B	AC/F	AC/S	AC/T	MDF	MT/C	MT/IT	RO/A	RO/C	RO/CM	RO/J	RO/JP	RO/OP	RO/PB
AC/B		0.075	0.024	<b>0.049</b>	<b>0.018</b>	0.181	0.236	0.078	0.126	0.113	0.092	0.148	0.112	0.136
AC/F	5.89		0.087	<b>-0.001</b>	<b>0.090</b>	0.222	0.277	0.118	0.166	0.127	0.148	0.202	0.195	0.169
AC/S	5.39	5.38		0.066	<b>0.021</b>	0.166	0.233	0.094	0.122	0.115	0.095	0.144	0.122	0.135
AC/T	5.97	3.95	5.51		0.073	0.191	0.235	0.079	0.129	0.086	<b>0.101</b>	0.148	0.125	0.140
MDF	5.02	5.94	5.77	5.94		0.161	0.227	0.106	0.125	0.110	0.106	0.162	0.123	0.142
MT/C	7.03	7.19	7.03	7.22	7.17		0.064	0.153	0.170	0.160	0.184	0.203	0.179	0.067
MT/IT	7.29	7.43	7.31	7.45	7.40	5.89		0.227	0.238	0.233	0.248	0.270	0.242	0.118
RO/A	6.45	6.72	6.44	6.76	6.68	6.23	6.76		0.085	0.066	<b>0.054</b>	0.091	0.082	0.098
RO/C	6.59	6.72	6.48	6.76	6.80	6.33	6.81	5.34		0.095	0.069	0.092	0.100	0.116
RO/CM	6.24	6.71	6.41	6.74	6.49	6.52	6.90	5.74	6.24		0.064	0.073	0.081	0.076
RO/J	6.56	6.82	6.57	6.86	6.77	6.05	6.66	4.52	5.56	5.77		0.081	<b>0.054</b>	0.107
RO/JP	6.61	6.88	6.63	6.92	6.80	5.96	6.60	5.08	5.81	5.73	4.33		<b>0.062</b>	0.136
RO/OP	6.57	6.84	6.59	6.88	6.77	6.05	6.64	4.82	5.72	5.69	3.78	3.69		0.115
RO/PB	6.80	7.04	6.84	7.07	6.96	5.61	6.37	5.83	6.17	6.02	5.51	5.19	5.38	

**Fig 1.** Locations of *Hevea brasiliensis* populations sampled in South West Amazonia. Abbreviations are the same as in Table 1. Collecting place of ancestors of all Wickham Asiatic cultivated clones is indicated by W (not a population studied in the present work).



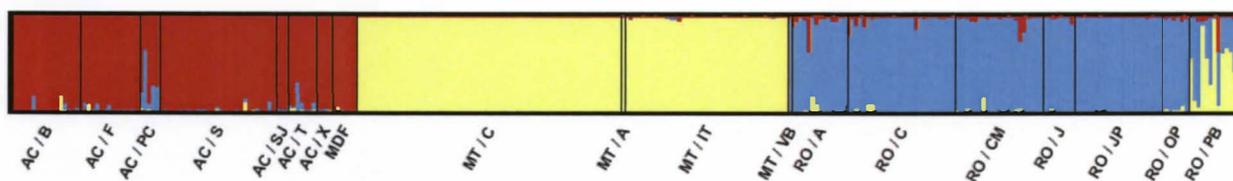
**Fig 2.** Determination of K, the most probable number of clusters, with Structure software, for 307 individuals (sample 1).



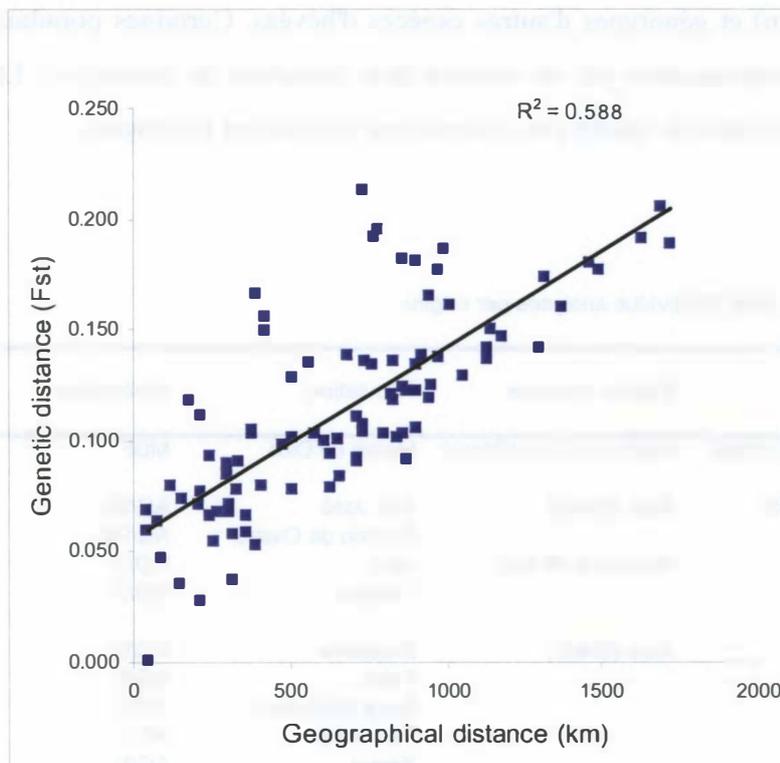
a. log probability of data,  $L(K)$  as a function of  $K$  averaged over 10 replicates

b. Ad-hoc  $\Delta K$  statistics as a function of  $K$ , calculated over 10 replicates

**Fig. 3** Graphical representation of the 307 individuals of sample 1 according to a partition in three clusters with STRUCTURE software



**Fig 4.** Relationship between pairwise genetic and geographical distances among Amazonian *Hevea brasiliensis* populations



#### 4.2. Résultats complémentaires ne figurant pas dans l'article

Le génotypage d'individus sauvages conservés en collection *ex situ* dans le cadre de l'étude décrite ci-dessus, a été mis à profit pour caractériser également et avec les mêmes marqueurs microsatellites, des accessions d'autres origines : cultivars issus de croisements Wickham x Amazoniens (WAm) et génotypes d'autres espèces d'hévéas. Certaines populations sauvages étaient également représentées par un nombre plus important de génotypes. Le tableau 4.1. récapitule le nombre total de génotypes analysés par population ou origine.

**Tableau 4.1.** Nombre total d'individus analysés par origine

Collection initiale	Région d'origine	Population	Abréviation	Nb total individus génotypés
Peruvian Minist. Agric.(1948)	Madre de Dios (Pérou)	Madre de Dios	MDF	7
EMBRAPA/IRCA (1974)	Acre (Brésil)	São José	AC/SJ	3
		Plácido de Castro	AC/PC	6
	Rondônia (Brésil)	Jaru	RO/J	4
		Calama	RO/C	4
IRRDB (1981)	Acre (Brésil)	Brasileira	AC/B	19
		Feijo	AC/F	17
		Sena Madureira	AC/S	32
		Tarauaca	AC/T	7
		Xapuri	AC/X	6
		Mato Grosso (Brésil)	Araçatuba	MT/A
	Rondônia (Brésil)	Juruena	MT/C	70
		Itauba	MT/IT	43
		Vila Bela	MT/VB	1
		Ariquemes	RO/A	15
		Calama	RO/C	27
		Costa Marques	RO/CM	23
		Jaru	RO/J	7
		Ji-Parana	RO/JP	22
		Ouro Preto	RO/OP	7
		Pimenta Bueno	RO/PB	13
Espèces non <i>brasiliensis</i>			Non br.	9
Wickham			W	1
Wickham x Amazoniens			Wam	44
Wickham x non <i>brasiliensis</i>				1
<i>Total</i>				390

Les données ont été analysées avec le logiciel Darwin (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006) qui permet une représentation arborée d'une matrice de dissimilarité calculée à partir des données alléliques aux marqueurs pour les individus étudiés (Perrier et al 2003).

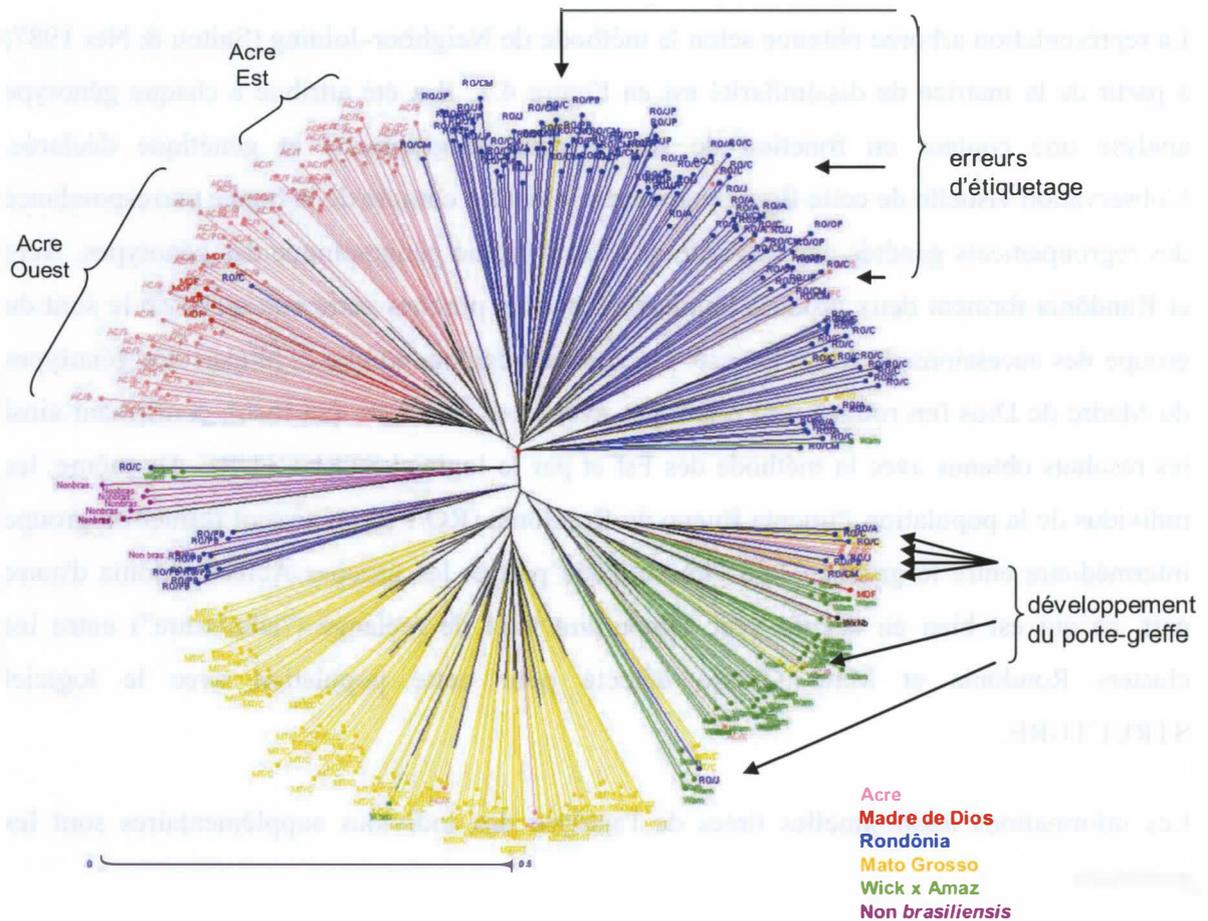
La représentation arborée obtenue selon la méthode de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) à partir de la matrice de dissimilarité est en Figure 4.1. Il a été attribué à chaque génotype analysé une couleur en fonction de son origine géographique et génétique déclarée. L'observation visuelle de cette figure permet de se rendre compte de la bonne correspondance des regroupements générés par l'algorithme avec l'origine géographique des génotypes. Acre et Rondônia forment deux groupes homogènes et plus proches entre eux qu'ils ne le sont du groupe des accessions du Mato Grosso. On constate également que la plupart des génotypes du Madre de Dios (en rouge) sont regroupés avec ceux de l'Acre (en rose), confirmant ainsi les résultats obtenus avec la méthode des  $F_{st}$  et par le logiciel STRUCTURE. De même, les individus de la population Pimenta Bueno du Rondônia (RO/PB) paraissent former un groupe intermédiaire entre le groupe Mato Grosso d'une part et les groupes Acre-Rondônia d'autre part, ce qui est bien en accord avec l'important taux de mélange ("admixture") entre les clusters Rondônia et Mato Grosso détecté pour cette population avec le logiciel STRUCTURE.

Les informations additionnelles tirées de l'analyse des individus supplémentaires sont les suivantes :

- Les hybrides "Wickham x Amazoniens" (WAm, en vert) forment un regroupement relativement homogène, et proche du groupe Mato Grosso.
- Les individus représentant diverses espèces non *brasiliensis* constituent également un groupe homogène.

Enfin, on peut identifier également sur cette figure un certain nombre d'individus "mal classés", c'est-à-dire des individus dont la proximité génétique avec d'autres individus n'est pas cohérente avec leur supposée origine géographique. Deux types d'erreur peuvent être à l'origine de ces incohérences :

**Figure 4.1.** Représentation arborée de la matrice de dissimilarité obtenue à partir des 18 marqueurs microsatellites sur les 390 individus analysés (Darwin 5.0)



1. Il s'est produit une erreur d'identification à un moment ou un autre du long processus qui va de la collecte des graines en forêt, de leur transfert en Côte d'Ivoire, de l'élevage des plants en pépinière, du greffage de ces plants sur porte-greffe, du planting au champ en Côte d'Ivoire, du prélèvement et transfert de bois de greffe en Guyane, de la nouvelle multiplication par greffage en Guyane, du planting au champ, de la collecte de feuille pour extraction d'ADN, du processus de génotypage à Montpellier et de la lecture des résultats. Ce sont vraisemblablement des erreurs de ce type (mauvais positionnement d'une pancarte au champ, erreur dans l'étiquetage d'un échantillon) qui sont responsables des inversions d'individus entre les groupes Acre (individu "bleu" dans groupe "rose") ou Rondônia (rose ou jaune dans bleu).

2. Les erreurs qui se sont produites après greffage, lorsque le porte greffe s'est développé en lieu et place du greffon et que cela n'a pas été détecté (bourgeon de porte-greffe). Etant donné que, en Côte d'Ivoire comme en Guyane, les plants utilisés comme porte-greffe proviennent de graines récoltées sur des parcelles de clone de type Wickham ou WAm, il est vraisemblable que les erreurs de ce type sont à l'origine du mauvais classement dans le groupe WAm (vert) d'individus supposés être Acre, Rondônia ou Mato Grosso. De même, la petite arborescence rose-bleu-jaune à proximité du groupe WAm est sans doute constituée uniquement d'individus pour lesquels ce type d'erreur s'est produit.

### 4.3. Discussion

Outre le fait que l'analyse effectuée à partir de la matrice de dissimilarité entre individus corrobore les interprétations issues de l'étude des distances entre populations ( $F_{ST}$ ) ou de l'analyse avec STRUCTURE, les résultats provenant des individus supplémentaires ne figurant pas dans le manuscrit soumis à publication apportent des informations pertinentes.

Les individus issus de croisements du type WAm n'ont pas tous une généalogie connue, et même lorsqu'elle est supposée connue, elle ne correspond pas forcément à la réalité. Dans le Tableau 4.2. par exemple, figure le génotype enregistré sur les 18 marqueurs utilisés pour le clone FDR 5788 ainsi que pour un de ses supposés géniteurs, le clone MDF180. La comparaison des allèles à chacun des marqueurs ne laisse aucun doute sur la non-conformité de l'ascendance supposée de FDR5788. Ce clone est toutefois bien regroupé avec les autres individus WAm et on peut donc supposer que bien que sa généalogie soit erronée, il s'agit bien d'un clone de type WAm, ce qui est corroboré par des informations phénotypiques sur la résistance de ce clone au SALB (Mattos, communication personnelle).

La plupart de ces clones WAm sont supposés avoir été sélectionnés au sein de croisements de première ou deuxième génération entre clones originaires du Madre de Dios (clones MDF) et clones Wickham: croisements  $W \times Am$  ou  $W \times (W \times Am)$ . Par ailleurs, le clone PB260 qui est purement d'origine Wickham, et qui a été utilisé comme témoin pour le génotypage, est bien regroupé avec les clones WAm. Il apparaît donc clairement que l'ensemble des clones WAm

se rapproche plus de l'origine Wickham que de la population Madre de Dios dont ils sont assez éloignés sur la représentation arborée. Le fait que ce groupe de clones WAm se retrouve

**Tableau 4.2.** Génotype de FDR5788 et d'un de ses supposés géniteurs : MDF180

Marqueurs	FDR5788	MDF180	
A2365	192 / 196	194 / 198	
A2368	193 / 245	193 / 265	←
A2387	198 / 200	206 / 206	
A2389	205 / 218	221 / 227	
A2406	135 / 135	131 / 141	
A2413	308 / 322	314 / 314	
A2508	272 / 275	256 / 264	
A2684	278 / 278	278 / 284	←
A2689	99 / 105	94 / 107	
A2736	128 / 130	130 / 136	←
A2762	153 / 153	156 / 156	
BAC55B02	165 / 169	161 / 161	
T2083	282 / 282	282 / 282	←
T2101	Na / Na	137 / 137	
T2603	293 / 293	301 / 317	
TA2163	209 / 218	205 / 217	
TAs2172	126 / 126	128 / 128	
TAs2558	230 / 244	242 / 250	

Les flèches indiquent les marqueurs à génotypes compatibles entre parent et descendant

à proximité des clones du Mato Grosso constitue un indice supplémentaire de la proximité génétique des populations du Mato Grosso avec l'origine Wickham, fait qui avait déjà été observé précédemment (Besse *et al.* 1994; Lekawipat *et al.* 2003), et qui conforte l'hypothèse de structuration secondaire de la diversité génétique en fonction du réseau hydrographique, telle que nous l'avons formulée dans le manuscrit ci-dessus. Par ailleurs, la figure 4.1 semble suggérer une partition en deux sous-groupes des populations de l'Acre (Acre Ouest-Rio Jurua et Acre Est-Rio Purus), partition déjà révélée par marqueurs isozymes et RFLP dans de précédentes études (Besse *et al.* 1994; Seguin *et al.* 2003), mais non détectée par le logiciel STRUCTURE dans la présente étude.

Afin de ne pas introduire de biais expérimental, les individus dont le regroupement dans l'arbre en Neighbor-Joining présente des incohérences avec l'origine géographique supposée

n'ont pas été pris en considération dans les études de génétique des populations et structuration de la diversité exposées ci-dessus. Ceci a conduit à éliminer dans les origines Acre, Madre de Dios, Rondônia ou Mato Grosso 28 individus dont le mauvais classement est supposé être dû soit à une erreur d'identification soit à un développement non détecté du porte-greffe.

De façon intéressante, on est ici en présence d'un résultat non attendu au démarrage de cette étude et qui porte sur l'utilisation des informations apportées par cette structuration de la diversité pour la gestion des collections *ex situ* d'arbres issus de populations sauvages. Il est possible, même en l'absence d'information portant sur la généalogie des accessions en collection, de repérer celles dont le génotype n'est pas cohérent avec leur supposé groupe génétique d'origine. Le génotypage par microsatellites constitue donc un outil permettant l'élimination des accessions non conformes et peut donc se révéler très utile pour la caractérisation phénotypique des origines étudiées, comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Cette possibilité de "nettoyage" des collections *ex situ* grâce à la structuration de la diversité génétique par génotypage microsatellite constitue donc une application du marquage moléculaire dans un schéma de sélection chez l'hévéa.

## **Chapitre 5 – Etendue du déséquilibre de liaison au sein de populations naturelles et application à la détection de facteurs de résistance par étude d'association**

Dans les chapitres précédents, nous avons abordé plusieurs points concernant les différentes formes de résistance génétique de l'hévéa au SALB et les ressources génétiques disponibles dans les populations naturelles de l'espèce *Hevea brasiliensis*. Il a tout d'abord été montré que la seule source de résistance dont les facteurs génétiques avaient été caractérisés jusqu'à présent ne présentait pas un caractère durable ni universel puisqu'elle avait déjà été contournée par des souches agressives du pathogène. Une autre source de résistance partielle au SALB, présente chez le cultivar MDF180, peut en revanche être considérée comme durable car elle est connue depuis plus de 30 ans et se maintient à un niveau élevé. L'analyse génétique de cette nouvelle source de résistance, effectuée par cartographie de QTLs sur une descendance de ce cultivar a permis la mise en évidence de deux locus qui contribuent fortement à l'expression de la résistance. Par ailleurs, l'analyse de la diversité génétique des populations sauvages par marqueurs microsatellites a permis de faire apparaître une diversification primaire des populations en fonction de la distance géographique, ainsi que d'un effet secondaire de l'effet "réseau hydrographique". Cette diversité génétique est structurée en deux groupes importants, regroupant les populations du Mato Grosso d'une part, et celles de l'Acre, du Rondônia et du Madre de Dios d'autre part. A l'intérieur de ce deuxième groupe, une subdivision nette est révélée entre le sous-groupe Acre-Madre de Dios d'une part et Rondônia d'autre part.

Au cours de ce chapitre, nous caractérisons le déséquilibre de liaison existant au sein de ces populations naturelles, afin d'évaluer l'intérêt qu'elles représentent pour le marquage génétique de caractères d'intérêt dans le cadre des programmes d'amélioration génétique de l'hévéa. Pour cela, nous estimerons dans un premier temps la décroissance du déséquilibre de liaison en fonction de la distance dans deux régions du génome de l'hévéa, relativement denses en marqueurs microsatellites. Ceci nous permettra de déterminer si d'une manière générale ces populations présentent des valeurs de déséquilibre entre locus physiquement liés compatibles

avec des études d'association entre marqueurs et caractères phénotypiques. Nous étudierons ensuite plus particulièrement le déséquilibre de liaison au moyen de marqueurs microsatellites et SNPs dans une des deux régions du génome contenant un gène majeur de résistance au SALB. Nous examinerons enfin la possibilité de détecter par génétique d'association un (des) allèle(s) impliqué(s) dans la résistance d'accessions sauvages d'*H. brasiliensis* à *M. ulei* au sein de cette même région du génome. La description des matériels et méthodes mis en œuvre dans ces trois modalités est regroupée au sein d'une même partie. Dans la partie qui suit sont présentés successivement les résultats de ces trois approches, et enfin une partie discussion fait la synthèse de l'ensemble des résultats.

