

F (CO. D. LAZUTS)

CIRAD-CP
Programme hévéa

Rapport de mission en Thaïlande

Rubber Research Institute of Thailand (RRIT-DOA)

Kasetsart University

Du 29 mai 2001 au 11 juin 2001

Marc SEGUIN

Calendrier

29/05 : Arrivée à Bangkok

30/05 : Réunion à la direction du RRIT (Bangkok, Banken) : Dr Jirakorn, Dr Prasat, M. Clément-Demange, Dr Gohet, Dr Seguin

31/05 : Réunion à Kasetsart (Kampangsen) : Dr Apichart, Dr Somvong Dr Theerayut, M. Clément Demange, Dr Gohet, Dr Seguin

01/06 : Réunion de travail au CRRC (Chachoengsao Rubber Research Center of RRIT) : Mme Kannikar, Mme Kanlaya, M. Clément-Demange, Dr Seguin

04/06 : Arrivée à Bangkok du Dr Sainte-Beuve, chef du programme Hévéa-Cirad, et rencontre avec les responsables du RRIT (matin) et de Kasetsart University (après-midi).

05/06 : Réunion de travail de l'équipe Cirad et préparation du séminaire.

06-07/06 : Séminaire de restitution de fin de la première phase du projet DORAS – Rubber. Communication du Dr Seguin le 06/06.

08/06 : Visite au CRRC d'une délégation de Kasetsart University : Dr Sornprach, Mle Unakorn, Mmes Kannikar, Kanlaya, Somjintana, M Chamnong (dir. CRRC)

Personnes rencontrées

RRIT-DOA Bangkok :

Dr Prasat Kesawapitak, directeur du RRIT-DOA

Dr Jirakorn Kosaisawe : coordinateur pour le projet DORAS-Rubber

RRIT-CRRC :

M. Chamnong Kongsin, directeur du CRRC

Mme Kannikar Teerawatanasuk, responsable du programme d'amélioration génétique

Mme Kanlaya Prapan, sélectionneur

Mme Somjintana Promson, généticienne

Kasetsart University :

Dr Sornprach Thanisawanyangkura, coordinateur pour le projet DORAD-Rubber

Dr Apichart Vanavichit, directeur du DNA fingerprint laboratory

Dr Somvong Tragoonrung, biologiste moléculaire

Dr Theerayut Toozinda, biologiste moléculaire

Contenu de la mission

Cette mission réalisée, grâce à un financement de l'ambassade de France en Thaïlande, venait en appui au projet "DORAS - Rubber productivity in Thailand –1998-2001" associant le Cirad, le Rubber Research Institute of Thailand (RRIT) et Kasetsart University (KU). Mon implication dans ce projet concernait le volet "Genome mapping" (les 2 autres volets étant "Ecophysiology" et "Genetic Engineering") dont l'objectif est le génotypage moléculaire d'une descendance issue de croisements contrôlés, pour réaliser le marquage de gènes limitant du rendement en latex.

Cette mission avait 4 objectifs :

- 1- Communication au séminaire de restitution de fin de la première phase de 3 ans du projet (1998-2001) : ma communication a fait le bilan des travaux sur 1- l'obtention d'une descendance en ségrégation de grande taille au RRIT et 2- le développement par l'équipe Cirad de marqueurs PCR pour la cartographie génétique (Genome mapping) de cette descendance (voir résumé en annexe 2. Il s'agissait de la seule communication concernant le volet "Genome mapping".
- 2- Préparer avec les collègues et responsables du RRIT, la réponse à l'appel d'offre "Agropolis platform 2001". Il s'agissait d'organiser avec le RRIT la venue à Montpellier (labo Biotrop/Cirad) d'un chercheur du RRIT pour la poursuite des travaux de cartographie génétique et de définir le programme de travail (voir résumé du projet en annexe 2).
- 3- Réunions de travail avec les collègues du RRIT (Mmes Kannikar et Kanlaya) sur le dispositif d'évaluation agronomique de la descendance en ségrégation et sur la mise au champ de l'essai prévue pour le printemps 2002.
- 4- Rencontre avec l'équipe du "DNA fingerprint lab" de Kasetsart-Kampaengsen (Dr Apichart, Dr Somvong). Cette équipe était initialement affichée comme partenaire du volet "Genome mapping". Au cours de ces 3 premières années de projet, il s'est avéré que cette équipe était intervenue dans la formation doctorale de 2 chercheurs du RRIT mais sur des sujets non directement liés à la cartographie génétique (diversité du germplasm *Hevea* et clonage de gène d'un pathogène de l'hévéa -*Corynespora*). Les Dr Apichart et Somvong n'ont pas participé au séminaire de restitution de fin de projet, confirmant leur désengagement du volet "Genome mapping".

