

Diversité de *Vanilla planifolia* dans l'Océan Indien et de ses espèces apparentées : aspects génétiques, cytogénétiques et épigénétiques

Séverine BORY

Thèse de Doctorat
Spécialité : Génétique
17 décembre 2007

UMR Peuplements Végétaux et Bio-Agresseurs en Milieu Tropical



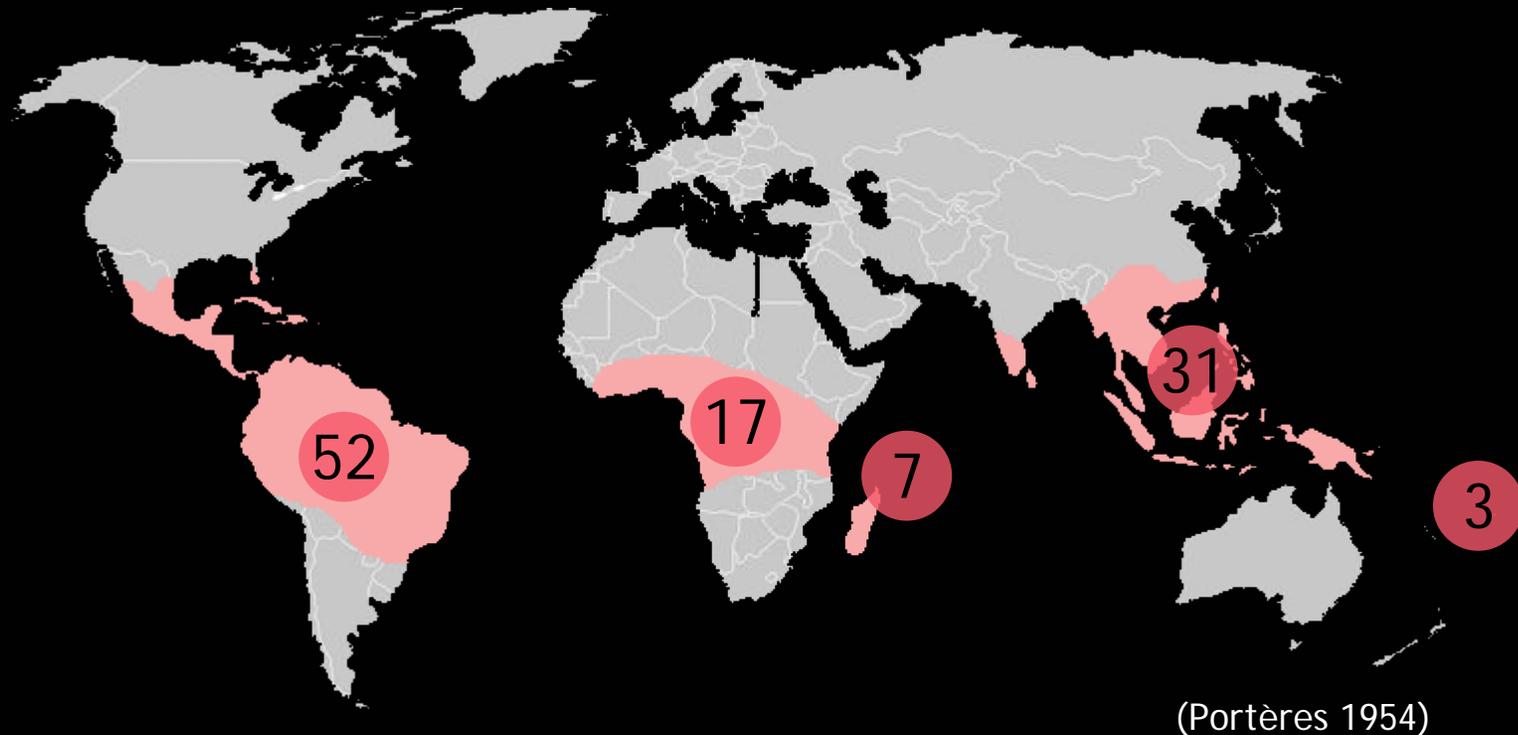
Introduction

Modèle d'étude et problématique



Le genre *Vanilla* Plumier ex Miller

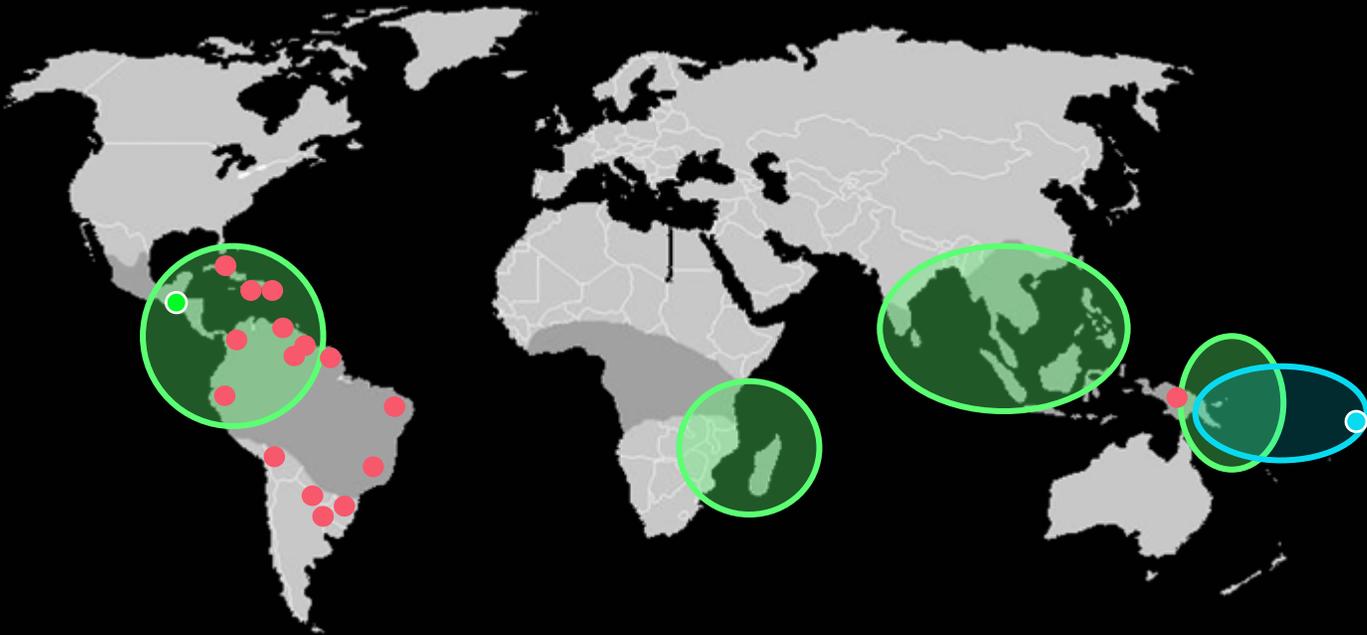
- ✓ Orchidaceae > Vanilloideae > Vanilleae > Vanillinae
- ✓ 90-110 espèces
- ✓ Répartition inter-tropicale





Les vanilliers cultivés

- ✓ 18-35 espèces aromatiques ●
- ✓ 2 espèces principalement cultivées
 - *V. planifolia* G. Jackson (95%) 'Vanille Bourbon'
 - *V. tahitensis* J.W. Moore (< 5%) 'Vanille de Tahiti'



- ✓ Quelques autres espèces utilisées localement sans importance économique (*V. pompona* Schiede, *V. odorata* C. Presl....)





Morphologie de *V. planifolia*





Production mondiale

- ✓ Epice mondialement appréciée comme arôme/parfum
 - Industrie agro-alimentaire
 - Parfumerie, cosmétique
- ✓ 1300 t en 2005, Madagascar > 50%
- ✓ Intérêt de la vanille naturelle
 - Arôme complexe, inimitable
 - Culture respectueuse de l'environnement
 - Source d'emploi
- ✓ Amélioration de la production
 - Conditions de culture et de transformation
 - Meilleure connaissance des espèces (pools génétiques)



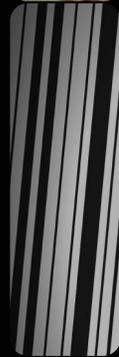


Pools génétiques

- ✓ Pool de gènes primaire de *V. planifolia* (cultivée et sauvage) fortement menacé (Mexique)
- ✓ Pool de gènes secondaire (espèces proches de *V. planifolia*)
 - > Source de caractères agronomiques et aromatiques

➡ Préservation des ressources génétiques

- ✓ Conservation *in situ* non viable (forte pression humaine)