Une étude antérieure (Le Guen et al. 2002) portant sur le nombre de génotypes résistants au SALB parmi les populations conservées en collection *ex situ* en Guyane, a montré une proportion nettement plus élevée de génotypes résistants parmi les populations de l'Acre et du Rondônia que parmi celles du Mato Grosso. Ces résultats sont réexaminés à la lumière des informations commentées au chapitre précédent sur les possibles erreurs d'identification de clones en collection et aboutissent à la définition d'un nouvel échantillon pour les études de déséquilibre de liaison de ce chapitre.

## **5.1. Matériel et Méthodes**

### **5.1.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal étudié dans cette partie est constitué d'un sous-échantillon du matériel végétal décrit et étudié au chapitre précédent. Le déséquilibre de liaison pouvant être généré par la structure génétique de l'échantillon étudié, l'analyse ne portera ici que sur des sous-ensembles génétiquement homogènes des accessions disponibles en collection *ex situ* sur le site expérimental de Combi en Guyane. Le logiciel STRUCTURE a mis en évidence un premier niveau de différenciation en deux groupes : les génotypes provenant du Mato Grosso d'une part, et ceux originaires de l'Acre, du Madre de Dios et du Rondônia d'autre part. L'étude portera donc sur l'un de ces deux grands groupes définis par le logiciel STRUCTURE. Pour déterminer lequel de ces deux groupes serait étudié, nous nous sommes reportés aux travaux antérieurs (Le Guen et al. 2002) et qui montraient que le pourcentage de clones sensibles au SALB s'élevait à 82% pour les populations du Mato Grosso, alors qu'il n'était que de 18%

pour celles de l'Acre et 26% pour celles du Rondônia (Tableau 5.1.). Ces résultats avaient été analysés alors que l'on ne disposait pas encore d'outils moléculaires permettant de contrôler la conformité des clones présents en collection *ex situ*. Il a été montré à la fin du chapitre précédent que l'analyse des données moléculaires avec les logiciels Darwin ou STRUCTURE remettait en cause l'appartenance d'un certain nombre d'accessions aux groupes géographiques auxquels leur identification les rattachait. Cela pouvait être expliqué soit par des erreurs d'identification à une étape quelconque au cours de la succession d'évènements entre la collecte en forêt et la lecture des allèles microsatellites, soit à des développements de rejets de porte-greffe au détriment des clones greffés. L'élimination de ces accessions non conformes des observations de résistance au SALB accroît les différences entre les groupes : 81% des clones originaires du Mato Grosso sont toujours sensibles au SALB après élimination des non-conformes, alors que cette proportion tombe à 9% pour les clones de l'Acre et 23% pour ceux du Rondônia (Tableau 5.1.). La diminution du nombre de clones sensibles est due au fait que la majorité des non-conformes sont des porte-greffes Wickham totalement sensibles. Notre intérêt se portera sur les populations originaires de l'Acre et du Rondônia chez lesquelles on peut espérer déceler par génétique d'association de nouveaux allèles de résistance au SALB, plutôt qu'à celles originaires du Mato Grosso, au sein desquelles 80% des clones sont sensibles. Du point de vue de l'efficacité de l'étude d'association, les 20% d'arbres résistants dans le Mato Grosso peuvent paraître aussi intéressants que les 20% d'arbres sensibles dans le Rondônia. Cependant, nous souhaitons compléter les données phénotypiques obtenues en conditions naturelles d'infestation avec des données issues d'inoculations en conditions contrôlées avec des souches agressives vis-à-vis desquelles il est probable que tous les individus du Mato Grosso seront sensibles. C'est pourquoi le groupe Mato Grosso n'a pas été retenu dans l'échantillon étudié. L'étendue du déséquilibre de liaison sera donc estimée sur des clones originaires des états de l'Acre et du Rondônia, auxquels viennent s'ajouter des clones du Madre de Dios dont l'analyse de diversité a révélé la proximité géographique avec les populations de l'Acre, et dont diverses observations (non mentionnées ici) laissent penser qu'un pourcentage important d'entre eux présente une bonne résistance au SALB.

### **5.1.2. Extraction d'ADN**

Les analyses ont porté sur les mêmes extraits d'ADN que ceux étudiés au chapitre 4.

### 5.1.3. Marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites utilisés proviennent des mêmes banques enrichies et banques BAC que ceux décrits dans le chapitre 4. Deux régions du génome de l'hévéa ont été privilégiées pour cette étude, en raison de leur densité en marqueurs microsatellites. Ces régions sont situées l'une sur le groupe de liaison g2 et l'autre sur le groupe de liaison g8. La région étudiée sur le groupe de liaison g2 comporte de plus un gène majeur de résistance au SALB chez le clone FX 2784 (données non publiées).

**Tableau 5.1.** Nombre de clones malades par population d'origine Combi, observations réalisées en 2000

Etat	population	Données de l'article <i>Le Guen et al 2002</i>			Après élimination des illégitimes		
		clones malades	%	Nb total de clones	clones malades	%	Nb total de clones
	AC/B	2	11.1	18	0	0.0	16
	AC/F	3	20.0	15	1	7.7	13
	AC/S	5	16.1	31	2	7.1	28
	AC/T	1	14.3	7	1	14.3	7
	AC/X	3	42.9	7	2	33.3	6
	<b>Total Acre</b>	<b>14</b>	<b>17.9</b>	<b>78</b>	<b>6</b>	<b>8.6</b>	<b>70</b>
	MT/A	3	100.0	3	2	100.0	2
	MT/C	55	78.6	70	51	77.3	66
	MT/IT	40	87.0	46	39	86.7	45
	MT/VB	0	0.0	1	0	0.0	1
	<b>Total Mato Grosso</b>	<b>98</b>	<b>81.7</b>	<b>120</b>	<b>92</b>	<b>80.7</b>	<b>114</b>
	RO/A	2	18.2	11	2	18.2	11
	RO/C	5	22.7	22	3	15.0	20
	RO/CM	3	14.3	21	2	10.0	20
	RO/J	3	60.0	5	2	66.7	3
	RO/JP	2	9.5	21	2	9.5	21
	RO/OP	3	50.0	6	3	50.0	6
	RO/PB	8	61.5	13	7	58.3	12
	<b>Total Rondônia</b>	<b>26</b>	<b>26.3</b>	<b>99</b>	<b>21</b>	<b>22.6</b>	<b>93</b>

Dans la suite de ce chapitre, afin d'éviter des confusions entre groupes de liaison et groupes de population, les groupes de liaison seront désignés directement par leur numéro ("g2" pour "groupe de liaison g2") et les groupes de populations par le nom du groupe auquel elles se rattachent ("Acre" pour ensemble des populations rattachées à l'Acre par le logiciel Structure). La détermination de l'ordre des marqueurs utilisés ainsi que de la longueur des intervalles entre deux marqueurs successifs a été établie par synthèse des données provenant des

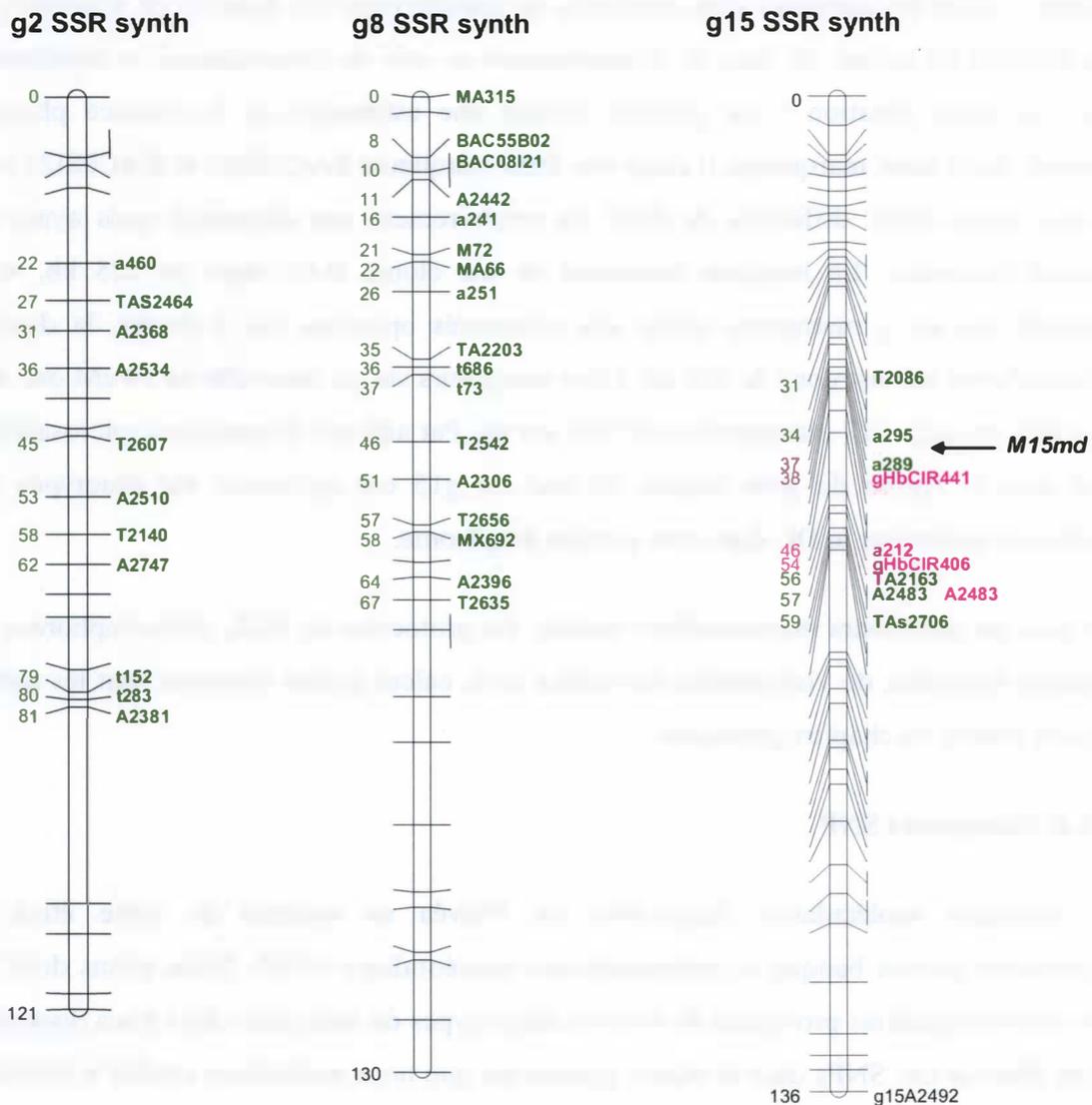
cartographies des croisements PB260 x RO38, RRIM600 x PB217 et PB260 x FX2784 (Seguin, communication personnelle). Une très bonne colinéarité a été décelée entre les différentes cartes (voir Figure 5.1.). Les distances entre deux marqueurs successifs ont pu être soit calculées directement lorsque ces marqueurs étaient tous les deux présents sur la même carte génétique, soit estimées indirectement par fusion de plusieurs cartes grâce au logiciel Joinmap. Toutes les distances sont exprimées en centiMorgan (en distance de Kosambi) car elles résultent de calculs de taux de recombinaison au sein de descendance en ségrégation. Dans une seule situation il est possible d'avoir une estimation de la distance physique maximale entre deux marqueurs, il s'agit des deux marqueurs BAC55B02 et BAC08I21 issus de deux clones BAC différents de degré de recouvrement non déterminé mais ayant une séquence commune. La longueur maximale de ces clones BAC étant de 125 kb, et en admettant que les 2 marqueurs soient aux extrémités opposées des 2 clones, la distance maximale entre eux est donc de 250 kb. Onze marqueurs sur un intervalle de 59 cM ont donc été étudiés sur g2, et 17 marqueurs sur 67 cM sur g8. Par ailleurs, 6 marqueurs microsatellites situés dans la région du gène majeur *M15md* sur g15 ont également été génotypés afin d'étudier en particulier le DL dans cette portion du génome.

Pour tous les marqueurs microsatellites étudiés, les protocoles de PCR, d'électrophorèse des fragments amplifiés, de visualisation des allèles et de calcul de leur longueur sont les mêmes que ceux décrits au chapitre précédent.

#### **5.1.4. Marqueurs SNP**

Les ressources moléculaires disponibles sur l'hévéa au moment de notre étude ne comportaient aucune banque de polymorphisme nucléotidique (SNP). Nous avons donc tiré partie des informations provenant de tous les autres types de marqueurs dont nous disposions afin de détecter des SNPs dans la région génomique que nous souhaitons étudier à proximité du gène majeur de résistance *M15md*. Nous avons choisi pour cela de nous intéresser aux fragments génomiques déjà séquencés chez les individus ayant servi à l'établissement de cartes génétiques. A cette fin, il a été procédé au séquençage de produits PCR concernant soit des marqueurs microsatellites ayant une séquence flanquante en 5' suffisamment grande (supérieure à 300 pb), soit des sondes issues d'une banque PstI utilisées pour la cartographie RFLP. Après un test préalable de polymorphisme portant sur 24 individus d'origines génétiques diversifiées, cinq fragments de ce type ont été séquencés chez 96 individus du Rondônia. Le séquençage, réalisé par la technologie traditionnelle Sanger, a été sous-traité à

la société GATC. Les 5 fragments étudiés sont localisés sur la carte génétique du groupe de liaison g15 dans la figure 5.1.



**Figure 5.1.** Localisation des marqueurs utilisés: **en vert:** marqueurs microsatellites; **en rose:** fragments dans lesquels ont été recherchés des SNPs. Sur g2 et g8 seuls les marqueurs microsatellites cartographiés ont été représentés par un trait; sur g15 tous les types de marqueurs cartographiés (microsatellites, RFLP, AFLP, R-gènes) ont été représentés. La flèche indique la position du gène majeur *M15md* chez MDF 180.

### 5.1.5. Analyses statistiques

#### *Reconstruction d'haplotypes*

Le logiciel Phase v.2.1. a été utilisé pour la reconstruction d'haplotypes à partir des données génotypiques de type microsatellite ou de type SNP. L'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg n'affecte sérieusement les résultats proposés par ce logiciel que lorsque ces écarts consistent en un excès d'hétérozygotes (Stephens et al 2001), ce qui n'est le cas pour aucun des locus étudiés jusqu'à présent dans les populations de notre échantillon (tableau 2 chapitre 4). Ce logiciel offre la possibilité de fixer a priori la valeur du paramètre de recombinaison  $\rho = 4N_e c$  (où  $N_e$  est la taille effective de la population et  $c$  la probabilité de recombinaison entre paires de bases adjacentes). Nous avons vu au chapitre 3 que la carte consensus établie à partir du croisement PB260 x MDF180 a une longueur approximative de 2000 cM, ce qui pour une quantité d'ADN de 2,2 pg pour 1C (Bennett & Leitch 1997) nous donne l'équivalence globale suivante sur l'ensemble du génome de *H. brasiliensis* : 1cM = 1000 kb, et donc une valeur de probabilité de recombinaison  $c = 10^{-8}$ . Comme nous ne disposons pas d'éléments nous permettant d'inférer la taille effective des populations d'hévéa dans leur milieu naturel, nous avons retenu deux valeurs contrastées de  $N_e$  qui encadrent vraisemblablement les tailles réelles des populations. Pour cela, deux valeurs du paramètre de recombinaison  $\rho$  ont été choisies: celle par défaut de  $\rho = 4 \times 10^{-4}$  proposée par le concepteur du logiciel, et qui correspond à une taille effective de population  $N_e = 10\ 000$  individus, et une autre valeur de  $\rho = 4 \times 10^{-6}$  qui correspond à  $N_e = 100$  individus. Pour les marqueurs microsatellites, les haplotypes ont été estimés sans faire à ce stade d'hypothèse sur le modèle de mutation. Pour chaque groupe de liaison étudié et chaque valeur de  $\rho$ , 5 reconstructions indépendantes d'haplotypes ont été effectuées en faisant varier à chaque fois la valeur initiale utilisée pour la génération de nombre aléatoire. Ces 10 haplotypes inférés pour chaque individu et chaque groupe de liaison analysés permettent d'avoir ultérieurement accès aux variances des estimateurs de déséquilibre de liaison.

#### *Estimation du déséquilibre de liaison*

L'estimation du déséquilibre de liaison (DL) dans le cas de locus multialléliques dérive de celle obtenue pour deux locus à deux allèles chacun:  $D_{ij} = p(A_i B_j) - p(A_i)p(B_j)$  où  $p(A_i)$  est la

fréquence de l'allèle  $A_i$  au locus  $A$ ,  $p(B_j)$  la fréquence de l'allèle  $B_j$  au locus  $B$  et  $p(A_iB_j)$  la fréquence de l'haplotype  $A_iB_j$  dans la population.

Deux approches différentes d'estimation du déséquilibre de liaison ont été comparées. Nous avons tout d'abord estimé le déséquilibre de liaison génotypique par calcul du coefficient composite  $\Delta_{AB}$  défini par Weir et Cockheram (1979) :

$$\Delta_{AB} = D_{AB} + D_{A/B} = p_{AB} + p_{A/B} - 2p_A p_B$$

où  $D_{A/B}$  représente le déséquilibre de liaison entre les allèles  $A$  et  $B$  en position trans sur le chromosome. Ce coefficient présente l'intérêt d'être directement calculable à partir des données génotypiques sans nécessité d'avoir accès aux haplotypes. Il varie, pour chaque comparaison d'allèles entre 2 locus, entre les valeurs -0.5 et +0.5. Il a été calculé avec le logiciel Genetix version 4.05.2 (Belkhir *et al.* 2000) qui effectue une moyenne par paire de locus entre toutes les comparaisons d'allèles 2 à 2 après transformation de Fisher de ces valeurs.

Nous avons également estimé le déséquilibre de liaison haplotypique à partir des haplotypes reconstruits avec le logiciel Phase. Deux mesures du déséquilibre de liaison haplotypique ont été ainsi calculées: le paramètre  $D'$  (Lewontin 1964):

$$D' = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m p(A_i) p(B_j) \left| \frac{D_{ij}}{D_{ij}^{max}} \right|$$

où

$$D_{ij}^{max} = \min [p(A_i) p(B_j), (1-p(A_i))(1-p(B_j))] \quad \text{si } D_{ij} < 0$$

et

$$D_{ij}^{max} = \min [p(A_i)(1 - p(B_j)), (1-p(A_i))p(B_j)] \quad \text{si } D_{ij} \geq 0$$

et le paramètre  $r^2$  :

$$r_{ij}^2 = \frac{D_{ij}^2}{p(A_i)(1 - p(A_i)) p(B_j)(1 - p(B_j))}$$

Toutes les statistiques associées au déséquilibre de liaison haplotypique ont été calculées grâce au logiciel Powermarker v3.25 (Liu & Muse 2005). La décroissance du déséquilibre de liaison a été représentée graphiquement en fonction de la distance en centiMorgan qui sépare les paires de locus.

Pour chacune des trois mesures  $\Delta$ ,  $D'$  et  $r^2$ , une valeur seuil de déséquilibre de liaison intra-chromosomique significatif a été établie par population. Ce seuil correspond à 5% des plus fortes valeurs de déséquilibre de liaison obtenues entre paires de marqueurs situés sur deux chromosomes différents.

En plus des deux paramètres  $D'$  et  $r^2$  calculés à partir des haplotypes reconstruits grâce au logiciel Phase, nous avons estimé la valeur exacte de la probabilité associée au déséquilibre de liaison entre chaque paire de marqueurs (situés ou non sur le même groupe de liaison). Cette probabilité a été obtenue par un test MCMC (Monte-Carlo Markov Chain) sur les données génotypiques brutes (non phasées) avec un maximum de  $10^6$  itérations.

#### *Regroupements d'allèles*

Le logiciel Darwin 5.0 (Perrier & Jacquemoud 2006) dont la fonctionnalité principale est l'estimation de distances entre individus à partir de l'établissement d'une matrice de dissimilarité, possède une option permettant d'effectuer des regroupements d'allèles. L'utilisation de cette application repose sur l'hypothèse que la diversité allélique observée est le fruit d'une part de la structure de la population et d'autre part d'une évolution des allèles selon le modèle "stepwise mutation" (Kimura & Ohta 1975). Cette option a été testée dans le but de réduire le nombre d'allèles par marqueur microsatellite

### *Détection d'association avec des paramètres de résistance au SALB*

L'association a été testée par analyse de variance portant sur les valeurs phénotypiques moyennes des différentes classes génotypiques à chaque locus. Une analyse de variance à 1 facteur a tout d'abord été réalisée séparément sur chacun des groupes Acre et Rondônia avec le logiciel Tassel v2.01 (Bradbury et al 2007) à partir des données génotypiques obtenues après regroupement des allèles. Ce logiciel offre la possibilité de prendre en compte la structuration génétique de l'échantillon étudié dans le test d'association. Pour cela, les coefficients d'appartenance des individus aux groupes Acre, Rondônia et Mato Grosso définis par le logiciel Structure (voir chapitre 4, figure 3) ont été introduits comme covariables dans le modèle d'analyse de variance. De plus, les résultats présentés au chapitre 4 font état de valeurs significatives de  $F_{ST}$  entre la plupart des populations du Rondônia (chapitre 4, tableau 4). On peut donc suspecter une sous-structuration interne du groupe Rondônia. Il a donc été procédé pour ce seul groupe Rondônia à une nouvelle analyse avec le logiciel Structure afin de déterminer le nombre de sous-clusters le plus probable au sein du groupe Rondônia. Ainsi que nous l'avons décrit dans le chapitre 4, la statistique  $\Delta K$  définie par Evanno et al (2005) a été calculée afin de déterminer le nombre le plus probable de sous-clusters. Un nouveau test d'association a alors été effectué sur le seul groupe Rondônia en introduisant comme covariables dans le modèle d'analyse de variance les coefficients d'affectation des individus aux différents sous-clusters.

Le test d'association a donc été effectué sur tous les marqueurs microsatellites après réduction du nombre d'allèles et les SNPs, avec et sans prise en compte des covariables correspondant aux coefficients d'affectation aux 3 principaux clusters. De plus, pour le Rondônia, un test d'association complémentaire a porté sur les mêmes marqueurs avec comme covariables les coefficients d'affectation aux sous-clusters Rondônia.