La non implication de l'équipe Kasetsart-Kampangsaen n'a pas remis en cause le programme de travail du volet "Genome mapping". Le développement des marqueurs PCR de type microsatellites a été réalisé comme prévu : à partir d'une banque spécifique obtenue antérieurement au Cirad, 177 sondes d'hévéa, séquencées sur financement du Génoscope (Evry, France) ont été mises à disposition du projet par le Cirad ; ces séquences ont permis d'identifier 110 marqueurs PCR - microsatellites polymorphes entre les parents de la descendance en ségrégation (RRIM600 et PB217). Le facteur limitant pour la mise en place du programme de travail a été la création du matériel végétal, l'obtention d'une grande descendance légitime étant une opération laborieuse chez l'hévéa. Le RRIT a néanmoins réussi à obtenir ce matériel végétal (500 descendants issus du croisement RRIM600xPB217, survivant en juin 2001) à l'issue de cette première période de 3 ans (1998-2001).

L'obtention de ces ressources moléculaires (marqueurs microsatellites) et biologiques (descendance en ségrégation) permet la poursuite du projet "Genome mapping" pour une nouvelle phase de 3 ans (2001-2004) et associant le Cirad et le RRIT. Ce projet prévoit notamment l'accueil et la formation de 2 chercheurs du RRIT au Cirad-Montpellier, dans l'équipe de M. Seguin : 1- Mle Napawan Lekawipat, 6 semaines en septembre – octobre 2001, sur financement ambassade de France ; 2- Mme Kanlaya Prapan pour une durée d'1 an, dépendant de l'obtention d'un financement "Plate forme -Agropolis" (appel d'offre juin 2001).

Annexe 1 :

**Communication de Marc Seguin au séminaire de fin de projet DORAS-Rubber
« Towards the improvement of the rubber tree productivity » 1998-2001**

6-8 juin 2001, Kasetsart University, Bangkok

Identification of additional microsatellite markers for PCR based genome mapping in rubber tree

Marc Seguin^{1,2}, Saisunee Adunsadthapong¹, Marguerite Rodier-Goud², Kannikar Teeratanasuk³

¹ KAPI, Kasetsart University, Bangkok

² BIOTROP laboratory, CIRAD, Montpellier

³ CRRC, Rubber Research Institute of Thailand, Chachoengsao

Abstract :

In the frame of the CIRAD/KU/RRIT agreement, the aim of the “Genome mapping” sub-project, was to apply genetic mapping strategy for the identification of genes (or QTLs for Quantitative Traits Loci) underlying LD (Latex Diagnosis) parameters. Indeed, Sucrose and Inorganic Phosphorus contents have been identified as components of the genetic variance of latex yield in rubber tree.

CIRAD has successfully developed genome mapping of rubber tree (*Hevea* spp.), for genetic analysis of the South American Leaf Blight disease resistances. This work led to the publication of the first genetic map of rubber tree. The map encompasses 717 Molecular Genetic Markers (MGMs), clustered in 18 linkage groups corresponding to the 18 chromosome pairs of the diploid *Hevea* genome. This map was built using a segregating progeny (segregating or mapping population) from the controlled cross between the two parents PB260 – a cultivated Wickham clone- and RO38- a wild clone from Brazil).

Availability of an accurate large segregating population is the first prerequisite for the development of genome mapping project. For that purpose, RRIT created, during the pollination campaigns of 1999 and 2000, 6 different progenies by controlled crosses between 6 Wickham clones. One of these crosses, RRIM600xPB217, was retained as segregating population for the current project under 3 criterions : 1- expected segregation of LD parameters, 2- genetic distance between parents, and 3- expected availability of 200 legitimate progenies in order to perform accurate segregation, mapping and QTL analyses.

The second prerequisite for genome mapping is the availability of a large number of MGMs. In the frame of the Rubber project in Thailand, it was proposed to develop PCR (Polymerase Chain Reaction) based genetic map. PCR (Polymerase Chain Reaction) is a powerful technique of DNA amplification authorizing simplification of laboratory protocols. For instance, it was proposed to continue the development of microsatellite markers, a kind of highly variable (polymorphic), locus (i.e. gene) specific markers.

The CIRAD reference map of rubber tree encompasses 35 microsatellite loci and it was proposed to set up hundreds of additional microsatellites. For that purpose, CIRAD created, in 1998, specific DNA libraries enriched in microsatellite sequences. The nucleotide sequence (genetic code) was determined for 288 DNA clones containing a microsatellite motif. Due to the medium quality of DNA libraries and of DNA sequencing, only 151 microsatellites appeared to be suitable for PCR marker identification. Marker identification consisted for each of the 151 sequences to realize 1- computer aided design of specific PCR primer pairs flanking the microsatellite sequence, 2- test of the primer for specific, efficient DNA amplification by PCR, and 3- test for the ability to reveal, by DNA electrophoresis, genetic polymorphism between progenitors of the mapping populations. Primer pairs were screened on DNA samples from the four parents: PB260, RO38, RRIM600 and PB217.

Finally, 90 additional microsatellite markers were identified on the reference progeny (PB260xRO38), among them , about 70 are expected to segregate on the RRIM600xPB217 population. Segregation of the markers has to

be confirmed on a sample of progenies, which were lacking during marker screening. Taking into account the previously mapped microsatellites, a set of about 100 microsatellite markers is currently available for genome mapping on the RRIM600xPB217 population. Even if this number is lower than expected, it is sufficient to initiate the establishment of an microsatellite-anchored map on the RRIM600xPB217 population.