#### **5.1.6. Phénotypage des accessions**

L'étude sur les proportions de génotypes résistants parmi les différentes origines d'*H. brasiliensis* conservés en collection *ex situ* en Guyane mentionnée plus haut (Le Guen et al 2002), repose sur un nombre limité d'observations. Depuis 2002, les observations se sont poursuivies sur cette collection ce qui permet d'avoir une approche plus quantitative de la résistance de chaque clone, au lieu de se limiter à des classifications qualitatives "résistant",

"sensible", "hautement sensible". Une récapitulation par origine du nombre de clones ayant fait l'objet d'observations complémentaires en conditions naturelles d'infestation figure dans le tableau 5.2. Il s'agit de toutes les accessions originaires de l'Acre (75 clones), du Rondônia (108 clones) et du Mato Grosso (111 clones) plantées en collection *ex situ* à Combi, et pour lesquels les analyses microsatellites n'ont pas fait apparaître de doutes sur leur identité. Les observations ont porté sur le type de réaction (TR) et la densité de stromas (DS) selon les mêmes modalités que celles décrites au chapitre 3.

**Tableau 5.2.** Synthèse des moyennes par clone sur les 12 observations effectuées en conditions naturelles d'infestation de 1998 à 2007

Etat	Population	Effectif obs.	TR	ST	S	%S	TS	%TS
<b>Acre</b>	AC/B	17	0.93	0.07	4	23.5	0	0.0
	AC/F	16	0.91	0.08	3	18.8	0	0.0
	AC/S	29	1.17	0.12	9	31.0	0	0.0
	AC/T	7	1.13	0.18	1	14.3	0	0.0
	AC/X	6	2.00	0.69	3	50.0	2	33.3
	<i>Total Acre</i>		75	-	-	20	26.7	2
<b>Mato Grosso</b>	MT/A	1	4.75	2.58	1	100.0	1	100.0
	MT/C	67	2.58	1.43	57	85.1	20	29.9
	MT/IT	42	3.56	2.10	42	100.0	29	69.0
	MT/VB	1	1.33	0.50	1	100.0	0	0.0
	<i>Total Mato Grosso</i>		111	-	-	101	91.0	50
<b>Rondônia</b>	RO/A	13	1.20	0.31	7	53.8	0	0.0
	RO/C	22	1.38	0.26	14	63.6	2	9.1
	RO/CM	22	1.15	0.17	8	36.4	0	0.0
	RO/J	6	1.84	0.67	3	50.0	0	0.0
	RO/JP	25	0.96	0.10	12	48.0	0	0.0
	RO/OP	8	2.47	1.01	5	62.5	3	37.5
	RO/PB	12	1.82	1.00	9	75.0	2	16.7
	<i>Total Rondônia</i>		108	-	-	58	53.7	7

TR : Type de réaction; ST : densité de stromas; S : nombre de clones sensibles (TR > 2 ou ST > 0)  
 TS : Nombre de clones très sensibles (TR>5 ou ST>2)

## 5.2. Résultats

### 5.2.1. Déséquilibre de liaison entre marqueurs de g2 et g8

Dans le tableau 5.3 figurent les nombres d'allèles obtenus pour chacun des marqueurs génotypés sur ces deux groupes de liaison pour l'Acre et le Rondônia.

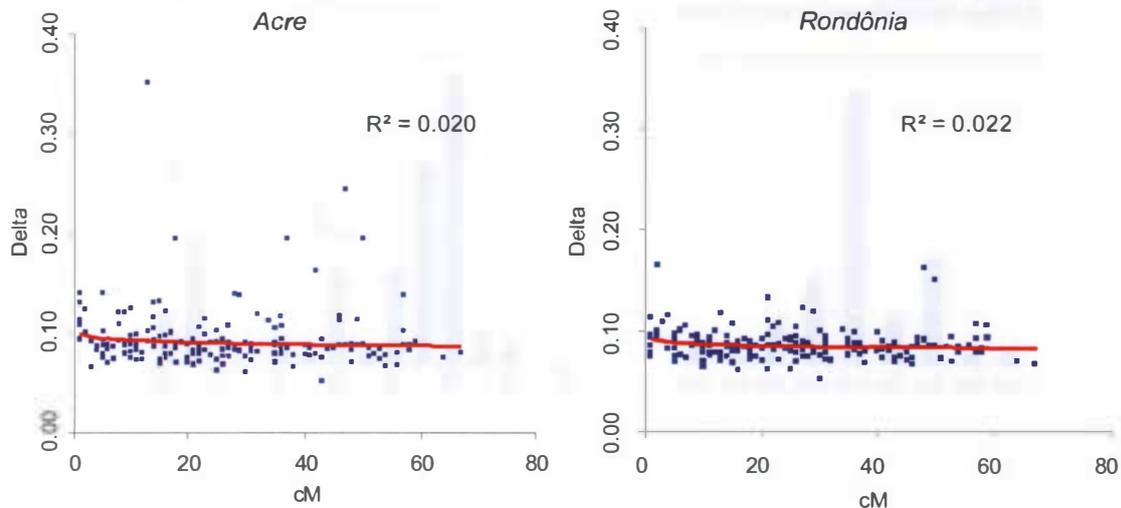
**Tableau 5.3.** Position des marqueurs, effectifs analysés et nombre d'allèles observés pour les marqueurs microsatellites en g2 et g8

	Numéro d'accension	Position relative (cM)	Effectif analysé		Nombre d'allèles		
			Acre	Rondônia	Acre	Rondônia	Total
<i>g2</i>							
a460	AY486598	22.0	93	98	12	16	19
TAs2464	AY486687	27.0	90	95	28	32	38
A2368	AY486668	31.0	89	88	15	15	19
A2534	AY486751	36.0	90	95	16	16	19
A2734	AY486840	40.0	multiamorçage		-	-	-
T2607	AY486770	45.0	89	94	4	7	7
A2510	AY486742	53.0	89	86	17	24	29
T2140	AY486611	58.0	90	95	13	14	17
A2747	AY486849	62.0	85	95	16	15	17
t152	AY486797	79.0	92	96	11	13	14
t283	AY486798	80.0	89	94	23	34	36
A2381	AY486669	81.0	87	93	14	18	18
<i>g8</i>							
A2525	AY486582	0.0	90	96	17	21	22
BAC55	DQ115609	8.0	79	93	7	9	9
BAC08	DQ115594	8.3	88	97	7	9	9
A2442	AY486708	11.0	88	93	20	11	21
a241	AY486561	16.0	90	91	22	19	27
M72	AF221696	21.0	90	94	3	6	6
MA66	AF383941	22.0	92	97	15	16	19
a251	AY486563	26.0	92	95	19	26	31
TA2203	AY486632	35.0	84	95	10	10	12
t686	AY486803	36.0	92	93	21	19	28
t073	AY486792	37.0	83	84	20	18	24
T2542	AY486754	46.0	91	95	33	28	43
A2306	AY486662	51.0	77	97	11	17	18
T2656	AY486785	57.0	89	93	10	10	13
MX692	AF383938	58.0	90	95	7	8	9
A2396	AY486693	64.0	92	95	20	21	26
T2635	AY486777	67.0	91	95	20	24	34

Les nombres d'allèles par locus observés sur l'ensemble des arbres analysés sont élevés, de 7 à 43. La fréquence faible de certains allèles ne constitue pas une condition favorable pour l'étude du déséquilibre de liaison.

#### 5.2.1.1. Déséquilibre de liaison génotypique

Les valeurs du coefficient composite de déséquilibre de liaison  $\Delta_{AB}$  sont représentées sur la figure 5.2 pour l'Acre et le Rondônia. On n'observe pratiquement pas de décroissance du déséquilibre de liaison génotypique en fonction de la distance. Plusieurs points aberrants élevés au-delà de 30 cM apparaissent, particulièrement dans l'Acre.



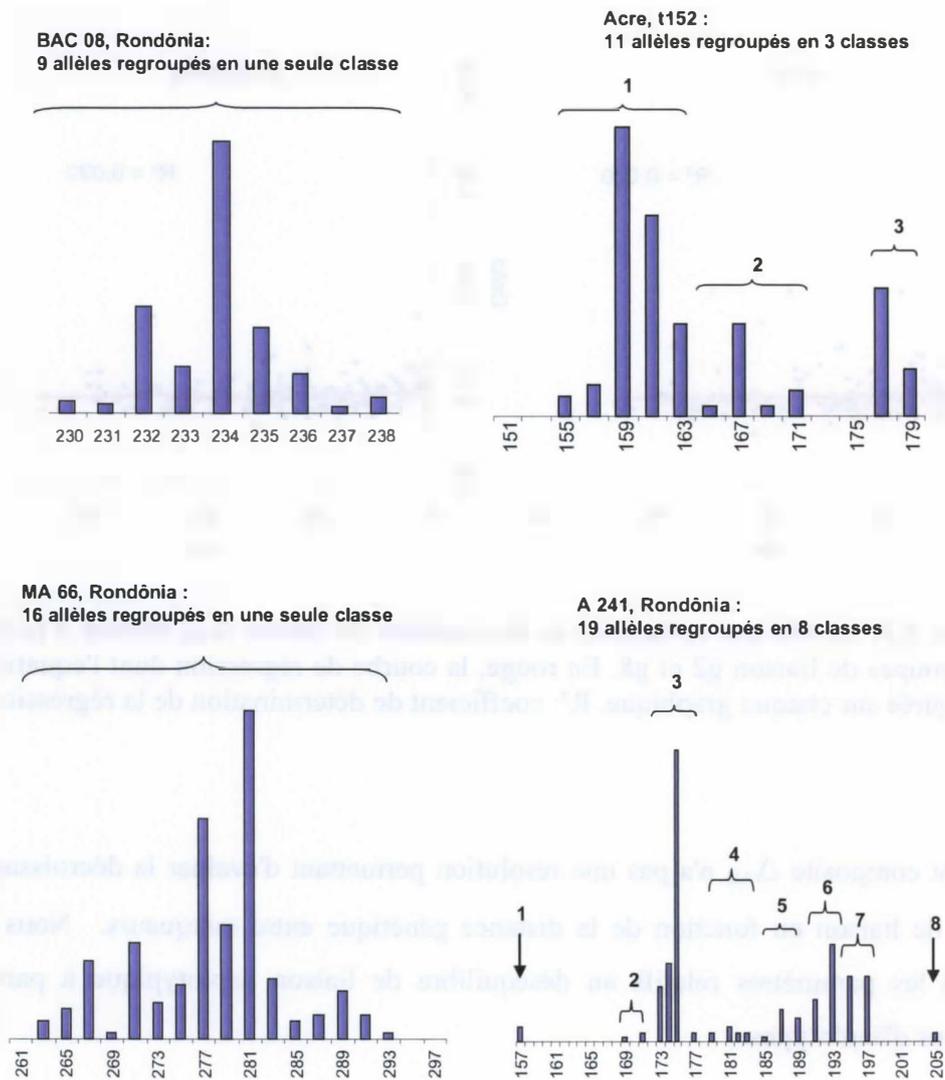
**Figure 5.2.** Coefficient composite de déséquilibre de liaison  $\Delta_{AB}$  calculé à partir des groupes de liaison g2 et g8. En rouge, la courbe de régression dont l'équation est figurée sur chaque graphique.  $R^2$ : coefficient de détermination de la régression.

Le coefficient composite  $\Delta_{AB}$  n'a pas une résolution permettant d'évaluer la décroissance du déséquilibre de liaison en fonction de la distance génétique entre marqueurs. Nous avons donc calculé les paramètres relatifs au déséquilibre de liaison haplotypique à partir des reconstructions d'haplotypes.

#### 5.2.1.2. Réduction du nombre d'allèles

L'utilisation du logiciel Phase pour la reconstruction d'haplotypes a été rendue difficile par le nombre trop important d'allèles à certains locus. Ce logiciel ne parvient pas à effectuer de reconstruction haplotypique sur des jeux de données impliquant un nombre d'allèles trop importants, ni même lorsque les tailles d'allèles sont trop différentes pour un même marqueur microsatellite. Il a donc été nécessaire, préalablement à la reconstruction d'haplotypes, de procéder à une réduction du nombre d'allèles par locus.

Le recours au logiciel Darwin 5.0 pour regrouper les allèles n'a pas donné satisfaction. En effet les distributions alléliques ne présentent pas de mode bien défini et dans la majorité des cas ne semblent pas pouvoir être expliquées par le "stepwise mutation model".



**Figure 5.3. Exemples de regroupements d'allèles avec l'option "Pooling SSR alleles" du logiciel Darwin**

Les regroupements proposés par le logiciel avec les paramètres standard d'utilisation ne sont, dans la plupart des cas, pas satisfaisants. A titre d'exemple sont illustrés dans la figure 5.3 quelques regroupements proposés par Darwin. On voit notamment que le nombre de classes au sein desquelles sont regroupés les allèles varie plus en fonction de la forme de la distribution allélique que du nombre d'allèles initial. C'est ainsi que pour le marqueur MA 66,

16 allèles peuvent être regroupés en une seule classe, alors que 11 allèles du marqueur t152 seront regroupés en 3 classes. Il est possible dans le logiciel de modifier les paramètres pris en compte par l'algorithme pour effectuer le regroupement, ou même de fixer arbitrairement les limites des classes de regroupement, mais cette application perd alors tout l'intérêt d'une méthode standardisée pour l'ensemble des locus traités.

Nous avons donc choisi de procéder à une réduction du nombre d'allèles par locus en ne prenant en compte que les allèles majoritaires et en regroupant tous les allèles de faible fréquence en une seule classe allélique. Les distributions alléliques étant très différentes d'un locus à l'autre, cette étape a été réalisée en déterminant locus par locus le nombre d'allèles à conserver et la fréquence minimale en dessous de laquelle les allèles étaient regroupés. Pour la majorité des locus, cette fréquence minimale de regroupement était de 10%. La fréquence cumulée des allèles retenus (non regroupés) était généralement comprise entre 40 et 70 %, et le nombre d'allèles non regroupés par locus variait entre 1 et 5. Dans le Rondônia, 16 marqueurs sur 23 (13 en g8 et 10 en g2) présentaient une distribution des classes alléliques ne différant pas significativement de l'équilibre de Hardy-Weinberg au seuil de 1%, 14 marqueurs sur 22 (13 en g2 et 9 en g8) dans l'Acre.

### 5.2.1.3. Déséquilibre de liaison haplotypique

Après réduction du nombre d'allèles, la valeur exacte de la probabilité associée au déséquilibre de liaison entre chaque paire de marqueurs (situés ou non sur le même groupe de liaison) a été calculée. Le pourcentage total de paires de marqueurs présentant un déséquilibre de liaison significatif ( $P < 0.05$ ) est de 10.0% pour l'Acre et de 11.5% pour le Rondônia. Cependant, le rapport entre le nombre de paires de marqueurs en déséquilibre de liaison significatif en intra-chromosome et en inter-chromosome est de 4,9 pour l'Acre et 1,1 pour le Rondônia.

Grâce au logiciel Phase, nous avons ensuite procédé aux reconstructions haplotypiques par groupe de liaison et par population à partir des marqueurs regroupés selon ces classes alléliques. Le calcul des paramètres  $D'$  et  $r^2$  a été effectué sur ces haplotypes reconstruits avec

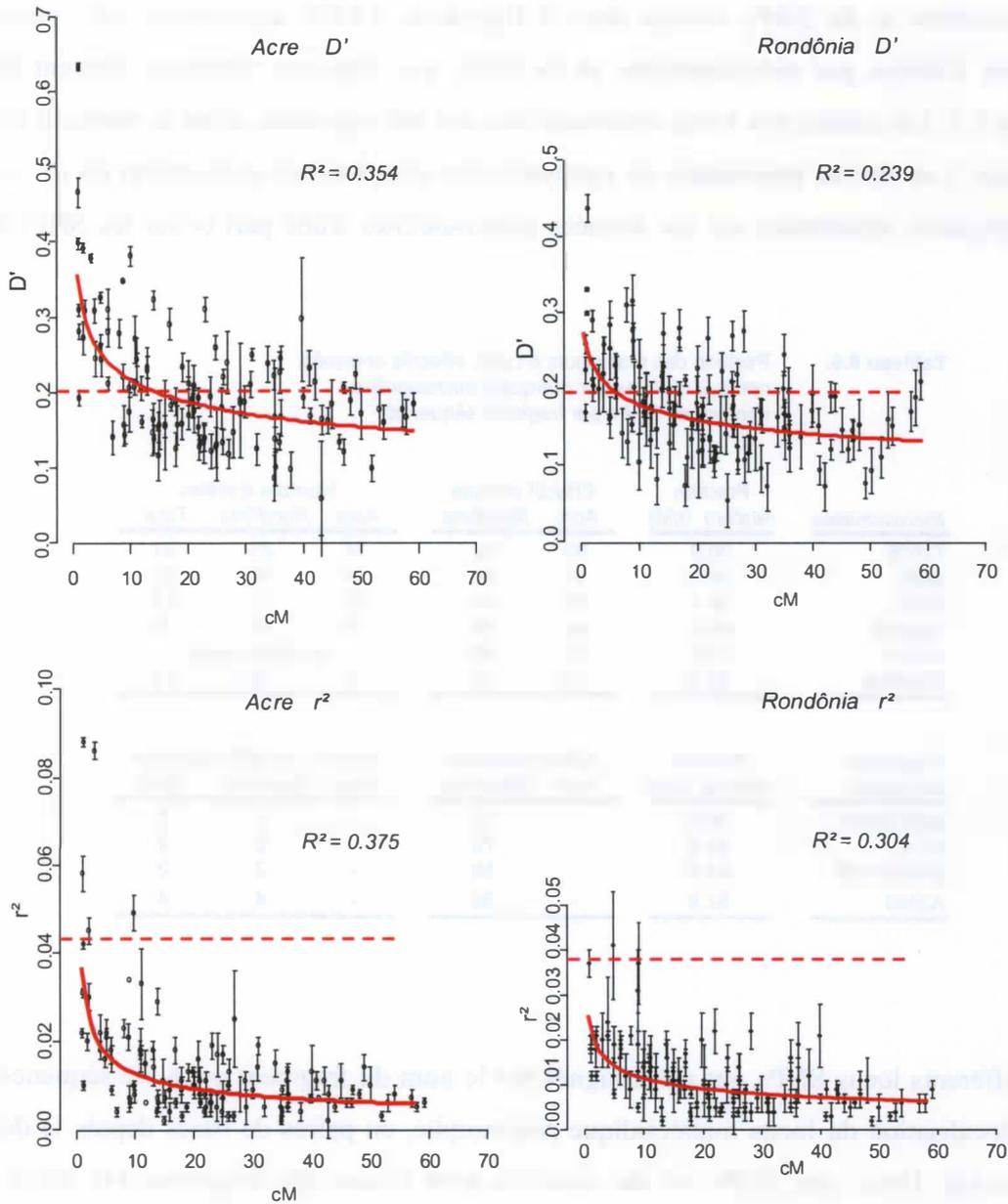
le logiciel Powermarker. La répartition du déséquilibre en fonction de la distance entre paires de marqueurs est représentée pour  $D'$  et  $r^2$  dans la figure 5.4.

Les courbes de régression font apparaître une décroissance nettement plus prononcée que dans le cas du déséquilibre de liaison génotypique. Pour les estimations de  $D'$ , ces courbes de régression croisent les droites des valeurs seuils de significativité, entre 10 et 20 cM pour l'Acre, et entre 0 et 10 cM pour le Rondônia. En revanche, les courbes de régression sont toujours inférieures à cette valeur seuil pour les estimations de  $r^2$ , tant pour l'Acre que pour le Rondônia. Quelle que soit la mesure utilisée, le déséquilibre de liaison à faible distance semble plus prononcé dans l'Acre que dans le Rondônia. Ceci ressort nettement de l'examen du tableau 5.4 dans lequel figurent les valeurs moyennes observées sur les estimateurs  $D'$  et  $r^2$  par intervalles de distance: les valeurs moyennes de  $r^2$  décroissent de 0.043 à 0.010 dans l'Acre (de 0.020 à 0.009 dans le Rondônia) et celles de  $D'$  de 0.362 à 0.180 dans l'Acre (de 0.262 à 0.154 dans le Rondônia).

**Tableau 5.4.**

Moyenne et écart type du déséquilibre de liaison estimé à partir de données haplotypiques pour différents intervalles de distance

Intervalle de distance (cM)	Groupe Acre				Groupe Rondônia			
	$r^2$		$D'$		$r^2$		$D'$	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
(1-3)	0.043	0.027	0.362	0.122	0.020	0.007	0.262	0.079
(4-6)	0.018	0.004	0.273	0.040	0.020	0.090	0.218	0.042
(7-9)	0.016	0.012	0.214	0.084	0.018	0.011	0.224	0.076
(10-12)	0.019	0.014	0.232	0.065	0.013	0.003	0.170	0.035
(13-15)	0.011	0.008	0.184	0.065	0.012	0.006	0.183	0.057
(16-19)	0.009	0.005	0.182	0.050	0.009	0.005	0.175	0.065
(20-25)	0.010	0.005	0.177	0.050	0.009	0.005	0.153	0.050
(26-59)	0.008	0.005	0.174	0.050	0.008	0.004	0.154	0.046



**Figure 5.4.** Coefficients  $D'$  et  $r^2$  calculés à partir des 10 reconstructions d'haplotypes après réduction du nombre d'allèles par locus. Groupes de liaison g2 et g8. La droite en pointillés rouge correspond à la valeur seuil de significativité;  $R^2$ : coefficient de détermination relatif à la courbe de régression (en rouge).

### 5.2.2. Déséquilibre de liaison entre marqueurs de g15

Le déséquilibre de liaison sur le groupe de liaison g15 dans la région où est situé le gène majeur de résistance au SALB chez MDF180 a donc été étudié au moyen de 6 marqueurs

microsatellites et de SNPs révélés dans 4 fragments d'ADN génomique non codant. Les nombres d'allèles par microsatellites et de SNPs par fragment séquencé figurent dans le tableau 5.5. Les allèles des locus microsatellites ont été regroupés selon la méthode exposée ci-dessus. Les mêmes procédures de reconstruction d'haplotypes et de calcul de  $D'$  et  $r^2$  ont été appliquées séparément sur les données microsatellites d'une part et sur les SNPs d'autre part.