Though, the genome mapping work has to be continued with the following immediate objectives: 1- test of the legitimacy of the RRIM600xPB217 progenies by paternity testing using 7 to 10 microsatellite markers; 2- random selection of 200 of the legitimate progenies to constitute the mapping population; 3- grafting of these 200 progenies in a Small Scale Trial at the Chachoengsao Research Center of RRIT; 4- map the 100 existing microsatellites on this population by genotyping the 200 progenies. Secondly, it is planed to saturate the microsatellite frame map with complementary PCR marker technique such as AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) among others. Phenotypic evaluation of the progenies – i.e. LD measurements - will begin 2 years after grafting.

Annexe 2 :

**Projet "Genmap" soumis à l'appel d'offre "Agropolis platform" – Juin 2001
Collaboration Cirad - RRIT/DOA**

A. Clément-Demange et M. Seguin

Déterminisme génétique et localisation de composantes physiologiques de la productivité de l'hévéaculture par approche QTL en Thaïlande. Réalisation d'une carte génétique ancrée sur marqueurs microsatellites.

Résumé :

L'hévéaculture assure à la fois une fonction de production agricole (caoutchouc naturel et bois d'hévéa) et une fonction écologique (protection des sols, réhabilitation de parcelles pauvres, reforestation, économie de carbone fossile, séquestration de carbone atmosphérique dans le bois et dans le caoutchouc), le plus souvent sur de petites plantations paysannes à caractère familial. La Thaïlande, premier producteur mondial de caoutchouc naturel, cherche à améliorer ces deux fonctions par une recherche combinant l'amélioration génétique et la connaissance physiologique du fonctionnement de l'arbre et des parcelles. Une typologie métabolique des clones d'hévéa a été mise en évidence et on a émis l'hypothèse d'une complémentarité entre les clones opposés dans cette typologie. Un croisement modèle (RRIM600xPB217) a été réalisé pour tester cette hypothèse, et 200 génotypes de ce croisement seront évalués en champ en Thaïlande pour une étude très large qui portera, au cours des dix années à venir, sur les caractéristiques architecturales conditionnant la production de bois, sur des critères éco-physiologiques associés à l'adaptation au milieu, sur les facteurs biochimiques déterminant les types métaboliques de la production de latex, et sur des caractères de qualité du caoutchouc naturel produit. Les nouveaux outils de la génomique tels que les marqueurs génétiques moléculaires et la méthodologie de cartographie génétique permettent aujourd'hui de décomposer génétiquement ces caractères phénotypiques et de localiser les composantes obtenues sur une carte génétique, ouvrant ainsi la voie à la compréhension des caractères en question et à une sélection très précoce de ces composantes (sélection assistée par marqueurs). Cette méthodologie a déjà été appliquée à l'hévéa dans un laboratoire du Cirad à Agropolis (avec deux publications dans *Theoretical and Applied Genetics* : Lespinasse et al. : Vol. 100 (1) : 127-138, et Vol. 100 (6) : 975-984). Les marqueurs de type microsatellite présentent des performances particulièrement intéressantes pour la réalisation de telles cartes.

Ce projet de cartographie de marqueurs microsatellites sur la descendance RRIM600xPB217 obtenue au RRIT, a été soumis à l'appel d'offre lancé par Agropolis (Montpellier) en juin 2001. Un financement a été demandé pour couvrir les frais de voyage et d'accueil d'un chercheur du RRIT au Cirad – Montpellier (laboratoire Biotrop) pour une durée d'un an. L'intérêt de faire venir à Montpellier un chercheur du RRIT est d'impliquer directement le partenaire dans la partie biotechnologique du projet, tout en profitant des infrastructures et équipements existant à Agropolis (laboratoires et expertise Cirad et plates-formes de la Génopole – Montpellier), alors que ce type de laboratoire manque en Thaïlande. La direction du RRIT a identifié Ms Kanlaya Prapan comme candidate pour ce projet.

Les objectifs de recherche pour les 12 mois du projet "Genmap" – Agropolis porte sur 3 points :

- 1- identification de marqueurs microsatellites polymorphes : à partir de séquences d'ADN et d'amorces PCR d'hévéa produites par l'équipe Cirad en 2001 – 2002
- 2- cartographie des marqueurs polymorphes sur une population de 200 à 300 descendants de RRIM600xPB217
- 3- Mise au point du marquage moléculaire (par microsatellites) en séquenceur automatique (Plate-forme "génotypage" de la Génopole – Montpellier)

Le résultat attendu est l'obtention d'une carte de 150 à 300 marqueurs microsatellite sur cette descendance.

En préliminaire à ce projet (période : décembre 2001 – décembre 2002), un stage d'un mois en septembre – octobre 2001, également au laboratoire Biotrop du Cirad à Montpellier, de 2 chercheurs du RRIT, doit permettre d'identifier et sélectionner la légitimité de 200 à 300 descendants utilisables pour la cartographie génétique les 2 chercheurs sont Ms Kanlaya Prapan (voyage et stage sur financement Cirad) et Ms Napawan Lekawipat (sur financement Ambassade de France en Thaïlande).