**Tableau 5.5.** Position des marqueurs en g15, effectifs analysés, nombre d'allèles par marqueur microsatellite, nombre de SNPs par fragment séquencé

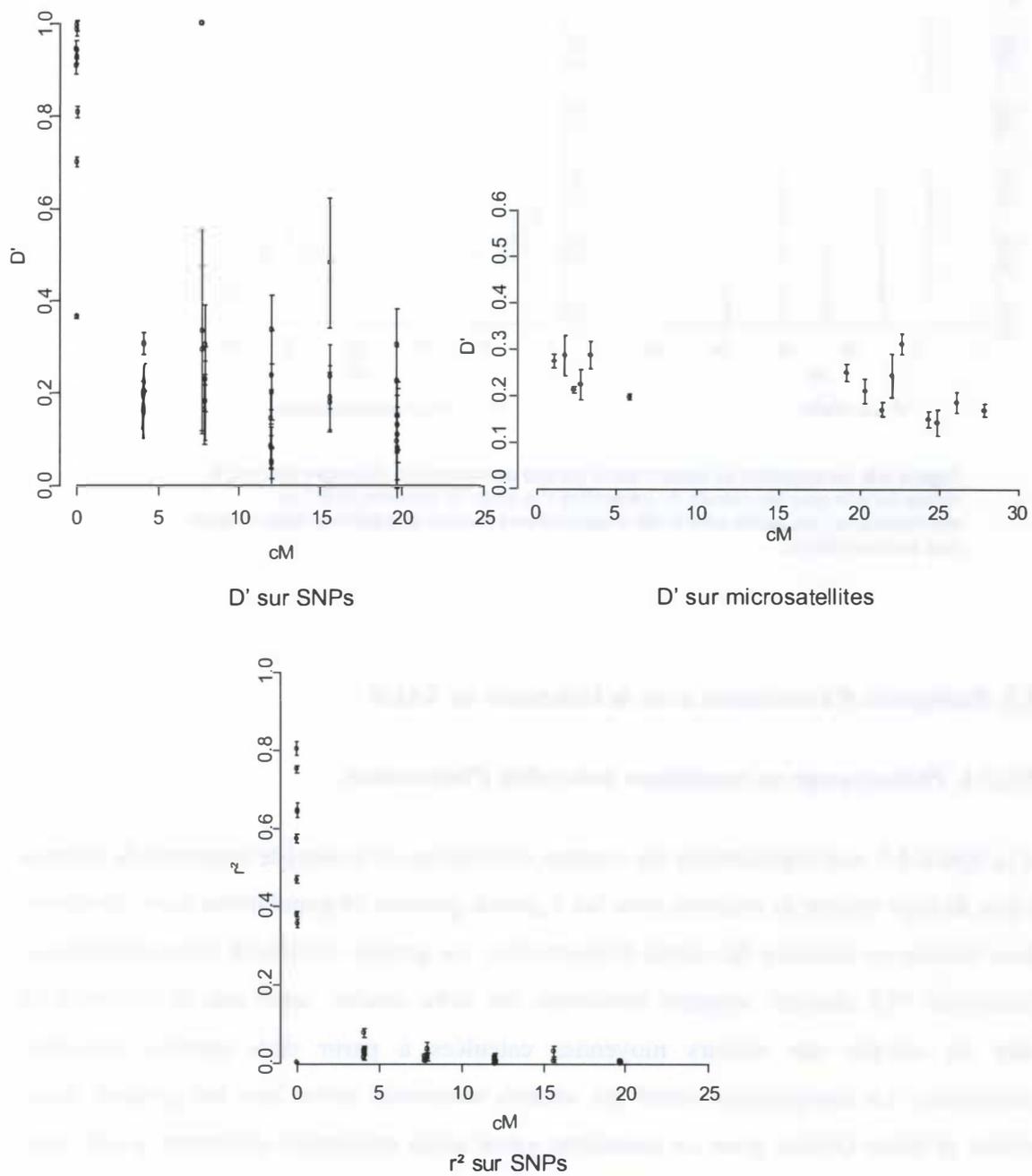
<u>Microsatellites</u>	Position relative (cM)	Effectif analysé		Nombre d'allèles		
		<u>Acre</u>	<u>Rondônia</u>	<u>Acre</u>	<u>Rondônia</u>	<u>Total</u>
T2086	30.9	93	98	14	23	24
a295	34.3	91	94	17	16	20
a289	36.7	93	98	15	16	17
TA2163	55.9	92	96	18	23	26
A2483	57.9	93	98	multiamorçage		
TAs2706	58.8	93	96	7	10	10

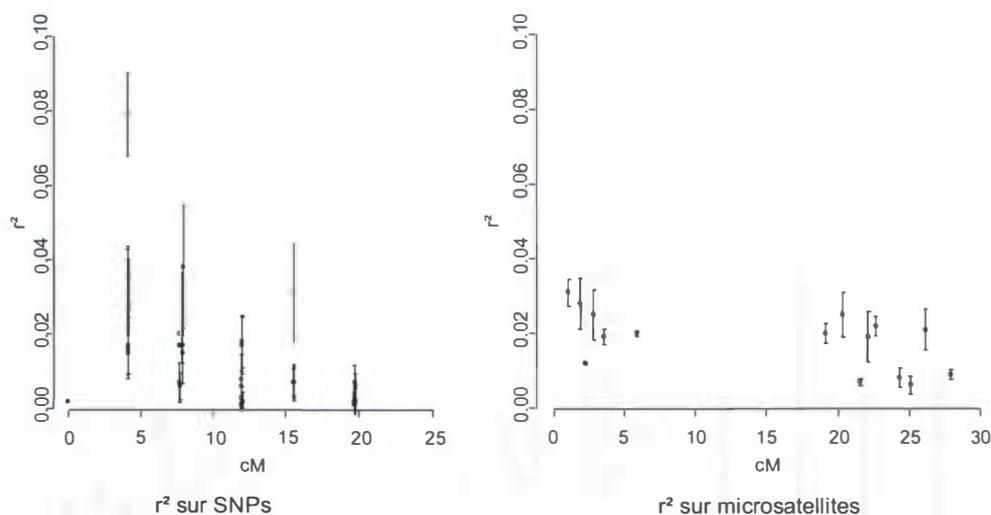
<u>Fragments séquencés</u>	Position relative (cM)	Effectif analysé		Nombre de SNPs détectés		
		<u>Acre</u>	<u>Rondônia</u>	<u>Acre</u>	<u>Rondônia</u>	<u>Total</u>
gHbCIR441	38.2	-	87	-	2	2
a212	45.9	-	78	-	2	2
gHbCIR406	53.8	-	80	-	2	2
A2483	57.9	-	86	-	4	4

Les différents locus SNPs ont été désignés par le nom du fragment qui a été séquencé, suivi de la localisation du locus nucléotidique polymorphe, en paires de bases depuis le début du séquençage. Deux sites SNPs ont été identifiés pour chacun des fragments 441, a212 et 406 (respectivement 441-105, 441-360, a212-261, a212-389, 406-128 et 406-242) et 4 SNPs pour le fragment A2483 (A2483-89, A2483-109, A2483-162 et A2483-331).

Les valeurs des paramètres  $D'$  et  $r^2$  calculés à partir des données microsatellites et à partir des données SNPs sont représentées dans les figures 5.5 et 5.6. Comme attendu, le déséquilibre de liaison est très élevé entre SNPs provenant du même fragment amplifié :  $D'$  compris entre 0,4 et 1,0;  $r^2$  compris entre 0,4 et 0,8. Il décroît ensuite rapidement à partir de 4 cM pour des valeurs de  $D'$  voisines de 0,2 et des valeurs de  $r^2$  comprises entre 0,015 et 0,040. Les estimations faites à partir de données microsatellites sont similaires à celles obtenues à partir de SNPs pour les courtes distances (moins de 5 cM), mais elles ont tendance à diminuer moins rapidement sur des distances supérieures.



**Figure 5.5** Déséquilibre de liaison sur le groupe de liaison g15 à proximité du gène majeur *M15md* calculé à partir de données microsatellites ou de données SNPs



**Figure 5.6.** Déséquilibre de liaison sur le groupe de liaison g15. Représentation à la même échelle pour les calculs du paramètre  $r^2$  à partir de données SNPs et microsatellites (les points pour 0 cM n'apparaissent pas sur le graphique établi à partir des données SNPs).

### 5.2.3. Recherche d'association avec la résistance au SALB

#### 5.2.3.1. Phénotypage en conditions naturelles d'infestation

Dans la figure 5.7 sont représentées les courbes d'évolution de la densité moyenne de stromas ainsi que du type moyen de réaction pour les 3 grands groupes de populations Acre, Rondônia et Mato Grosso en fonction des dates d'observation. La grande variabilité inter-observations du paramètre "TR moyen" apparaît nettement sur cette courbe, ainsi que la nécessité de prendre en compte des valeurs moyennes calculées à partir d'un nombre important d'observations. La comparaison entre les valeurs moyennes prises par les groupes Acre, Rondônia et Mato Grosso pour ce paramètre serait ainsi totalement différente si elle était basée sur une seule observation réalisée en janvier 2003 ou en janvier 2005 par exemple. Le paramètre "DS moyen" est moins variable car le classement des trois groupes de population est conservé quelle que soit la date d'observation considérée. Il reste malgré tout sujet à des fluctuations importantes d'une date d'observation à l'autre, ce qui implique également pour ce paramètre la nécessité de travailler sur des valeurs moyennes prenant en compte un grand

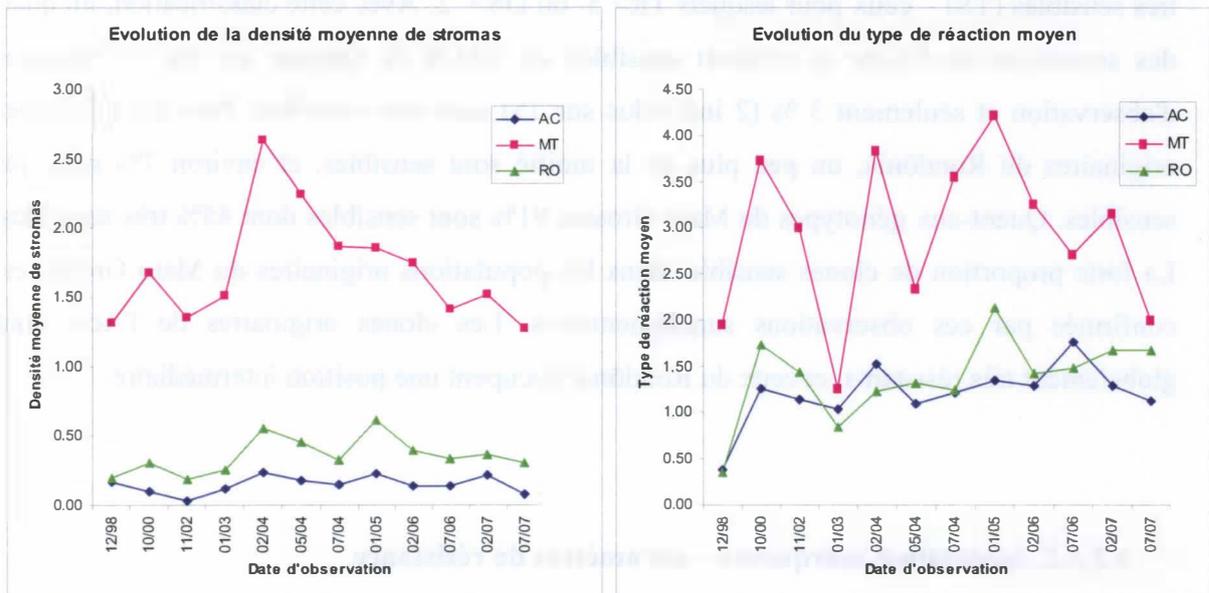
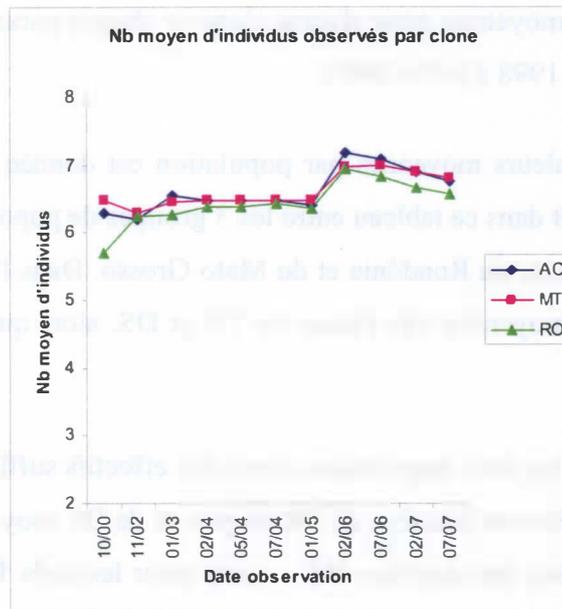


Figure 5.7. Evolution des paramètres de résistance en fonction des dates d'observation

nombre d'observations. Pour ces deux courbes et en dépit de fluctuations importantes d'une date d'observation à l'autre, on ne constate pas de tendance générale à une évolution à la baisse ou à la hausse de la sensibilité au SALB du matériel étudié.

Dans la suite de ce chapitre, les données de base sur lesquelles porteront les études statistiques seront donc les valeurs moyennes pour chaque clone et chaque paramètre des 12 observations effectuées de décembre 1998 à juillet 2007.

Une synthèse de ces valeurs moyennes par population est donnée dans le tableau 5.2. Une distinction nette apparaît dans ce tableau entre les 3 groupes de populations correspondant aux 3 états brésiliens de l'Acre, du Rondônia et du Mato Grosso. Dans l'Acre, 4 populations sur 5 présentent des valeurs moyennes très basses de TR et DS, alors qu'elles ne sont que 4 sur 7 dans le Rondônia.

Quant au Mato Grosso, les deux populations ayant des effectifs suffisants pour être comparées présentent des valeurs élevées à la fois de TR moyen et de DS moyen. On peut distinguer les clones en deux catégories, les sensibles (S) – ceux pour lesquels  $TR > 2$  ou  $DS > 0$  - et les très sensibles (TS) – ceux pour lesquels  $TR > 5$  ou  $DS > 2$ . Avec cette classification, un quart des accessions de l'Acre se révèlent sensibles au SALB en Guyane sur les 12 passages d'observation et seulement 3 % (2 individus sur 75) sont très sensibles. Pour les génotypes originaires du Rondônia, un peu plus de la moitié sont sensibles, et environ 7% sont très sensibles. Quant-aux génotypes du Mato Grosso, 91% sont sensibles dont 45% très sensibles. La forte proportion de clones sensibles dans les populations originaires du Mato Grosso est confirmée par ces observations supplémentaires. Les clones originaires de l'Acre sont globalement très résistants, et ceux du Rondônia occupent une position intermédiaire.

#### **5.2.3.2. Association marqueurs – paramètres de résistance**

L'association génétique entre génotypes aux marqueurs et paramètres de la résistance au SALB a tout d'abord été testée chez les individus des groupes Acre et Rondônia avec les marqueurs microsatellites du groupe de liaison g15 et avec les SNPs du même groupe de liaison sur les individus du Rondônia (les seuls à avoir été génotypés avec ce type de marqueurs). Nous avons fait l'hypothèse que le gène majeur *M15md* identifié chez le clone MDF 180 pouvait être également présent dans les populations de l'Acre et du Rondônia. Nous avons gardé pour les microsatellites les mêmes regroupements d'allèles que ceux ayant servi à définir le déséquilibre de liaison sur g15.

**Tableau 5.6.** Résultats de l'analyse de variance des moyennes phénotypiques par classes génotypiques sur les marqueurs en g15

Microsatellites	Acre, sans covariables clusters				Acre, avec 3 covariables AC-MT-RO			
	TR		DS		TR		DS	
	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
T2086	<b>0.0002</b>	0.466	<b>0.0000</b>	0.598	0.759	0.078	0.852	0.039
a295	0.543	0.252	0.847	0.188	0.210	0.183	0.186	0.109
a289	0.766	0.085	0.948	0.051	0.714	0.053	0.986	0.012
TA2163	0.586	0.183	0.363	0.222	0.842	0.077	0.797	0.048
A2483	0.855	0.122	0.968	0.084	0.108	0.161	0.518	0.060
TAs2706	0.763	0.073	0.951	0.041	0.106	0.105	0.063	0.067

Microsatellites	Rondônia, sans covariables clusters				Rondônia, avec 3 covariables AC-MT-RO				Rondônia, avec 4 covariables intra-groupe			
	TR		DS		TR		DS		TR		DS	
	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
T2086	0.212	0.136	0.336	0.116	0.202	0.139	0.263	0.122	0.262	0.127	0.378	0.113
a295	<b>0.0004</b>	0.317	<b>0.0010</b>	0.297	<b>0.0004</b>	0.319	<b>0.0003</b>	0.307	<b>0.0005</b>	0.309	<b>0.0016</b>	0.290
a289	0.049	0.124	0.031	0.136	0.071	0.114	0.087	0.103	0.080	0.110	0.036	0.134
TA2163	0.672	0.078	0.620	0.083	0.665	0.079	0.572	0.085	0.544	0.091	0.558	0.092
A2483	0.673	0.042	0.539	0.054	0.778	0.033	0.729	0.034	0.710	0.040	0.525	0.057
TAs2706	0.702	0.035	0.837	0.024	0.680	0.037	0.813	0.025	0.688	0.036	0.759	0.031

SNPs	Rondônia, sans covariables clusters				Rondônia, avec 3 covariables AC-MT-RO				Rondônia, avec 4 covariables intra-groupe			
	TR		DS		TR		DS		TR		DS	
	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
441-105	0.413	0.008	0.361	0.010	0.502	0.005	0.524	0.005	0.552	0.004	0.461	0.007
441-360	0.827	0.005	0.771	0.007	0.931	0.002	0.883	0.003	0.762	0.007	0.768	0.007
A2483-89	0.479	0.019	0.276	0.032	0.467	0.019	0.245	0.032	0.468	0.019	0.114	0.052
A2483-109	0.403	0.023	0.269	0.033	0.409	0.022	0.259	0.031	0.493	0.017	0.252	0.034
A2483-162	0.679	0.010	0.163	0.045	0.785	0.006	0.270	0.030	0.689	0.009	0.171	0.043
A2483-331	0.153	0.048	0.162	0.046	0.162	0.044	0.162	0.041	0.223	0.037	0.179	0.043
406-128	0.237	0.042	0.413	0.026	0.238	0.040	0.460	0.021	0.276	0.036	0.584	0.015
406-242	0.305	0.032	0.593	0.014	0.242	0.037	0.461	0.019	0.209	0.041	0.412	0.023
a212-261	?	0.000	?	0.000	?	0.000	?	0.000	?	0.000	?	0.000
a212-389	?	0.000	?	0.000	?	0.000	?	0.000	?	0.000	?	0.000

TR = Type de réaction

P = probabilité associée à l'analyse de variance

DS = Densité de stromas

R<sup>2</sup> = Portion de la variation totale expliquée uniquement par l'effet marqueur

De l'utilisation du logiciel Structure associée à la détermination de la statistique d'Evanno et al sur les arbres du groupe Rondônia, il ressort que le nombre le plus probable de sous-groupes dans le Rondônia est quatre. Les coefficients d'affectation des arbres à chacun de ces quatre sous-groupes ont donc été utilisés comme covariables dans le modèle prenant en compte la structure interne du groupe Rondônia.

Les résultats des analyses de variances aux différents locus pour les deux paramètres TR et DS sont présentés dans le tableau 5.6. Une correction de Bonferroni pour tests multiples a été appliquée sur l'ensemble des tests concernant les marqueurs microsatellites: la valeur seuil de probabilité de 0.05 pour considérer un test comme significatif a été divisée par 28 (nombre total de marqueurs microsatellites testés en g2, g8 et g15), ce qui donne une valeur seuil corrigée de 0.0018. Lorsque le modèle utilisé pour l'analyse de variance ne fait pas intervenir de covariables liées à la structure de l'échantillon, une association très significative est détectée pour les deux caractères TR et DS avec le marqueur T2086 dans l'Acre et une autre association est également détectée avec le marqueur a295 dans le Rondônia (pour TR et DS). En revanche, aucune association n'est mise en évidence avec les marqueurs SNPs en g15. Lorsque le modèle tient compte de la structure en trois clusters (Acre Rondônia et Mato Grosso), aucune association n'est plus détectée dans l'Acre, alors que celle avec le marqueur a295 se maintient avec le même niveau élevé de signification dans le Rondônia. Il en va de même lorsque les covariables font intervenir l'affectation des individus aux 4 sous-groupes du Rondônia. La proportion de la variation expliquée par l'association au marqueur a295 est voisine de 30% quel que soit le modèle d'analyse de variance considéré. La prise en compte de covariables liées à la structure de l'échantillon ne modifie pas l'absence d'association avec les marqueurs SNPs.

Afin de tester l'éventuelle existence de fausses associations ("spurious association"), nous avons effectué la même série d'analyses de variance sur l'ensemble des marqueurs des groupes de liaison g2 et g8. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.7. Une association significative est systématiquement détectée pour le groupe Rondônia avec le marqueur A2381 situé sur le groupe de liaison g2. Plus de 45% de la variation observée est expliquée par l'association à ce marqueur. Dans le groupe Acre, une association significative est détectée avec le marqueur a251 dans le modèle sans covariables liées à la structure de l'échantillon, mais cette association n'est plus significative lorsqu'est prise en compte la structure en trois groupes.

Tableau 5.7. Résultats de l'analyse de variance des moyennes phénotypiques par classes génotypiques sur les marqueurs en g2 et en g8

Microsatellites	Acre, sans covariables				Acre, avec 3 covariables AC-MT-RO			
	TR		DS		TR		DS	
	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
a460	0.276	0.283	0.251	0.289	0.489	0.137	0.259	0.094
TAs2464	0.973	0.090	0.987	0.077	0.441	0.118	0.367	0.073
A2534	0.910	0.053	0.964	0.039	0.316	0.079	0.343	0.044
T2607	0.015	0.179	0.003	0.222	0.178	0.053	0.024	0.053
T2140	0.740	0.080	0.718	0.083	0.523	0.062	0.726	0.027
A2747	0.952	0.097	0.895	0.117	0.879	0.068	0.863	0.041
t152	0.866	0.059	0.859	0.060	0.728	0.045	0.485	0.036
t283	0.735	0.107	0.850	0.087	0.565	0.076	0.671	0.039
A2381	0.960	0.052	0.866	0.076	0.661	0.060	0.630	0.036
BAC55	0.099	0.130	0.111	0.126	0.234	0.056	0.417	0.024
BAC08	0.586	0.176	0.249	0.240	0.781	0.077	0.374	0.066
A2442	0.049	0.166	0.091	0.143	0.070	0.083	0.181	0.036
a241	0.773	0.139	0.954	0.091	0.506	0.102	0.511	0.061
MA66	0.650	0.103	0.712	0.094	0.380	0.080	0.415	0.045
a251	0.002	0.255	<b>0.0002</b>	0.310	0.036	0.093	0.021	0.060
TA2203	0.447	0.144	0.173	0.200	0.846	0.045	0.902	0.022
t686	0.990	0.073	0.984	0.080	0.837	0.077	0.249	0.080
t73	0.974	0.038	0.851	0.069	0.583	0.059	0.432	0.043
T2542	0.981	0.024	0.924	0.039	0.730	0.037	0.196	0.047
A2306	0.220	0.044	0.403	0.026	0.729	0.005	0.967	0.000
T2656	0.288	0.198	0.873	0.096	0.095	0.144	0.140	0.078
MX692	0.956	0.050	0.841	0.076	0.638	0.059	0.219	0.056

Microsatellites	Rondônia, sans covariables				Rondônia, avec 3 covariables AC-MT-RO				Rondônia, avec 4 covariables intra-groupe			
	TR		DS		TR		DS		TR		DS	
	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>
a460	0.677	0.070	0.863	0.049	0.672	0.071	0.946	0.033	0.670	0.072	0.843	0.053
TAs2464	0.431	0.125	0.661	0.096	0.549	0.110	0.929	0.053	0.354	0.137	0.598	0.106
A2534	0.962	0.079	0.979	0.070	0.959	0.081	0.990	0.057	0.896	0.101	0.947	0.087
T2607	0.664	0.010	0.540	0.015	0.572	0.014	0.358	0.024	0.574	0.014	0.400	0.023
T2140	0.024	0.148	0.140	0.098	0.036	0.138	0.281	0.071	0.048	0.131	0.169	0.094
A2747	0.273	0.172	0.040	0.247	0.302	0.167	0.079	0.211	0.282	0.172	0.043	0.250
t152	0.643	0.141	0.384	0.179	0.731	0.129	0.422	0.164	0.773	0.123	0.484	0.168
t283	0.137	0.252	0.116	0.260	0.139	0.253	0.112	0.248	0.054	0.293	0.046	0.302
A2381	<b>0.0000</b>	0.470	<b>0.0000</b>	0.456	<b>0.0000</b>	0.458	<b>0.0000</b>	0.440	<b>0.0000</b>	0.476	<b>0.0000</b>	0.468
BAC55	0.405	0.061	0.789	0.030	0.479	0.055	0.878	0.021	0.507	0.053	0.826	0.027
BAC08	0.048	0.198	0.183	0.150	0.026	0.217	0.097	0.163	0.017	0.231	0.094	0.179
A2442	0.269	0.079	0.245	0.083	0.370	0.067	0.534	0.049	0.180	0.094	0.178	0.096
a241	0.626	0.045	0.682	0.040	0.693	0.039	0.835	0.026	0.694	0.039	0.717	0.038
MA66	0.775	0.070	0.446	0.109	0.840	0.062	0.594	0.085	0.642	0.086	0.411	0.116
a251	0.692	0.009	0.788	0.006	0.720	0.008	0.901	0.002	0.752	0.007	0.818	0.005
TA2203	0.339	0.175	0.550	0.144	0.363	0.172	0.498	0.144	0.434	0.163	0.573	0.145
t686	0.388	0.185	0.535	0.162	0.439	0.178	0.647	0.139	0.342	0.195	0.312	0.203
t73	0.915	0.046	0.848	0.057	0.944	0.040	0.866	0.056	0.949	0.040	0.906	0.049
T2542	0.855	0.025	0.764	0.032	0.726	0.036	0.323	0.068	0.896	0.021	0.705	0.038
A2306	0.761	0.033	0.531	0.051	0.836	0.026	0.750	0.032	0.818	0.028	0.571	0.049
T2656	0.646	0.089	0.723	0.080	0.653	0.088	0.758	0.071	0.847	0.062	0.757	0.077
MX692	0.057	0.128	0.084	0.117	0.044	0.136	0.041	0.130	0.059	0.128	0.102	0.113

TR = Type de réaction  
P = probabilité associée à l'analyse de variance

DS = Densité de stromas  
R<sup>2</sup> = Portion de la variation totale expliquée uniquement par l'effet marqueur

### 5.3. Discussion

A notre connaissance, aucune étude portant sur le déséquilibre de liaison ou sur une association entre marqueurs et caractère d'intérêt chez l'hévéa n'avait été publiée jusqu'à présent. Les résultats que nous présentons ici sont donc originaux, même si le déséquilibre de liaison n'est étudié que dans une zone réduite du génome et que l'association génétique avec le caractère de résistance au SALB n'est testée que sur un nombre limité de marqueurs génétiques. La présentation de ces résultats nous a amené à souligner les difficultés liées à trois points cruciaux d'importances différentes pour l'étude du déséquilibre de liaison ou pour l'étude d'association. Ces trois points sont (i) la nature et la taille de l'échantillon étudié, (ii) le multiallélisme des marqueurs et (iii) l'hétérozygotie de l'espèce. Nous centrerons donc la discussion sur ces trois points, avant d'aborder l'origine du déséquilibre de liaison dans les populations que nous avons étudiées, et enfin d'envisager les suites qui pourraient être données à l'étude d'association génétique avec la résistance au SALB.

#### 5.3.1. Echantillon d'étude

La structuration génétique d'un échantillon est une cause importante de déséquilibre entre locus non physiquement liés (Nei & Li 1973), par association non aléatoire d'allèles à ces locus. C'est pourquoi il était indispensable de constituer l'échantillon sur lequel nous allons faire porter l'étude de déséquilibre de liaison, en fonction de la structuration de la diversité des populations telle que nous l'avons décrite au chapitre 4. Les trois clusters de population définis par le logiciel Structure ont été pris comme référence car ils représentent la partition de l'échantillon étudié qui maximise les différences entre clusters. Par ailleurs, ces trois clusters correspondent à des entités géographiques bien définies en termes de proximité entre les populations et d'appartenance à un même bassin hydrographique. Afin de conférer une cohérence globale des résultats, nous avons souhaité *a priori* que le déséquilibre de liaison et l'association génétique avec la résistance soient étudiés sur les mêmes échantillons. Notre choix a donc porté sur les groupes Acre et Rondônia, en raison de la présence dans ces deux groupes de nombreux génotypes d'hévéa présentant une bonne résistance au SALB en conditions naturelles d'infestation en Guyane. Nous avons vu au chapitre 4 qu'à l'intérieur du groupe Acre, peu d'individus avaient un génotype résultant d'un mélange entre les trois groupes. Cette proportion est plus importante parmi les individus du Rondônia. Nous avons montré par ailleurs que ce groupe Rondônia présentait une structuration interne en quatre sous-groupes, ce qui corrobore l'existence de  $F_{ST}$  significatifs entre paires de populations

intra-groupe. Nos études de déséquilibre de liaison et d'association avec la résistance au SALB portent donc sur un échantillon assez homogène et sans structure interne forte (Acre) et un autre échantillon structuré en 4 sous-groupes et avec plus d'individus ayant des génotypes mélangés (Rondônia). Les caractéristiques du groupe Acre sont donc plus propices que celles du Rondônia à la détection d'un déséquilibre de liaison significatif lié à la proximité physique entre locus. On s'attend en effet à ce que la présence de sous-groupes et "d'admixture" créent dans le Rondônia un déséquilibre de structure pouvant perturber le seuil de détection de déséquilibre de liaison significatif. Pour ce groupe Rondônia, nous aurions pu choisir d'étudier le déséquilibre de liaison par sous-groupes, mais nous aurions alors été confrontés à des problèmes de taille d'échantillons. La plupart des études de déséquilibre de liaison chez les plantes portent sur des échantillons d'au moins 100 individus (Gupta et al 2005), et il nous a semblé que le choix de faire porter notre étude sur un effectif de cet ordre de grandeur pour l'Acre et pour le Rondônia devait primer sur celui de constituer des échantillons plus homogènes mais de tailles plus réduites.

La problématique est différente dans le cas d'étude d'association avec un caractère d'intérêt puisque le logiciel utilisé (Tassel) permet d'introduire en tant que covariables dans le modèle d'analyse de variance le coefficient d'affectation de chaque individu aux différents groupes. La possibilité de pouvoir mesurer simultanément l'association entre marqueurs et caractères d'intérêt sur plusieurs groupes et donc sur un nombre plus élevé d'individus favorise en théorie la robustesse et la puissance du test. Toutefois, notre choix de ne chercher du polymorphisme nucléotidique à proximité du gène majeur de résistance *M15md* que dans le Rondônia, a été guidé par le fait que ce groupe offrait plus de chance d'observer des différences phénotypiques nettes entre classes génotypiques que dans l'Acre.

### **5.3.2. Multiallélisme des microsatellites**

Le multiallélisme des microsatellites est un avantage certain pour la description de la diversité des populations car il permet une représentation fine de la structuration avec un nombre limité de marqueurs. Un nombre important d'allèles est également intéressant pour la cartographie génétique car il accroît la probabilité de trouver des marqueurs polymorphes chez les deux parents d'une descendance. De même, dans les études d'association, il peut être intéressant de disposer de plusieurs classes génotypiques lorsque l'on s'intéresse à la diversité allélique d'un gène d'intérêt, sous réserve que ces classes aient une fréquence raisonnable, supérieure à 5%. Cependant, ce multiallélisme doit rester limité dans le cas du déséquilibre de liaison car un

trop grand nombre d'allèles par locus impose théoriquement de disposer de grands effectifs afin de pouvoir effectuer toutes les comparaisons d'allèles deux à deux entre locus. Ainsi, le grand nombre d'allèles contribue à majorer artificiellement le déséquilibre de liaison mesuré par  $D'$ , ainsi que cela a été suggéré par Zhao et al (2005). L'incidence du nombre d'allèles sur la valeur de  $D'$  est toutefois un point controversé (Hedrick 1987; Lewontin 1988).

Les nombres d'allèles que nous observons dans l'échantillon étudié (voir tableau 5.3.) sont particulièrement élevés, comparables en cela à ceux observés chez d'autres arbres tropicaux américains comme *Symphonia globulifera* (Aldrich et al 1998), le mahogany (Roth Novick et al 2003), ou *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al 2001), mais pour lesquels aucune étude de déséquilibre de liaison n'a encore été publiée. Une manière de gérer ce problème a consisté à regrouper les allèles des locus pris en compte pour le déséquilibre de liaison et l'étude d'association.

L'utilisation à cette fin du logiciel Darwin 5.0 n'a pas donné de résultats satisfaisants, ainsi que nous l'avons mentionné dans la partie Résultats. Les locus microsatellites chez l'hévéa ne présentent en effet généralement pas des fréquences alléliques pouvant être expliqués uniquement par le modèle de "stepwise mutation". Cette observation a déjà été faite chez d'autres organismes et peut être expliquée par une homoplasie de taille (Estoup et al 2002) analogue à celle décrite chez le maïs (Lia et al 2007), par des variations de plusieurs motifs dinucléotidiques en une seule mutation (Huang et al 2002) ou par des phénomènes limitant la taille maximale d'un microsatellite (Ellegren 2000). La solution que nous avons adoptée a été retenue à la suite d'une revue bibliographique des différentes méthodes proposées chez d'autres espèces. Ces méthodes tendent toutes à réduire le nombre d'allèles étudiés : chez la vigne, élimination des allèles de fréquence inférieure à 5% (Barnaud et al 2006); regroupement des allèles de fréquence inférieure à 5% chez l'homme (Mohlke et al 2001) et le peuplier (Yin et al 2004) ou de fréquence inférieure à 7% chez le blé dur (Maccaferri et al 2005); chez *Pinus radiata*, constitution de 4 classes alléliques avec les 3 allèles les plus fréquents et une autre classe regroupant tout le reste (Kumar et al 2003); enfin chez le maïs, le nombre d'allèles est réduit à 2 par tirage aléatoire d'un allèle contre tous les autres, l'analyse portant ensuite sur 50 répétitions avec moyenne des résultats (Stich et al 2006). Nous nous sommes donc inspirés de ces méthodes pour réduire le nombre d'allèles étudiés en ne prenant en compte que les allèles les plus fréquents et en regroupant tous les allèles de faible fréquence dans la même classe. Il n'a cependant pas été possible de respecter les mêmes seuils

et les mêmes nombres de classes alléliques pour l'ensemble de nos marqueurs. Il est en effet difficile de traiter de la même manière un marqueur ayant par exemple 32 allèles de fréquences comprises entre 0.5 et 12 % et un autre marqueur de 7 allèles avec des fréquences entre 0.5 et 57%. La règle générale que nous avons suivie pour la majorité des locus a été de regrouper dans la même classe allélique tous les allèles de fréquence inférieure à 10%. Pour certains locus, ce seuil a été abaissé afin de conserver une fraction suffisante d'allèles non regroupés.

Le regroupement des allèles de faible fréquence dans une même classe allélique génère toutefois une difficulté importante pour l'étude d'association. En effet, ainsi que nous l'avons vu, les différences de fréquences alléliques entre groupes Acre et Rondônia pour un même marqueur imposent des regroupements d'allèles différents. Dès lors, il devient impossible d'effectuer un test d'association sur l'ensemble des individus de l'Acre et du Rondônia car les classes d'allèles regroupés ne sont pas constituées sur les mêmes bases dans les deux groupes. Les tests d'association ne peuvent donc être effectués que séparément sur chaque groupe et perdent ainsi en puissance. Cette limitation constitue un argument fort en faveur du développement de marqueurs SNPs pour améliorer la puissance des tests d'association.

### 5.3.3. Hétérozygotie des individus échantillonnés

Le problème généré par l'hétérozygotie dans la description du déséquilibre de liaison peut être traité de différentes manières. Pour plusieurs espèces de conifères, la difficulté est contournée en extrayant directement de l'ADN haploïde à partir des mégagamétophytes. C'est le cas notamment pour *Pinus taeda* (Brown et al 2004), le pin de Douglas (Krutovsky & Neale 2005) et l'épicéa (Heuertz et al 2006). Dans une étude portant sur l'estimation du déséquilibre de liaison à partir de SNPs situés dans 66 fragments d'ADN chez la pomme de terre, les haplotypes non détectables directement étaient inférés (Simko et al 2006). Chez le peuplier, Yin et al (2004) ont regroupé les allèles de fréquence <5% et estimé les haplotypes et leurs fréquences par l'algorithme d'"expectation-maximization" mis en œuvre dans le logiciel Arlequin. Chez la vigne (Barnaud et al 2006), le déséquilibre de liaison a été estimé à la fois par le coefficient composite  $\Delta_{AB}$  à partir de données génotypiques non phasées, et également par le coefficient de corrélation multiallélique  $r^2$  après reconstruction des haplotypes avec le logiciel Phase. Ce logiciel Phase a également été utilisé pour l'étude du déséquilibre de liaison au sein de troupeaux de bovins (Tenesa et al 2003; Thévenon et al 2007). Nous avons opté

pour la comparaison entre le coefficient composite  $\Delta_{AB}$  et les estimateurs  $D'$  et  $r^2$  dont les calculs ont été rendus possibles par l'utilisation du logiciel Phase.

#### 5.3.4. Origine et intensité du déséquilibre de liaison dans les populations étudiées

Le principal objectif poursuivi au cours de nos travaux sur le déséquilibre de liaison était avant tout de savoir s'il était possible de mettre en évidence un tel déséquilibre au sein de populations naturelles d'hévéa. En effet, les conditions ne semblaient pas *a priori* réunies pour cela : espèce à mode de reproduction majoritairement allogame, à taux d'hétérozygotie élevé, avec des populations d'effectif efficace inconnu mais vraisemblablement assez élevés, et pour laquelle les ressources en marqueurs moléculaires étaient limitées essentiellement à des microsatellites à motifs dinucléotidiques très polymorphes. Toutefois, des données sur l'histoire des peuplements végétaux dans le bassin Amazonien pouvaient nous laisser espérer qu'un déséquilibre de liaison ait pu subsister à la suite d'un goulot d'étranglement démographique. En effet, plusieurs travaux font état de la réduction de la superficie de la forêt humide du bassin Amazonien au cours du pléistocène tardif, et le maintien d'îlots de végétation refuge (Prance 1973; van der Hammen 1974) à la suite de modifications climatiques survenues lors de la dernière période de glaciation. Cette période de glaciation aurait pris fin il y a 13 000 ans environ et parmi les régions identifiées comme ayant abrité des zones refuges, figure l'actuel Rondônia (Whitmore & Prance 1987). Cela signifie que le sud de l'Amazonie actuelle aurait été recolonisé à partir de ces zones refuges par la forêt tropicale humide depuis cette période. On peut donc imaginer que le repeuplement se soit effectué tout d'abord dans le Rondônia depuis ces zones refuge, et se soit étendu progressivement aux régions voisines de l'Acre et du Mato Grosso. La longévité de *H. brasiliensis* dans les populations naturelles n'a pas été mesurée directement, mais si on se réfère aux travaux de Laurance et al (2004), ayant porté sur un grand nombre d'espèces arbustives amazoniennes et notamment *Hevea guianensis*, on peut estimer que cette longévité doit être comprise entre 200 et 300 ans, soit un nombre de générations compris entre 50 et 100 depuis la fin de la dernière glaciation. Cet ordre de grandeur est tout à fait compatible avec le maintien d'un déséquilibre de liaison détectable créé initialement par la drève génétique due au goulot d'étranglement des zones refuges. A titre de comparaison, le déséquilibre de liaison plus élevé à grande distance observé chez les populations humaines d'Europe de l'ouest que chez les populations du Nigeria a été expliqué par une forte réduction démographique qui se serait produit il y a 800 à 1600 générations, et a été relié au dernier maximum d'âge glaciaire entre 15 000 et

30 000 ans avant notre ère (Reich et al 2001). L'hypothèse de zones refuges situées sur le territoire du Rondônia actuel pourrait donc expliquer à la fois la plus grande distance génétique entre populations du Rondônia qu'entre populations de l'Acre (voir tableau 4, chapitre 4), et le maintien d'un déséquilibre de liaison plus intense dans l'Acre en raison d'un repeuplement plus tardif et d'une base génétique plus restreinte. Les ratios très différents de paires de marqueurs en déséquilibre de liaison significatif intra et inter groupes de liaison pour l'Acre et le Rondônia (respectivement 4,9 et 1,1) sont une autre indication de l'existence dans l'Acre d'un déséquilibre plus intense lié à un peuplement plus récent et ayant une diversité génétique d'origine plus restreinte. Si on compare ces ratios locus liés / locus non liés en déséquilibre avec ceux observés chez le maïs, ils peuvent varier en fonction des sous-groupes dentés ou cornés de 1,0 à 2,2 (Stich et al 2006), et même prendre des valeurs inférieures à 1 (Reif et al 2005), ce qui est une indication d'un déséquilibre observé dû uniquement à la structuration de l'échantillon étudié.

Les résultats que nous présentons ici attestent qu'il est effectivement possible de mettre en évidence un déséquilibre de liaison au sein de populations naturelles d'hévéas. Ce déséquilibre de liaison s'étend sur de faibles distances ce qui en fait potentiellement un outil efficace de localisation précise de gènes d'intérêt, sous réserve de pouvoir obtenir la densité de marquage nécessaire pour un coût raisonnable. Pour affiner cette estimation du déséquilibre de liaison, il conviendrait de disposer d'un nombre plus élevé de marqueurs, et d'un moindre taux de polymorphisme de ces marqueurs. La continuation de ces travaux passera donc nécessairement par la mise au point de marqueurs SNPs qui seuls sont susceptibles de satisfaire ces exigences. Comme il n'est pas envisageable à l'heure actuelle chez l'hévéa de couvrir la totalité des 2 000 cM du génome avec des marqueurs de ce type, il faut définir des régions cibles pouvant potentiellement contenir des gènes codant pour des caractères d'intérêt. C'est ce que nous nous sommes efforcés de faire sur le g15 dans la région entourant le gène majeur de résistance identifié chez MDF180, *M15md*, sans toutefois parvenir à atteindre une densité satisfaisante de marqueurs microsatellites. C'est pourquoi nous avons complété avec des SNPs provenant de séquences flanquantes de motifs microsatellites déjà cartographiés.

### **5.3.5. Association avec des gènes de résistance au SALB**

Les résultats que nous avons présentés sont ambigus car d'un côté ils font état de l'existence d'une association significative dans une région du génome où nous nous attendions à en trouver (en g15), et d'un autre côté ils révèlent également une autre association significative

avec le marqueur A2381, dans une région du groupe de liaison g2 où nous ne soupçonnions pas *a priori* l'existence d'éventuels gènes impliqués dans la résistance au SALB. Ce locus est en effet à plus de 35 cM du locus majeur de résistance de FX2784 et doit donc être considéré comme un locus différent. Il s'agit peut-être d'un nouveau QTL de résistance, mais tant qu'il n'aura pas été confirmé, se posera la question de la puissance des tests statistiques utilisés en ce qui concerne cette association détectée en g2, et par extension la question de la fiabilité de l'association détectée en g15.

La problématique abordée à l'origine de notre étude consistait à examiner s'il était possible de détecter de nouveaux locus ou de nouveaux allèles de résistance au SALB dans les populations naturelles d'hévéas. Les populations retenues pour cette étude ne présentant que 3% à 7% d'arbres très sensibles dans les conditions guyanaises (tableau 5.2.), et partant de l'hypothèse que la résistance observée dans ces populations est conférée par un nombre limité de gènes parmi lesquels *M15md* jouerait un rôle prépondérant, cela revient donc à chercher à mettre en évidence une association génétique avec un allèle rare de sensibilité à une maladie. Les associations génétiques de ce type ayant abondamment été étudiées chez l'homme, nous nous sommes référés à la littérature sur ce sujet. Une revue déjà ancienne (Hirschhorn et al 2002), alertait sur la non reproductibilité des associations maladies-marqueurs mises en évidence dans un grand nombre d'études: sur 166 associations putatives entre un variant génétique et la sensibilité à une maladie qui ont été étudiées trois fois ou plus, seules 6 ont été confirmées. Pour pallier cette difficulté, il est recommandé de prendre en compte les résultats de plusieurs études indépendantes sous forme d'une méta-analyse d'association génétique (Munafo & Flint 2004). Bien que dans le cas qui nous préoccupe, il s'agisse d'identifier une région du génome pouvant contenir un gène non-identifié responsable d'une sensibilité à un parasite, et non pas de déterminer précisément quel gène est responsable de quelle déficience, et que les moyens mis en œuvre à cette fin soient sans comparaison, le principe d'une méta-analyse de plusieurs études indépendantes est à retenir.

Une telle méta-analyse peut tout d'abord consister à tester les associations détectées en g15 et en g2 sur les mêmes échantillons d'individus, mais avec des caractères de résistance mesurés en conditions contrôlées d'inoculation. Une étude de ce type a été initiée en Guyane mais n'a pas encore donné de résultats pour deux raisons essentielles. D'une part parce que cette expérimentation a été mise en place avec un isolat de *M. ulei* originaire de l'état de Bahia (Brésil) avant que l'on sache que le gène majeur de résistance aux isolats de cette origine se

trouve en g13, dans une région du génome où nous ne disposons pas de marqueurs microsatellites suffisamment proche du gène, et d'autre part parce que le nombre d'individus ainsi phénotypés en conditions contrôlées est encore trop restreint pour permettre une comparaison fiable des moyennes par classes génotypiques. Les données de phénotypage ainsi enregistrées ne sont toutefois pas perdues et pourront être exploitées lorsqu'elles auront été complétées sur un nombre plus important d'individus. Il serait également particulièrement intéressant de réaliser un test de cette nature en conditions contrôlées avec un isolat guyanais de *M. ulei*.

Un autre moyen de confirmer les associations observées chez les arbres du Rondônia serait d'effectuer les tests d'association entre marqueurs et résistance au SALB sur l'ensemble des individus des deux groupes Acre et Rondônia. Des classes génotypiques représentées par des effectifs plus importants permettront d'améliorer la puissance des tests. Ceci ne sera cependant réalisable que lorsqu'on pourra utiliser des marqueurs sans avoir recours à une réduction artificielle du nombre d'allèles. Une des priorités pour la continuation de ces travaux sur la génétique d'association avec la résistance au SALB sera donc d'identifier des marqueurs SNPs dans les régions présentant actuellement ce type d'association, c'est-à-dire à proximité du marqueur a295 sur g15 et du marqueur A2381 sur g2. La même démarche devra évidemment être entreprise à proximité du gène majeur de résistance *M13-Ibn* en g13 dans la perspective de futures expérimentations d'association avec la résistance aux isolats brésiliens de *M. ulei*.

Enfin, il sera intéressant de voir si les associations que nous avons détectées sont également présentes dans le Mato Grosso où la proportion d'individus résistant est beaucoup plus faible que dans l'Acre et le Rondônia. Si ce sont les mêmes gènes de résistance qui sont présents dans le Mato Grosso mais à faible fréquence, une analyse globale sur les trois groupes Acre, Rondônia et Mato Grosso permettrait d'accroître encore la puissance du test d'association, toujours sous réserve d'utiliser des marqueurs SNPs.

Si les associations détectées sont confirmées, plusieurs types d'application sont envisageables dans le cadre de l'amélioration génétique pour la résistance au SALB, mais pas avec la même facilité de mise en œuvre.

- L'exploration de la diversité allélique aux locus majeurs de résistance semble prématurée dans l'état actuel de nos connaissances, car cela suppose que des gènes candidats aient été

préalablement identifiés comme responsables des variations observées de la résistance (Upadhyaya et al 2006).

- Une autre application qui semble beaucoup plus réalisable dans un proche avenir serait de tirer partie du peu d'étendue du déséquilibre de liaison dans les deux populations étudiées pour affiner la localisation du (des) gène(s) de résistance. A cet égard, la possibilité de disposer de différentes populations d'étude caractérisées par: (i) un déséquilibre de liaison artificiellement créé et relativement étendu (populations de cartographie en ségrégation); (ii) un déséquilibre de liaison réduit (groupe Acre) et (iii) un déséquilibre de liaison très faible (groupe Rondônia) constitue un atout. Cela permet en effet d'optimiser par étapes l'utilisation des marqueurs en ne densifiant à chaque étape que la région cible du génome qui encadre le gène d'intérêt (Varshney et al 2005). Plus la localisation d'un gène d'intérêt est précise, plus son utilisation dans le cadre d'une sélection assistée par marqueurs est efficace.
- La troisième application envisageable serait d'exploiter les ressources génétiques hévéa situées dans des pays épargnés par le SALB, en sélectionnant au sein des collections *ex situ* qui s'y trouvent (et notamment celles issues de la collection IRRDB 1981) les génotypes susceptibles de contenir des gènes de résistance au SALB. L'impossibilité de phénotyper pour ce caractère dans ces pays ne constituerait ainsi plus un obstacle pour une valorisation des ressources génétiques dans l'optique de la résistance à cette maladie.

## Chapitre 6 – Conclusion, perspectives

En mettant en évidence par cartographie de QTLs plusieurs locus impliqués dans la résistance du clone RO 38, les études menées par Lespinasse et al (2000b) ont constitué une avancée majeure dans la compréhension de la génétique de la résistance au SALB chez l'hévéa. Ces travaux ont ensuite été poursuivis, ce qui a permis de montrer qu'un des QTLs à fort effet identifiés chez le clone RO 38 se comportait comme un gène majeur de résistance dans certaines conditions (Le Guen et al 2003). Les travaux décrits dans le présent document ont pour ambition de développer cette approche en définissant des outils moléculaires qui puissent être directement utilisés par le sélectionneur dans un processus de création variétale visant la résistance au SALB, et en cherchant la façon la plus efficace de valoriser les ressources génétiques disponibles *ex situ* ainsi que celles encore présentes dans leur milieu d'origine.

### 6.1. Rappel de l'ensemble des résultats acquis au cours de la thèse

Nous avons tout d'abord montré que les facteurs de résistance précédemment identifiés chez RO 38, et en particulier le gène majeur de résistance *M13-1bn*, n'étaient pas efficaces contre des souches fortement virulentes et agressives du pathogène provenant de l'état de Bahia au Brésil. Cette étude a également révélé la complexité de l'interaction *Hevea / Microcyclus* dans le cas de RO 38, puisque selon l'inoculum auquel il est confronté, ce cultivar peut présenter une résistance partielle de haut niveau de nature monogénique ou polygénique, que la résistance complète observée est toujours polygénique, et qu'aucune de ces formes de résistance n'est durable puisqu'elles ont toutes été contournées dans l'état de Bahia. De plus, des données récentes (non encore publiées) tendraient à montrer que la résistance partielle de haut niveau que présentait RO 38 en Guyane se serait effondrée au cours des dernières années. Le cultivar RO 38 ne peut donc pas constituer à lui seul la base d'un processus de création variétale et il est impératif, si l'on veut être en mesure de proposer dans le futur de nouveaux cultivars alliant forte productivité en caoutchouc et bon niveau de résistance au SALB, d'identifier de nouvelles sources de résistance.

Plusieurs caractéristiques du cultivar MDF 180 nous ont amenés à considérer ce clone comme un bon candidat pour orienter les recherches vers de nouvelles sources de résistance. Tout d'abord ce clone possède lui-même une résistance partielle de haut niveau qui se maintient depuis une trentaine d'années dans une région à forte pression de SALB et où l'inoculum naturel de *M. ulei* est très diversifié (Mattos et al 2003). La particularité de cette résistance est de limiter la sporulation conidienne du champignon et d'empêcher la formation de la phase sexuée (téleomorphe) dans les tissus de l'hôte. Ce type de résistance, jamais décrit jusqu'à présent, lui confère un caractère original et la distingue nettement des autres formes de résistance étudiées jusqu'à présent. Par ailleurs, MDF 180 est un cultivar directement issu de prospections dans le milieu d'origine de l'espèce *H. brasiliensis* sans avoir subi de croisements visant à recombinaison certains de ses caractères avec ceux d'autres génotypes en cours de sélection. La région dont il est originaire, dans le département péruvien du Madre de Dios, n'est pas très éloignée géographiquement de l'état brésilien de l'Acre, lequel est bien représenté dans de nombreuses collections *ex situ*, notamment en Guyane. La caractérisation des facteurs de résistance de MDF 180 par cartographie de QTLs a permis de définir deux régions du génome comprenant chacune un gène majeur de résistance. Un de ces gènes est situé sur le groupe de liaison g13, dans la région déjà définie chez RO 38 comme contenant le gène *M13-1bn*, et est efficace dans la résistance aux isolats brésiliens du pathogène. L'autre gène majeur est situé sur le groupe de liaison g15, et est efficace vis-à-vis des isolats guyanais, que ce soit en conditions naturelles ou contrôlées d'infestation et pour la majorité des paramètres mesurés, y compris la formation de la phase sexuée du champignon. Ce dernier gène, que nous avons nommé *M15md*, se localise sur la carte génétique de MDF 180 à 1 cM du marqueur T2086.

Afin de voir quelle pourrait être la meilleure façon de tirer partie des ressources génétiques hévéa disponibles en collections *ex situ* ou encore présentes en forêt amazonienne, nous avons mené une étude de structuration de la diversité génétique de ces ressources. Des clones d'hévéa provenant de trois prospections différentes effectuées sur une période de 40 ans et couvrant quatre grandes régions de la partie sud-ouest du bassin amazonien ont été analysés au moyen de marqueurs microsatellites. Cette diversité est structurée en trois groupes principaux, Acre – Rondônia – Mato Grosso, les deux premiers étant plus proches entre eux qu'ils ne le sont du troisième. Le groupe Acre est constitué de toutes les populations de cet état ainsi que de celle du Madre de Dios (au Pérou) dont est originaire MDF 180. Le groupe Rondônia comprend les populations du Rondônia, ainsi que celle de Vila Bela, située

administrativement dans l'état du Mato Grosso, mais non loin du Rondônia et sur le rio Guaporé, un des principaux cours d'eau de cet état. Le groupe Mato Grosso est formé des populations prospectées dans cet état. Les groupes Acre et Mato Grosso semblent présenter une meilleure homogénéité intra-groupe que le groupe Rondônia. Notre étude n'a pas confirmé une structuration en deux sous-groupes des populations de l'Acre (Acre Ouest – rio Jurua et Acre Est – rio Purus) pourtant révélée par les marqueurs isozymes et RFLP (Besse et al 1994 ; Seguin et al. 2003) .Les distances génétiques entre populations sont fortement corrélées aux distances géographiques, ce qui suggère une organisation primaire de la diversité génétique selon un modèle d'isolement par la distance. Toutefois, l'appartenance de populations à un même bassin hydrographique permet d'affiner ce modèle et d'expliquer certaines proximités génétiques entre populations éloignées géographiquement.

Le génotypage d'individus appartenant aux deux groupes de populations Acre et Rondônia au moyen de marqueurs microsatellites situés dans deux régions du génome fait apparaître un déséquilibre de liaison qui décroît rapidement avec la distance qui sépare les marqueurs. La fréquence de déséquilibre de liaison significatif entre paires de marqueurs intra-chromosome est plus importante dans l'Acre que dans le Rondônia. De plus, le déséquilibre de liaison est plus intense à courte distance pour le groupe Acre que pour le groupe Rondônia, ce qui est conforme à l'hypothèse établissant le Rondônia comme zone originelle de diversité et de recolonisation du sud du bassin Amazonien après la dernière période glaciaire. Le déséquilibre de liaison entre SNPs sur le groupe de liaison g15 est fort à très faible distance et décroît très rapidement pour se stabiliser à des valeurs équivalentes à celles observées avec des microsatellites.

Une étude d'association dans la région cible du gène majeure de résistance *M15md* suggère l'existence d'une association significative dans le groupe Rondônia. Cette association n'est pas observée dans le groupe Acre, probablement en raison de la fréquence réduite des phénotypes sensibles et de la faiblesse de l'effectif étudié dans ce groupe. Ce résultat demande confirmation dans un échantillon indépendant. Une autre association a été détectée avec le marqueur A2381 en g2 dans une région du génome où n'était pas suspectée la présence d'un gène de résistance. Ce résultat suggère l'existence d'un locus de résistance jusqu'alors inconnu, mais qu'il faudra valider par un test global sur l'ensemble des trois groupes Acre, Rondônia, Mato Grosso ou sur un échantillon indépendant.

## **6.2. Perspectives**

Ainsi que nous l'avons vu au chapitre premier de ce document, la création variétale de l'hévéa est une activité qui ne peut aboutir à des progrès génétiques significatifs que si elle bénéficie de moyens importants pour la caractérisation des génotypes: superficies expérimentales, moyens humains et durée d'expérimentation. Toutes les techniques mises en œuvre pour optimiser l'utilisation des ressources disponibles contribuent donc à augmenter l'efficacité de l'amélioration variétale de l'hévéa. Les résultats acquis à l'issue des présents travaux sont de nature à permettre un accroissement de cette efficacité dans le cas de l'amélioration génétique pour l'obtention de nouveaux cultivars à la fois productifs et résistants au SALB, sur le court terme et sur le long terme.

### **6.2.1. A court terme**

L'identification de deux nouveaux gènes majeurs de résistance au SALB chez un cultivar dont le haut niveau de résistance partielle est avéré depuis trente ans, constitue un pas décisif vers l'utilisation de ce cultivar dans des schémas d'amélioration génétique. Plusieurs étapes doivent cependant encore être franchies avant de pouvoir utiliser de façon rationnelle les informations dont nous disposons sur la résistance de MDF 180.

Tout d'abord, il est nécessaire de densifier la carte génétique de MDF 180 afin d'avoir une localisation plus précise des gènes de résistance identifiés, et vérifier également que des QTLs à effet mineur ne seraient pas présents dans d'autres portions du génome. Le génotypage des descendants du croisement PB 260 x MDF 180 a été effectué avec tous les marqueurs microsatellites dont nous disposons en tenant compte de leur positionnement respectif lorsqu'il était connu. Parmi les 233 marqueurs polymorphes chez MDF 180, 72 doivent encore être génotypés sur la descendance PB 260 x MDF 180 (tableau 3.3.), mais ils contribueront à densifier des régions déjà riches en marqueurs. D'autres marqueurs doivent être recherchés soit dans le but d'obtenir une couverture générale plus dense du génome, soit pour densifier de manière plus ciblée les régions entourant les deux gènes majeurs. Cette densification a déjà commencé par génotypage AFLP. En dépit de leur mode de ségrégation généralement dominant, les marqueurs AFLP présentent en effet l'avantage de pouvoir rapidement être produits en grand nombre, d'être généralement distribués aléatoirement dans le génome

(Cervera et al 2001) et de contribuer fréquemment à relier chez l'hévéa des groupes de liaison séparés (Lespinasse et al 2000a; Prapan et al 2006). L'existence de banques publiques d'ESTs d'hévéa pourra être mise à profit pour détecter directement de nouveaux microsatellites ou des SNPs localisés dans des gènes codants, ou indirectement par séquençage d'extrémités de clones BAC homologues de ces ESTs pour la détection de ces mêmes types de marqueurs à proximité des gènes. De plus, l'existence de banques d'expression génique différentielle obtenues lors d'interactions *M. ulei* / *Hevea* avec des cultivars résistants et sensibles accroît la probabilité de cibler ces nouveaux marqueurs dans des gènes candidats. La constitution de telles banques est en cours dans le cadre d'un projet ANR/Génoplatte associant le CIRAD, Michelin et l'université brésilienne de Santa Cruz.

Un autre point essentiel dans la compréhension du contrôle génétique de la résistance au SALB chez MDF 180 est de compléter les informations sur les efficacités respectives des gènes majeurs en g13 et en g15 vis à vis des isolats guyanais et brésiliens de *M. ulei*. Il est notamment primordial de savoir quels sont les gènes et QTLs efficaces en conditions naturelles d'infestation dans l'état de Bahia au Brésil. Il est probable que, de même que *M15md* présente les caractéristiques d'un gène majeur de résistance vis-à-vis des isolats de Guyane, et ce pour la majorité des paramètres étudiés (type de réaction, densité de stromas, niveau d'attaque), le locus identifié en g13 se comporte également comme un gène majeur de résistance aux isolats de Bahia non seulement en conditions contrôlées comme nous l'avons montré, mais aussi en infestation naturelle (y compris pour la densité de stromas). Ceci reste néanmoins à vérifier par le biais d'une expérimentation au champ dans l'état de Bahia sur une descendance en ségrégation impliquant le parent MDF 180. Il n'est d'ailleurs pas exclu qu'à cette occasion d'autres QTLs efficaces soient révélés.

Il serait souhaitable que la caractérisation des facteurs génétiques de résistance de MDF 180 par cartographie de QTLs ne soit pas limitée aux seuls isolats en provenance de Guyane et de l'état de Bahia. Il serait en particulier très intéressant de confronter cette descendance à des isolats provenant de l'aire géographique d'origine du clone MDF 180 : le sud-ouest du bassin Amazonien. Ceci pourrait être réalisé en conditions contrôlées d'inoculation au laboratoire du Cirad en Guyane, ou même par un essai planté au champ dans cette région.

Ainsi, une vision plus précise du rôle joué par les différents facteurs de résistance identifiés jusqu'à présent, ainsi qu'une localisation plus fine de ces facteurs sur la carte génétique de MDF 180 contribueraient à rendre envisageable une utilisation de marqueurs moléculaires

dans le but d'accroître les performances des schémas de sélection basés sur l'utilisation de ce clone. Une sélection à un stade très précoce prenant en compte le génotypage de marqueurs proches des gènes de résistance permettrait d'accroître la fréquence des individus résistants dans les processus ultérieurs d'évaluation / sélection et donc d'optimiser l'utilisation des surfaces et des moyens dédiés à la création variétale. Cette stratégie pourrait même être couplée avec l'utilisation de marqueurs liés à des QTLs ayant un fort impact sur le rendement en caoutchouc, tels que ceux qui ont été identifiés récemment en Thaïlande (Rattanawong et al 2008).

### **6.2.2. A long terme**

Les applications à long terme des résultats présentés dans ce document concernent plus directement la valorisation des ressources génétiques de l'espèce *H. brasiliensis*. Ainsi que nous l'avons vu au chapitre 4, l'hévéa a fait l'objet depuis les années 1940 de plusieurs prospections dans son aire d'origine afin d'élargir la base génétique mise à disposition des programmes d'amélioration génétique de l'hévéa dans le monde. En effet, la très grande majorité des cultivars plantés actuellement ont pour origine les quelques arbres introduits en Asie en 1876 par les Britanniques à la suite de l'exportation de graines d'hévéa depuis la région de Santarém au Brésil par Wickham (Dean 1987). Ces cultivars ont donc une base génétique restreinte à la diversité représentée par l'échantillonnage de quelques arbres dans une seule population du cours inférieur du rio Tapajós (voir chapitre 4 figure 1). Les résultats présentés ici confortent d'ailleurs l'analyse faite précédemment (Le Guen et al 2002) sur l'absence totale de résistance au SALB chez les cultivars issus des arbres Wickham, expliquée par la proximité génétique entre ces arbres et les populations du groupe Mato Grosso chez lesquelles se rencontrent très peu d'arbres résistants. Les sélectionneurs d'hévéas se préoccupent donc depuis plusieurs décennies d'élargir cette base génétique en y incorporant des arbres prospectés dans des régions diversifiées de l'aire d'origine de l'espèce. Les diverses collections *ex situ* générées par ces prospections ont fait l'objet de descriptions morphologiques et d'évaluations agronomiques ainsi que d'évaluation de leur valeur en croisement. Cependant, aucun programme d'amélioration génétique n'a encore produit de cultivars issus du croisement d'une de ces nouvelles accessions. Ceci peut s'expliquer, en ce qui concerne l'objectif majeur de sélection qu'est l'amélioration du rendement en caoutchouc, par la très faible aptitude moyenne à la combinaison de ce matériel pour ce qui concerne un

caractère complexe de ce type (Clément-Demange et al 1998). Bien que l'hévéa soit une plante de domestication très récente – 130 ans se sont écoulés depuis le début de sa culture - et qu'un faible nombre de cycles de recombinaisons aient eu lieu – sans doute moins d'une dizaine pour les cultivars actuels – la forte sélection massale à l'origine des clones cultivés a permis d'accroître la fréquence des allèles favorables et de parvenir à un niveau moyen de rendement en caoutchouc chez les populations améliorées nettement supérieur (dix fois en moyenne) à celui que l'on peut trouver chez des arbres issus de populations naturelles. Ceci est d'autant plus vraisemblable que la faculté pour un arbre de produire de grandes quantités de caoutchouc ne constitue vraisemblablement pas un caractère adaptatif au sein des populations naturelles et n'a donc pas fait l'objet d'une sélection positive (sauf peut-être par les "seringueiros" dans certaines régions à partir des années 1850).

Pour ce qui concerne l'intérêt de ces collections *ex situ* pour la résistance aux principales maladies de l'hévéa, peu de travaux ont été menés. La population Madre de Dios (Pérou), a été assez rapidement caractérisée par la fréquence des arbres résistants au SALB qu'elle contenait (Bos & McIndoe 1965), mais sans que cela ait été étudié d'un point de vue formel. Les génotypes jugés les plus résistants étaient directement utilisés dans des plans de croisements ayant pour but de cumuler au sein d'un même cultivar les caractères intéressants de résistance et de production portés par les parents. Quant à la prospection internationale organisée par l'IRRDB en 1981, son intérêt comme source potentielle de gènes de résistance au SALB n'a été étudié qu'après l'introduction en Guyane en 1996 d'une partie des accessions qui la constituent.

Cette prospection IRRDB 1981, dont les accessions ont été initialement réparties entre le Brésil, la Malaisie et la Côte d'Ivoire, a été diffusée depuis dans plusieurs pays africains (Côte d'Ivoire, Nigeria) et asiatiques (Malaisie, Sri Lanka, Vietnam, Inde). La valorisation de ces collections comme sources de résistance au SALB dans des programmes de création variétale peut se révéler capitale. Cette utilisation ne sera toutefois pas facile à mettre en œuvre en raison d'une part du volume de ces collections (plusieurs milliers d'accessions), de la difficulté d'accès au matériel végétal pour certaines d'entre elles, et de l'impossibilité d'effectuer des tests de résistance au SALB dans les pays où elles sont plantées. Une sélection des accessions les plus intéressantes à introduire dans un pays où des tests de résistance au SALB peuvent être pratiqués sera donc nécessaire. Cette sélection pourra être basée d'une part sur l'évaluation agronomique des accessions si celle-ci a été réalisée, et surtout sur leur

génotypage, qui permettra de confirmer ou non la conformité des accessions par rapport aux populations auxquelles elles sont censées appartenir, d'optimiser la représentation de la diversité génétique, et de détecter d'éventuelles associations avec des caractères agronomiques d'intérêt. La mise en évidence d'éventuelles associations génétiques avec les gènes majeurs de résistance en g13 ou en g15 (ou d'autres non encore identifiés) de MDF 180 serait donc un outil de tri très efficace pour tirer partie des collections existantes issues de la prospection IRRDB de 1981.

Bien que des efforts importants aient été consentis au niveau international pour la collecte et l'évaluation des populations d'hévéa de l'Acre, du Rondônia et du Mato Grosso, d'autres régions potentiellement intéressantes pour compléter nos connaissances sur la structuration de la diversité de l'espèce n'ont toujours pas été prospectées à ce jour: le nord de la Bolivie, la région d'Iquitos au Pérou ainsi que tout le sud-ouest de l'état d'Amazonas au Brésil. En plus d'informations sur la génétique des populations de ces régions, de nouvelles prospections nous permettraient de connaître les fréquences d'arbres résistants et sensibles au SALB qui composent ces populations.

De la même façon que pour la descendance du croisement PB 260 x MDF 180, il sera nécessaire d'évaluer la résistance des populations de l'Acre et du Rondônia à des isolats de *M. ulei* originaires de l'état de Bahia au Brésil, afin de mettre en évidence d'éventuelles associations avec le gène majeur de résistance en g13. Il faudra donc envisager l'expérimentation, en conditions naturelles d'infestation, de clones de l'Acre et/ou du Rondônia afin notamment d'observer la densité de stromas. Le comportement en conditions contrôlées vis-à-vis d'isolats de *M. ulei* originaires de Bahia peut être caractérisé indifféremment au Brésil ou en Guyane.

La progression des connaissances dans le domaine de la résistance de l'hévéa au SALB risque de se trouver limitée assez rapidement par l'insuffisance d'informations relatives à *M. ulei*. Nous ne savons pas en particulier quelle fraction de la diversité existante des virulences est représentée parmi les isolats utilisés pour faire les tests, qui sont majoritairement des isolats de Guyane et de Bahia. Plus généralement, nous ne connaissons pratiquement rien de l'organisation de la diversité génétique du pathogène:

- Centre d'origine de la diversité
- Structuration en populations

- Relation entre diversité génétique et diversité des virulences
- Relation entre compartiment sauvage et compartiment cultivé
- Particularités biologiques du pathogène qui peuvent influencer l'évolution de sa variabilité, comme l'homothallisme ou l'hétérothallisme,

Les réponses à ces différentes questions aideraient à orienter les dispositifs expérimentaux en choisissant avec plus de discernement les isolats testeurs, en aidant à la compréhension de la diversité observée actuellement (notamment dans l'état de Bahia, situé hors de l'aire naturelle d'origine du genre *Hevea* et où pourtant la diversité des virulences est très importante) et en anticipant l'évolution future des contournements de résistance. Un premier pas vers l'étude de la diversité génétique de *M. ulei* a été franchi avec la mise au point de marqueurs microsatellites polymorphes (Le Guen et al 2004). Une étude de génétique des populations de *M. ulei* a démarré début 2008 (Barrès, communication personnelle) et devrait rapidement produire les premiers résultats.

De même, l'approfondissement des connaissances sur l'épidémiologie du SALB est capital afin de nous permettre de comprendre les modes de dissémination et les risques qui y sont associés dans les peuplements naturels ou les plantations. Il serait en particulier intéressant de connaître l'influence de *M. ulei* sur le développement des hévéas en milieu amazonien où la densité des arbres est beaucoup plus faible et la population beaucoup moins homogène qu'en plantation, afin de savoir si la résistance au SALB constitue un avantage évolutif au sein des populations naturelles. En effet, un déséquilibre de liaison intense peut avoir tendance à se maintenir au voisinage d'un gène de résistance conférant un avantage sélectif, comme cela a été montré récemment pour la résistance à la rouille jaune du blé (Rhoné et al 2007). Des études épidémiologiques sont menées depuis plusieurs années au Cirad en Guyane (Guyot et al 2008), et devraient nous apporter rapidement des informations sur ce point.

Enfin, dans la perspective d'une amélioration génétique qui ne viserait pas uniquement la résistance au SALB, la description du déséquilibre de liaison pouvant exister dans la population améliorée issue des clones "Wickham" pourrait constituer une voie intermédiaire entre les populations de cartographie à déséquilibre de liaison étendu et les populations naturelles à déséquilibre de liaison très étroit. Les premières étapes de sélection de l'hévéa qui se sont initialement déroulées en Asie à partir d'une base génétique très restreinte ont en effet correspondu à un goulot démographique très important à une période très récente en termes de générations d'hévéas, ce qui a nécessairement généré un déséquilibre de liaison initial dont les

effets doivent encore être perceptibles actuellement. De récentes observations laissent penser que le processus de domestication de l'hévéa n'est pas achevé et que des sauts qualitatifs importants sont encore possibles pour des caractères complexes comme le rendement en caoutchouc. L'étude du déséquilibre de liaison de cette population Wickham devrait donc aider à localiser les gènes qui permettront de telles avancées.

## Références bibliographiques

Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., Chavarriaga, P., and Kochert, G., 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, **7**: 933-944.

Aranzana, M.-J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K., Lister, C., Molitor, J., Shindo, C., Tang, C., Toomajian, C., Traw, B., Zheng, H., Bergelson, J., Dean, C., Marjoram, P., and Nordborg, M., 2005. Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLOS Genetics*, **1**(5): 531-539.

Barnaud, A., Lacombe, T., and Doligez, A., 2006. Linkage disequilibrium in cultivated grapevine, *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 708-716.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Goudet, J., and Bonhomme, F., 2000. GENETIX version 4.02. *Logiciel sous Windows<sup>MT</sup> pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bénaouf, G., and Parisi, L., 2000. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology*, **90**: 236-242.

Bennett, M.D., and Leitch, I.J., 1997. Nuclear DNA amounts in Angiosperms - 583 new estimates. *Annals of Botany*, **80**: 169-196.

Bernardo, R., 2004. What proportion of declared QTL in plants are false ? *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 419-424.

Besse, P., 1993. Identification des clones cultivés et analyse de la diversité génétique chez *Hevea brasiliensis* par R.F.L.P. Thèse Thesis, Université Paris XI Orsay, 1-114 pp.

Besse, P., Seguin, M., Lebrun, P., Chevallier, M.H., Nicolas, D., and Lanaud, C., 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**: 199-207.

Billington, H.L., 1991. Effect of population size on genetic variation in a dioecious conifer. *Conservation Biology*, **5**(1): 115-119.

Blasquez, C.H., and Owen, J.H., 1963. Histological study of *Dothidella ulei* on susceptible and resistant *Hevea* clones. *Phytopathology*, **53**: 58-65.

Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., and Taberlet, P., 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, **13**: 3261-3273.

Bos, H., and McIndoe, K.G., 1965. Breeding of *Hevea* for resistance against *Dothidella ulei* P. Henn. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaya*, **19**(2): 98-107.

Bowden, J., Gregory, P.H., and Johnson, C.G., 1971. Possible Wind Transport of Coffee Leaf Rust across the Atlantic Ocean. *Nature*, **229**: 500-501.

Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., and Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, **23**(19): 2633-2635.

Bragança, H., Simões, S., Onofre, N., Tenreiro, R., and Rigling, D., 2007. *Cryphonectria parasitica* in Portugal: diversity of vegetative compatibility types, mating types, and occurrence of hypovirulence. *Forest Pathology*, **37**: 391-402.

Brown, G.R., Gill, G.P., Kuntz, R.J., Langley, C.H., and Neale, D.B., 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(42): 15255-15260.

Brown, J.K.M., 2003. Little else but parasites. *Science*, **299**: 1680-1681.

Calenge, F., Faure, A.G., M., Gebhardt, C., Van de Weg, W.E., Parisi, L., and Durel, C.E., 2004. Quantitative trait loci analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for SCAB resistance in apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **94**(4): 370-379.

Calenge, F., Van der Linden, C.G., Van de Weg, E., Schouten, H.J., van Arkel, G., Denancé, C., and Durel, C.E., 2005. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**: 660-668.

Cervera, M.T., Gusmao, J., Steenackers, M., Peteman, J., Storme, V., Broeck, A.v.d., Montagu, A.v., and Boerjan, W., 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**(5/6): 733-737.

Chee, K.H., 1976. Assessing susceptibility of hevea clones to *Microcyclus ulei*. *Annals of Applied Biology*, **84**: 135-145.

Chee, K.H., 1976. South American Leaf Blight of *Hevea brasiliensis* : spore dispersal of *Microcyclus ulei*. *Annals of Applied Biology*, **84**: 147-152.

Chee, K.H., Darmono, T.W., Kai-ming, Z., and Lieberei, R., 1985. Leaf development and spore production and germination after infection of *Hevea* leaves by *Microcyclus ulei*. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, **33**(3): 124-137.

Chee, K.H., and Holliday, P., 1986. South American leaf blight of *Hevea* rubber, Kuala Lumpur, 1-50 pp.

Chee, K.H., Kai-ming, Z., and Darmono, T.W., 1986. Occurrence of eight races of *Microcyclus ulei* on *Hevea* rubber in Bahia, Brazil. *Transactions of the British Mycological Society*, **87**(1): 15-21.

Chevallier, M.H., 1988. Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm using isozyme markers. *Journal of Natural Rubber Research*, **3**(1): 42-53.

Churchill, G.A., and Doerge, R.W., 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, **138**: 963-971.

Clément-Demange, A., Legnate, H., Chapuset, T., Pinard, F., and Seguin, M., 1998. Characterisation and use of the IRRDB germplasm in Ivory Coast and French Guyana : status in 1997., IRRDB, Brickendonbury (UK).

Collevatti, R.G., Grattapaglia, D., and Hay, J.D., 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**: 349-356.

Compagnon, P., 1986. Le caoutchouc naturel: biologie, culture, production. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 595 pp.

Couper, H., and Henbest, N., 2007. Green gold: how a Brazilian forest of rubber tree is bouncing back, *The Independent*, London.

Dakin, E.E., and Avise, J.C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, **93**: 504-509.

Davis, W., 1997. The rubber industry's biological nightmare., *Fortune*.

Dean, W., 1987. Brazil and the struggle for rubber. Cambridge University Press, Cambridge UK, 234 pp.

Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., 1983. Aplant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**(4): 19-21.

Dempster, A.P., Laird, N.M., and Rubin, D.B., 1977. Maximum Likelihood from incomplete data via the *EM* algorithm (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society*, **39**: 1-38.

Desprez-Loustau, M.-L., Robin, C., Buée, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Sache, I., and Rizzo, D.M., 2007. The fungal dimension of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**(9): 472-480.

Dijkman, M.J., 1951. Hevea. Thirty years of research in the Far East. University of Miami Press.

Dowkiw, A., Husson, C., Frey, P., PINON, J., and Bastien, C., 2003. Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: Genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance. *Phytopathology*, **93**(4): 421-427.

Durel, C.E., Parisi, L., Laurens, F., Van de Weg, W.E., Liebhard, R., and Jourjon, M.F., 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome*, **46**(2): 224-234.

Dyer, R.J., and Sork, V.L., 2001. Pollen heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology*, **10**: 859-866.

El Mousadik, A., and Petit, R.J., 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**(7): 832-839.

Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline: implication for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, **16**(12): 551-558.

Estoup, A., Jarne, P., and Cornuet, J.-M., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, **11**: 1591-1604.

Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611-2620.

Fearnside, P.M., 1989. Extractive reserves in Brazilian Amazonia. *BioScience*, **39**(6): 387-393.

Fearnside, P.M., 2005. Deforestation in Brazilian Amazonia: history, rates and consequences. *Conservation Biology*, **19**(3): 680-688.

Fernando, R.L., Nettleton, D., Southey, B.R., Dekkers, J.C.M., Rothschild, M.F., and Soller, M., 2004. Controlling the proportion of false positives in multiple dependent tests. *Genetics*, **166**: 611-619.

Ferraz, S.F.B., Vettorazzi, C.A., Theobald, D.M., and Ballester, M.R.V., 2005. Landscape dynamics of Amazonian deforestation between 1984 and 2002 in central Rondônia, Brazil: assessment and future scenarios. *Forest Ecology and Management*, **204**(1): 67-83.

Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **8**: 275-296.

Garcia, D., 1995. Contribution à l'étude de la résistance totale et partielle dans l'interaction hôte x parasite *Hevea* spp.-*Microcyclus ulei*. Aspects histologiques et biochimiques des réactions impliquées dans ces résistances., Doctorat de l'Université de Montpellier II, France, 1-216 pp.

Garcia, D., Cazaux, E., Rivano, F., and Auzac, J.d., 1995. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. *European Journal of Forest Pathology*, **25**: 282-292.

Garcia, D., Troispoux, V., Grange, N., Rivano, F., and d'Auzac, J., 1999. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. *European Journal of Forest Pathology*, **29**: 323-338.

Gasparotto, L., and Junqueira, N.T.V., 1994. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, causal agent of rubber tree leaf blight. *Fitopatologia Brasileira*, **19**(1): 22-28.

Gasparotto, L., and Lim, T.M., 1984. Research on SALB (*Microcyclus ulei*) in Brazil - Recent progress. International SALB Workshop, CEPLAC, CEPEC, Aug 1984, Itabuna. CEPLAC/CEPEC, Itabuna, pp. 1-19.

Gasparotto, L., and Lima, M.I.P.M., 1991. Research on south american leaf blight (*Microcyclus ulei*) of rubber in Brazil. Indian Journal of Natural Rubber Research, **4**(2): 83-90.

Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P., and Schüler, K., 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding, **13**: 93-102.

Geiger, H.H., and Heun, M., 1989. Genetics of quantitative resistance to fungal diseases. Annual Review of Phytopathology, **27**: 317-341.

George, P.J., and Kuruvilla Jacob, C., 2000. Natural rubber - Agromanagement and crop processing. Rubber Research Institute of India, Kottayam, 648 pp.

Ghesquière, A., Albar, L., Lorieux, M., Ahmadi, N., Fargette, D., Huang, N., McCouch, S.R., and Notteghem, J.-L., 1997. A major quantitative trait locus for rice yellow mottle virus resistance maps to a cluster of blast resistance genes on chromosome 12. Phytopathology, **87**(12): 1243-12349.

Gohet, E., Prévôt, J.-C., Eschbach, J.-M., Clément, A., and Jacob, J.-L., 1996. Hevea latex production, relationship with tree growth, influence of clonal origin and Ethrel stimulation. In: IRRDB (Editor), Symposium on physiological and molecular aspects of the breeding of *Hevea brasiliensis*, Brickendonbury, pp. 200-216.

Gonçalves, J.R.C., 1968. The resistance of Fx and IAN rubber clones to leaf diseases in Brazil. Trop. Agriculture, Trin., **45**(4): 331-336.

Gonçalves, P.S., 1981. Expedição internacional à Amazonia no território federal de Rondônia para a coleta de material botânico de seringueira *Hevea brasiliensis*, Embrapa - CNPSD, Manaus.

Goudet, J., 1995. FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity, **86**: 485-486.

Goujon, M., 1971. Considération à propos de la résistance des plantes. Le cas particulier des caféiers attaqués par les rouilles orangée et farineuse. Café Cacao Thé, **XV**(4): 308-328.

Gremillet, M., 2006. La reconquête de l'hévéa., Libération, Paris.

Gupta, P.K., Rustgi, S., and Kulwal, P.L., 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants : Present status and future prospects. Plant Molecular Biology, **57**: 461-485.

Guyot, J., 2007. Analyse, à petite échelle, de l'influence de l'environnement, de l'inoculum et de l'hôte sur la dynamique épidémique de la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (*Microcyclus ulei*) en milieu amazonien. PhD Thesis, Sup Agro, Montpellier, 199 pp.

Guyot, J., Cilas, C., and Sache, I., 2008. Influence of host resistance and phenology on South American leaf blight of the rubber tree with special consideration of temporal dynamics. *European Journal of Plant Pathology*, **120**: 111-124.

Guyot, J., Ntawanga Omanda, E., Ndoutoume, A., Mba Otsaghe, A., Enjalric, F., and Ngoua Assoumou, H.G., 2001. Effect of controlling *Colletotrichum* leaf fall of rubber tree on epidemic development and rubber production. *Crop Protection*, **20**: 581-590.

Halle, F., and Combe, J.-C., 1974. Mission en Amazonie brésilienne pour la récolte de matériel génétique nouveau destiné à l'amélioration de l'hévéa. Rapport de mission., IRCA, Paris, France.

Halle, F., and Martin, R., 1968. Etude de la croissance rythmique chez l'hévéa. *Adansonia*, **2**(8): 475-503.

Hashim, I., and Almeida, L.C.C., 1987. Identification of races and in vitro sporulation of *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research*, **2**(2): 111-117.

Hashim, I., and Pereira, J.C.R., 1989. Influence of resistance of Hevea on development of *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research*, **4**(3): 212-218.

Hedrick, P.W., 1987. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics*, **117**: 331-341.

Hertel, O., 2007. Hévéa : l'armée des 13 clones, Sciences & Avenir.

Heuertz, M., De Paoli, E., Källman, T., Larsson, H., Jurman, I., Morgante, M., Lascoux, M., and Gyllenstrand, N., 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *Genetics*, **174**: 2095-2105.

Heuertz, M., Hausman, J.-F., Tsvetkov, I., Frascaria-Lacoste, N., and Vekemans, X., 2001. Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular Ecology*, **10**: 1615-1623.

Hirschhorn, J.N., Lohmueller, K., Byrne, E., and Hirschhorn, K., 2002. A comprehensive review of genetic association studies. *Genetics in Medicine*, **4**(2): 45-61.

Hirshhorn, E., 1949. Un nuevo metodo de infeccion artificial con el carbon de la cana de azucar. *Revista de Investigaciones Agricolas*, **III**(4): 335-344.

Holliday, P., 1970. South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. C.A.B., Surrey, 1-31 pp.

Huang, Q.-Y., Xu, F.-H., Shen, H., Deng, H.-Y., Liu, Y.-J., Liu, Y.-Z., Li, J.-L., Recker, R.R., and Deng, H.-W., 2002. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *American Journal of Human Genetics*, **70**: 625-634.

Jansen, R.C., 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*, **135**: 205-211.

Johnson, R., 1981. Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, **71**: 567-568.

Johnson, R., 2000. Classical plant breeding for durable resistance to diseases. *Journal of Plant Pathology*, **82**(1): 3-7.

Jorge, V., Dowkiw, A., Faivre-Rampant, P., and Bastien, C., 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist*, **167**(1): 113-127.

Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolim, L., Alfenas, A.C., and Gasparotto, L., 1988. Reação de clones de seringueira a varios isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **23**(8): 877-893.

Junqueira, N.T.V., Chaves, G.M., Zambolim, L., Gasparotto, L., and Alfenas, A.C., 1986. Variabilidade fisiologica de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira*, **11**: 823-833.

Junqueira, N.T.V., Da Silva, S.E.L., Silva, H.M.E., and Da Silva, M.A.M., 1986. Controle biologico do mal das folhas da seringueira por *Hansfordia pulvinata* [*Hevea* spp., *Microcyclus ulei*]. *Pesquisa em Andamento*, **40**: 5 p.

Junqueira, N.T.V., Kalil Filho, A.N., and Trindade, D.R., 1987. Fatores relacionados com a resistência da seringueira ao mal-das-folhas. *Pesquisa em Andamento*, **54**: 1-6.

Junqueira, N.T.V., Lieberei, R., Kalil Filho, A.N., and Lima, M.I.P.M., 1990. Components of partial resistance in *Hevea* clones to rubber tree leaf blight, caused by *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira*, **15**(3): 211-214.

Kimura, M., and Ohta, T., 1975. Distribution of allele frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**(7): 2761-2764.

Kolmer, J.A., 1996. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology*, **34**: 435-455.

Kraakman, A.T.W., Martinez, F., Mussiraliev, B., Van Eeuwijk, F.A., and Niks, R.E., 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding*, **17**: 41-58.

Krutovsky, K.V., and Neale, D.B., 2005. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in cold-hardiness and wood quality related candidate genes in Douglas Fir. *Genetics*, **171**: 2029-2041.

Kumar, S., Echt, C., Wilcox, P.L., and Richardson, T.E., 2003. Testing for linkage disequilibrium in the New Zealand radiata pine breeding population. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**(2): 292-298.

Lander, E.S., and Botstein, D., 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**: 185-199.

Langford, M.H., 1945. South American Leaf Blight of *Hevea* rubber trees. Technical Bulletin USDA(882): 1-31.

Laurance, W.F., Albernaz, A.K.M., Fearnside, P.M., Vasconcelos, H.L., and Ferreira, L.V., 2004. Deforestation in Amazonia. *Science*, **304**(5764): 1109-1111.

Laurance, W.F., Nascimento, H.E.M., Laurance, S.G., Condit, R., D'Angelo, S., and Andrade, A., 2004. Inferred longevity of Amazonian rainforest trees based on a long-term demographic study. *Forest Ecology and Management*, **190**: 131-143.

Le Guen, V., Garcia, D., Mattos, C.R.R., and Clément-Demange, A., 2002. Evaluation of field resistance to *Microcyclus ulei* of a collection of Amazonian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, **2**(1): 141-148.

Le Guen, V., Garcia, D., Mattos, C.R.R., Doaré, F., Lespinasse, D., and Seguin, M., 2007. Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytologist*, **173**: 335-345.

Le Guen, V., Lespinasse, D., Oliver, G., Rodier-Goud, M., Pinard, F., and Seguin, M., 2003. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**: 160-167.

Le Guen, V., Rodier-Goud, M., Troispoux, V., Xiong, T.-C., Brottier, P., Billot, C., and Seguin, M., 2004. Characterization of polymorphic microsatellite markers for *Microcyclus ulei*, causal agent of South American leaf blight of rubber trees. *Molecular Ecology Notes*, **4**(1): 122-124.

Lebowitz, R.J., Soller, M., and Beckmann, J.S., 1987. Trait-based analyses for the detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, **73**: 556-562.

Leconte, A., 1984. La reproduction sexuée de l'hévéa brasiliensis. *Caoutchoucs et plastiques*, **637-638**: 71-74.

Leconte, A., Lebrun, P., Nicolas, D., and Seguin, M., 1994. Electrophorèse. Application à l'identification clonale de l'hévéa. *Plantations, recherche, développement*, **1**: 28-36.

Lee, H., Dekkers, J.C.M., Soller, M., Malek, M., Fernando, R.L., and Rothschild, M.F., 2002. Application of the false discovery rate to quantitative trait loci interval mapping with multiple traits. *Genetics*, **161**: 905-914.

Lefèvre, F., Pichot, C., and Pinon, J., 1994. Intra- and interspecific inheritance of some components of the resistance to leaf rust (*Melampsora larici-populina* Kleb.) in poplars. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**(3-4): 501-507.

Lekawipat, N., Teerawatanasuk, K., Rodier-Goud, M., Seguin, M., Vanavichit, A., Toojinda, T., and Tragoonrung, S., 2003. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite markers. *Journal of Rubber Research*, **6**(1): 36-47.

Lemes, M.R., Gribel, R., Proctor, J., and Grattapaglia, D., 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae), across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, **12**: 2875-2883.

Lepinasse, D., 1999. Cartographie génétique de l'hévéa (*Hevea* spp) et déterminisme génétique de la résistance à *Microcyclus ulei*, champignon pathogène de l'hévéa. thesis Thesis, Université Montpellier II, 1-113 pp.

Lepinasse, D., Grivet, L., Troispoux, V., Rodier-Goud, M., Pinard, F., and Seguin, M., 2000. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**(6): 975-984.

Lepinasse, D., Rodier-Goud, M., Grivet, L., Leconte, A., Legnate, H., and Seguin, M., 2000. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**: 127-138.

Lewis, P.O., and Zaykin, D., 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

Lewontin, R.C., 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, **49**: 49-67.

Lewontin, R.C., 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, **120**: 849-852.

Lia, V.V., Bracco, M., Gottlieb, A.M., Poggio, L., and Confalonieri, V.A., 2007. Complex mutational patterns and size homoplasy at maize microsatellite loci. *Theoretical and Applied Genetics*, **115**: 981-991.

Lieberer, R., 2007. South American Leaf Blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. *Annals of Botany*, **100**(6): 1125-1142.

Lima, M.I.P.M., Gasparotto, L., Araujo, A.E., and Dos Santos, A.F., 1994. Caracterização fisiológica de um isolado de *Microcyclus ulei* virulento ao clone IAN 6158. *Fitopatologia Brasileira*, **19**: 216.

Lima, M.I.P.M., Gasparotto, L., Araujo, A.E., and Dos Santos, A.R., 1992. Surto do mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*) em seringal enxertado com copa do clone IAN 6158 em Manaus - AM. *Fitopatologia Brasileira*, **17**: 192-192.

Lins, A.C.R., Silva, G.P.d., and Nicolas, D., 1981. Report of the Acre team in joint IRRDB/Brazil germplasm expedition, Embrapa/CNPQSD, Manaus.

Liu, K., and Muse, S.V., 2005. PoweMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, **21**(9): 2128-2129.

Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Noli, E., and Tuberosa, R., 2005. Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Molecular Breeding*, **15**: 271-289.

Madden, L.V., and Wheelis, M., 2003. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. *Annual Review of Phytopathology*, **41**: 155-176.

Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**(2): 209-220.

Mattos, C.R.R., 1999. Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira*, **24**: 470.

Mattos, C.R.R., Garcia, D., Pinard, F., and Le Guen, V., 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira*, **28**(5): 502-507.

McDonald, B.A., and Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 349-379.

McDonald, B.A., and Linde, C., 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**: 163-180.

Mello, S.C.M., Santos, M.d.F., and Da Silva, J.B.T., 2006. *Dicyma pulvinata* isolates colonizing *Microcyclus ulei* stromata in rubber. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **41**(2): 359-363.

Mohlke, K., Lange, E.M., Valle, T.T., Ghosh, S., Magnuson, V.L., Silander, K., Watanabe, R.M., Chines, P.S., Bergman, R.N., Tuomilehto, J., Collins, F.S., and Boehnke, M., 2001. Linkage disequilibrium between microsatellite markers extends beyond 1 cM on chromosome 20 in Finns. *Genome Research*, **11**: 1221-1226.

Munafò, M.R., and Flint, J., 2004. Meta-analysis of genetic association studies. *Trends in Genetics*, **20**(9): 439-444.

Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.

Nei, M., and Li, W.-H., 1973. Linkage disequilibrium in subdivided populations. *Genetics*, **78**: 213-219.

Newcombe, G., 1998. Association of *Mmd1*, a major gene for resistance to *Melampsora medusae* f.sp. *deltoidae*, with quantitative traits in poplar rust. *Phytopathology*, **88**: 114-121.

Newcombe, G., Bradshaw, H.D.J., Chastagner, G.A., and Stettler, R.F., 1996. A major gene for resistance to *Melampsora medusae* f.sp. *deltoideae* in a hybrid poplar pedigree. *Phytopathology*, **86**(1): 87-94.

Nicolas, D., 1985. Acquisition of *Hevea* material derived from Colombian Schultes collections, International Rubber Conference 18-19 October 1985. IRRDB, Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 11.

Niks, R.E., and Rubiales, D., 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialised fungal pathogens. *Euphytica*, **124**: 201-216.

Olivier, J.M., and Lespinasse, Y., 1982. Résistance du pommier à la tavelure *Venturia inaequalis* (CKE.) Wint. : Sources de résistance, comportement du parasite, programme de sélection. *Cryptogamie, Mycologie*, **3**(4): 361-375.

Ong, S.H., Ghani, M.N., Tan, A.M., and Tan, H., 1983. New *Hevea* germplasm -its introduction and potential, Rubber Research Institute of Malaysia Planters' Conference, Kuala Lumpur, pp. 3-17.

Onokpise, O.U., 2004. Natural rubber, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., germplasm collection in the Amazon basin, Brazil: a retrospective. *Economic Botany*, **58**(4): 544-555.

Paiva, J.R.d., 1981. Coleta de material sexuado e assexuado nos seringais nativos do Estado de Mato Grosso., Embrapa/CNPDS, Manaus.

Parlevliet, J.E., 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, **17**: 203-222.

Parlevliet, J.E., 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, **124**: 147-156.

Peralta, A.M., Furtado, E.L., Amorim, L., Menten, J.O.M., and Bergamin Filho, A., 1990. Melhoramento para resistência ao mal das folhas da seringueira : revisão. *Summa Phytopathologica*, **16**(3-4): 214-224.

Perrier, X., Flori, A., and Bonnot, F., 2003. Data analysis methods. In: P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J.C. Glaszmann (Editors), *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Enfield, Science Publishers, Montpellier, pp. 43-76.

Perrier, X., and Jacquemoud-Collet, J.-P., 2006. Darwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>.

Pinheiro, F.S.V., Alves, R.M., and Conduru Neto, J.M.H., 1984. Herança da resistência ao *Microcyclus ulei* e perspectivas do melhoramento genético da seringueira. IV Seminário nacional da seringueira. EMBRAPA, Belém - Pará, pp. 1-15.

Pinon, J., 1995. Variabilité des rouilles du peuplier et évolution de leurs populations. Conséquences sur les stratégies de lutte. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, **81**(3): 99-109.

- Pinon, J., and Frey, P., 1997. Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *European Journal of Plant Pathology*, **103**(2): 159-173.
- Porter, D.M., and Taber, R.A., 1992. First report in Virginia of *Dicyma pulvinata* colonizing *Cercosporidium personatum*, the causal agent of Late Leaf Spot of peanut. *Plant Disease*, **76**: 1185.
- Prakash, C.S., and Heather, W.A., 1989. Inheritance of partial resistance to two races of leaf rust, *Melampsora medusae* in Eastern cottonwood, *Populus deltoides*. *Silvae Genetica*, **38**: 90-94.
- Prance, G.T., 1973. Phytogeographic support for the theory of Pleistocene forest refuges in the Amazon Basin, based on evidence from distribution patterns in Caryocaraceae, Chrysobalanaceae, Dichapetalaceae and Lecythidaceae. *Acta Amazonica*(3): 5-28.
- Prapan, K., Lekawipat, N., Weber, C., Rodier-Goud, M., Clément-Demange, A., and Seguin, M., 2006. Molecular genetic markers and rubber breeding in Thailand. 1 - Genetic mapping of the family RRIM600 x PB217 by use of microsatellite markers, In : The Second Thai-French Seminar "Rubber: From Tree to End-Products". Cirad, Bangkok, Thailand, pp. 10p.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**: 945-959.
- Priyadarshan, P.M., and Gonçalves, P.S., 2003. *Hevea* gene pool for breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **50**: 101-114.
- Purdy, L.H., and Schmidt, R.A., 1996. Status of cacao Witches' Broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, **34**: 573-594.
- Raboin, L.M., Selvi, A., Miranda Oliveira, K., Paulet, F., Calatayud, C., Zapater, M.-F., Brottier, P., Luzaran, R., Garsmeur, O., Carlier, J., and D'Hont, A., 2007. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. *Fungal Genetics and Biology*, **44**: 64-76.
- Rands, R.D., and Polhamus, L.G., 1955. Progress report on the cooperative *Hevea* rubber development in Latin America. Circular 976 U.S.D.A., U.S.D.A., Washington DC.
- Rattanawong, R., Prapan, K., Lekawipat, N., Teerawatanasuk, K., Kasemsap, P., Seguin, M., and Clément-Demange, A., 2008. QTLs detection for growth and initial latex production in rubber (*Hevea brasiliensis*), Irrdb Conference. Irrdb, Kuala Lumpur (Malaysia), pp. 28.
- Raymond, M., and Rousset, F., 1995. GENEPOP (Version 1.2) Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.
- Reghu, C.P., Abraham, S.T., Nair, R.B., and Varghese, Y.A., 2004. Performance of certain wild *Hevea* accessions in the early phase of further evaluation. *Natural Rubber Research*, **17**(2): 103-107.

- Reich, D.E., Cargill, M., Bolk, S., Ireland, J., Sabeti, P.C., Richter, J., Lavery, T., Kouyoumjian, R., Farhadian, S.F., Ward, R., and Lander, E.S., 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, **411**: 199-204.
- Reif, J.C., Hamrit, S., Heckenberger, M., Schipprack, W., Maurer, H.P., Bohn, M., and Melchinger, A., 2005. Trends in genetic diversity among European maize cultivars and their parental components during the past 50 years. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 838-845.
- Renard, J.L., 1999. Symptomatology et incidence économique. In: D. Mariau (Editor), *Les maladies des cultures pérennes tropicales*. Repères, Montpellier, pp. 19-75.
- Rhoné, B., Raquin, A.-L., and Goldringer, I., 2007. Strong linkage disequilibrium near the selected Yr17 resistance gene in a wheat experimental population. *Theoretical and Applied Genetics*, **114**: 787-802.
- Ribeiro do Vale, F.X., Parlevliet, J.E., and Zambolim, L., 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, **26**(3): 577-589.
- Ritter, E., Gebhardt, C., and Salamini, F., 1990. Estimation of recombination frequencies and construction of linkage maps from crosses between heterozygous parents. *Genetics*, **125**: 645-654.
- Rivano, F., 1992. La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa. Etude, en conditions naturelles et contrôlées, des composants de la résistance partielle à *Microcyclus ulei* (P. Henn.) . Arx. Thèse Thesis, Université de Paris-Sud, centre d'Orsay, 1-232 pp.
- Rivano, F., 1997. La maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa. I. Variabilité du pouvoir pathogène de *Microcyclus ulei*. *Plantations, recherche, développement*: 104-110.
- Rivas, G.-G., Zapater, M.-F., Abadie, C., and Carlier, J., 2004. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, **13**: 471-482.
- Rosenberg, N.A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**: 137-138.
- Roth Novick, R., Dick, C.W., Lemes, M.R., Navarro, C., Caccone, A., and Bermingham, E., 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **12**: 2885-2893.
- Rousset, F., 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**: 1219-1228.
- Sache, I., 2004. Introduction and dispersal of plant diseases in the tropics, International Workshop on SALB, 4th-6th May 2004, Itaparica, Bahia, Brazil.
- Saitou, N., and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4): 406-425.

Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Ghesquiere, A., and Notteghem, J.-L., 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **106**(5): 794-803.

Sambugaro, R., Furtado, E.L., Rodella, R.A., and Mattos, C.R.R., 2004. Anatomia foliar de seringueira (*Hevea* spp.) e desenvolvimento da infecção por *Microcyclus ulei*. *Summa Phytopathologica*, **30**(1): 51-56.

SAS Institute, 2001. SAS/STAT user's guide, version 8.02, Vol. I, II, III. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Schneider, R.W., Hollier, C.A., Whitam, H.K., Palm, M.E., McKemy, J.M., Hernández, J.R., Levy, L., and DeVries-Paterson, R., 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant Disease*, **89**(7): 774.

Schultes, R.E., 1990. A brief taxonomic view of the genus *Hevea*, Kuala Lumpur, 1-57 pp.

Seguin, M., Attard, A., and Bataillon, T., 2006. Analysis of linkage disequilibrium patterns in perennial or annual, autogamous or allogamous plant species. *Les Actes du BRG*: 57-74.

Seguin, M., Flori, A., Legnate, H., and Clément-Demange, A., 1999. L'hévéa. In: P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J.C. Glaszmann (Editors), *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*. Repères, Montpellier (France), pp. 241-269.

Seguin, M., Gay, C., Xiong, T.-C., and Rodier-Goud, M., 2001. Microsatellite markers for genome analysis of rubber tree (*Hevea* spp.). In: IRRDB (Editor), *IRRDB Symposium 2001*, Montpellier (France), pp. 1-6.

Seibert, R.J., 1947. A study of *Hevea* (with its economic aspects) in the Republic of Peru. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **34**: 261-353.

Semal, J., 1995. L'épopée du mildiou de la pomme de terre (1845-1995). *Cahiers Agriculture*, **4**: 287-298.

Sériér, J.-B., 2000. *Les Barons du caoutchouc*. Ed: Cirad-Karthala, 195 pp.

Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R., and Pirone, T.P., 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, **30**: 47-66.

Simko, I., Costanzo, S., Haynes, K.G., Christ, B.J., and Jones, R.W., 2004. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**(2): 217 - 224.

Simko, I., Haynes, K.G., and Jones, R.W., 2006. Assessment of linkage disequilibrium in potato genome with single nucleotide polymorphism markers. *Genetics*, **173**: 2237-2245.

Stahl, E.A., and Bishop, J.G., 2000. Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current Opinion in Plant Biology*, **2000**(3): 299-304.

Stephens, M., Smith, N.J., and Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, **68**: 978-989.

Stich, B., Maurer, H.P., Melchinger, A.E., Frisch, M., Heckenberger, M., van der Voort, J.R., Peleman, J., Sorensen, A.P., and Reif, J.C., 2006. Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers. *Molecular Breeding*, **17**: 217-226.

Tabor, G.M., Kubisiak, T.L., Klopfenstein, N.B., Hall, R.B., and Mac Nabb, H.S.J., 2000. Bulk segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides*. *Phytopathology*, **90**(9): 1039-1042.

Talukder, Z.I., Tharreau, D., and Price, A.H., 2004. Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Phytologist*, **162**(1): 197-209.

Tavares, E.T., Tigano, M.S., Mello, S.C.M., Martins, I., and Cordeiro, C.M.T., 2004. Molecular characterization of Brazilian *Dicyma pulvinata* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, **29**(2): 148-154.

Templeton, A.R., Shaw, K., Routman, E., and Davis, S.K., 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **77**(1): 13-27.

Tenesa, A., Knott, S.A., Ward, D., Smith, D., Williams, J.L., and Visscher, P.M., 2003. Estimation of linkage disequilibrium in a sample of the United Kingdom dairy cattle population using unphased genotypes. *Journal of Animal Sciences*, **81**: 617-623.

Thévenon, S., Dayo, G.K., Sylla, S., Sidibe, I., Berthier, D., Legros, H., Boichard, D., Eggen, A., and Gautier, M., 2007. The extent of linkage disequilibrium in a large cattle population of western Africa and its consequences for association studies. *Genetics*, **38**: 277-286.

Townsend, C.H.T., 1960. Progress in developing superior hevea clones in Brazil. *Economic Botany*, **14**(3): 189-196.

Ule, E., 1905. Kautschukgewinnung und Kautschuckhandel am Amazonen-strome. *Tropenpflanzer- Beihefte*, **6**: 1-71.

Upadhyaya, H.D., Furman, B.J., Diwedi, S.L., Udupa, S.M., Gowda, C.L.L., Baum, M., Crouch, J.H., Buhariwalla, H.K., and Singh, S., 2006. Development of a composite collection for mining germplasm possessing allelic variation for beneficial traits in chickpea. *Plant Genetic Resources*, **4**(1): 13-19.

Van der Hammen, T., 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography*, **1**: 3-26.

Van Ooijen, J.W., 1999. LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity*, **83**: 613-624.

Van Ooijen, J.W., 2004. MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma, B.V., Wageningen, Netherlands.

- Van Ooijen, J.W., and Voorrips, R.E., 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Reserach International, Wageningen, the Netherlands.
- Van Valen, L.M., 1973. A new evolutionary law. *Evolutional Theory*, **1**: 1-30.
- Vanderplank, J.E., 1963. Plant diseases: epidemics and control. Academic Press, New York, 349 pp.
- Vanderplank, J.E., 1975. Principles of plant infection. Academic Press, New York, USA.
- Varshney, R.K., Graner, A., and Sorrells, M.E., 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in plant science*, **10**(12): 621-630.
- Veiga, F.M., 1972. Smut in Brazil. *Sugarcane Pathogists' newsletter*, **9**(25): 17.
- Villar, M., Lefèvre, F., Bradshaw, H.D.J., and Teissier du Cros, E., 1996. Molecular genetics of rust resistance in poplars (*Melampsora larici-populina* Kleb/*Populus sp.*) by bulk segregant analysis in a 2x2 factorial mating design. *Genetics*, **143**(1): 531-536.
- Webster, C.C., and Baulkwill, W.J., 1989. Rubber. Tropical agriculture series. Longman Singapore Publishers Ltd, 614 pp.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C., 1979. Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity*, **42**(1): 105-111.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**(6): 1358-1370.
- Whitmore, T.C., and Prance, G.T., 1987. Biogeography and quaternary history in tropical America. Oxford University Press, New York.
- Yeang, H.Y., 2007. Synchronous flowering of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) induced by high solar radiation intensity. *New Phytologist*, **175**: 283-289.
- Yeang, H.Y., and Chevallier, M.H., 1992. Estimation of pollen dispersal distances in *Hevea brasiliensis* by esterase isoenzyme markers. Seminar Biotecknologi Kebangsaan KE-IV Hyatt Saujana, Subang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia 25-26 november 1992, pp. 73-74.
- Yin, T.M., DiFazio, S.P., Gunter, L.E., Jawdy, S.S., Boerjan, W., and Tuskan, G.A., 2004. Genetic and physical mapping of *Melampsora* rust resistance genes in *Populus* and characterization of linkage disequilibrium and flanking genomic sequence. *New Phytologist*, **164**: 95-105.
- Young, A., Boyle, T., and Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**(10): 413-418.
- Zhao, H., Nettleton, D., Soller, M., and Dekkers, J.C.M., 2005. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genetics Research*, **86**: 77-87.

**Diversity of genetic resistance to South American Leaf Blight of rubber tree (*Microcyclus ulei*) assessed by QTL mapping and association genetics within natural populations.**

**Abstract**

South American Leaf Blight (SALB) caused by the fungus *Microcyclus ulei* is a serious threat to worldwide rubber tree cultivation and also responsible for the poor development of this culture in South and Central America. The breeding of resistant cultivars is considered as the best way to anticipate an accidental introduction of SALB in disease free countries and to develop rubber tree cultivation in diseased areas. The main resistance source described until now proved to be ineffective against the most aggressive fungus isolates. Another resistance source identified in a Peruvian cultivar holds for more than thirty years in high infestation conditions. Genetic mapping carried out on the progeny of a cross between this cultivar and a susceptible one revealed two major resistance genes, one located on linkage group g15 and effective against *M. ulei* isolates from French Guiana, and the other one on linkage group g13 effective against isolates from Bahia state (Brazil). Diversity analysis in South-West Amazonian natural populations shows populations structured in three main clusters corresponding to the Brazilian states of Acre, Rondônia and Mato Grosso. The Madre de Dios population in Peru is part of the Acre genetic cluster. Differentiation among populations is mainly explained by isolation by distance and secondarily by the existence of hydrographical basins. The linkage disequilibrium between linked neutral genetic markers is wider in Acre cluster than in Rondônia cluster, but remains low in both cases. A genetic association with the SALB resistant trait is detected with a microsatellite marker located close to the major resistance gene in linkage group g15. Another association is also detected in a genomic area where no resistant locus was expected until now. Importance of these results for breeding of new SALB resistant cultivars is discussed.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*, *Microcyclus ulei*, SALB, genetic mapping, QTL, microsatellites, populations structure, linkage disequilibrium, association genetics

## Résumé

Menace potentielle pour l'hévéaculture mondiale, la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa provoquée par le champignon *Microcyclus ulei* est aussi responsable du faible développement de cette culture en Amérique latine. La sélection de variétés résistantes est privilégiée pour anticiper une apparition accidentelle de la maladie dans les pays encore épargnés et pour développer la culture de l'hévéa dans les zones infestées. La principale source de résistance décrite jusqu'à présent n'est pas fonctionnelle face à des isolats très agressifs du champignon. Une autre source de résistance identifiée chez un cultivar originaire du Pérou se maintient depuis plus de trente ans en conditions de forte infestation. La cartographie génétique réalisée sur la descendance de ce cultivar en croisement révèle l'existence de deux gènes majeurs de résistance, l'un situé sur le groupe de liaison g15 et efficace contre les isolats de Guyane et l'autre sur le groupe de liaison g13 efficace vis-à-vis des isolats de l'état de Bahia. L'analyse de la diversité des populations naturelles du sud-ouest Amazonien fait apparaître une structure en trois groupes principaux recouvrant les états brésiliens de l'Acre, du Rondônia et du Mato Grosso. La population Madre de Dios au Pérou est rattachée au groupe de l'Acre. La différenciation entre les populations est expliquée principalement par l'isolement par la distance et secondairement par l'existence de bassins hydrographiques. Le déséquilibre de liaison entre marqueurs liés est plus étendu dans le groupe Acre que dans le groupe Rondônia, mais reste faible dans les deux cas. Une association avec le caractère de résistance à *M. ulei* est détectée avec un marqueur microsatellite situé à proximité du gène majeur de résistance du groupe de liaison g15. Une autre association est détectée dans une portion du génome où aucun locus de résistance n'était identifié jusqu'à présent. L'importance de ces résultats pour la sélection de nouveaux cultivars résistants à *M. ulei* est discutée.

**Mots clés:** *Hevea brasiliensis*, *Microcyclus ulei*, SALB, cartographie génétique, QTL, microsatellites, structure des populations, déséquilibre de liaison, génétique d'association