- ✓ Conservation *ex situ* : meilleure stratégie
 - > Efforts de conservation mondiaux





Pools génétiques

- ✓ Collection des ressources génétiques du vanillier CIRAD La Réunion (2003)
 - Matériel CIRAD
 - Prospections
 - Échanges

- ✓ 581 accessions (35 espèces)



- ✓ Caractériser - sauvegarder - améliorer - diffuser

➡ Description de la diversité génétique

➡ Modèle *V. planifolia* de La Réunion





Objectif de la thèse

Expliquer les variations phénotypiques chez les *V. planifolia* de La Réunion



- reproduction végétative quasi-exclusive
- absence de pollinisateurs naturels





Diversité phénotypique à La Réunion



'Classique'





Diversité phénotypique à La Réunion



'Mexique'





Diversité phénotypique à La Réunion

'Aiguille'





Diversité phénotypique à La Réunion

'Stérile'



Avortement d'une fleur auto-fécondée



Gousses issues d'allo-fécondation





Diversité phénotypique à La Réunion

'Grosse Vanille'





Diversité phénotypique à La Réunion

'Variegata'



Reproduction de *V. planifolia*

➔ Multiplication végétative prédominante

- ✓ En conditions naturelles (zone d'origine) :
 - Allogamie / autogamie
 - Pollinisateurs supposés : *Eulaema*, *Euglossa*
 - Hybridations naturelles inter-spécifiques
 - Reproduction sexuée naturelle rarement observée : 1-3%
 - Reproduction végétative : 1 individu > 0.2 ha
- ✓ Dans les zones d'introduction :
 - Pollinisateurs absents
 - Fécondation manuelle indispensable





Objectif de la thèse

Processus à l'origine des variations phénotypiques chez les *V. planifolia* de La Réunion sachant que la reproduction végétative est quasi-exclusive



- > Etude comparative avec *V. tahitensis* (cultivée) et *V. pompona*, *V. bahiana* Hoehne (spontanées)





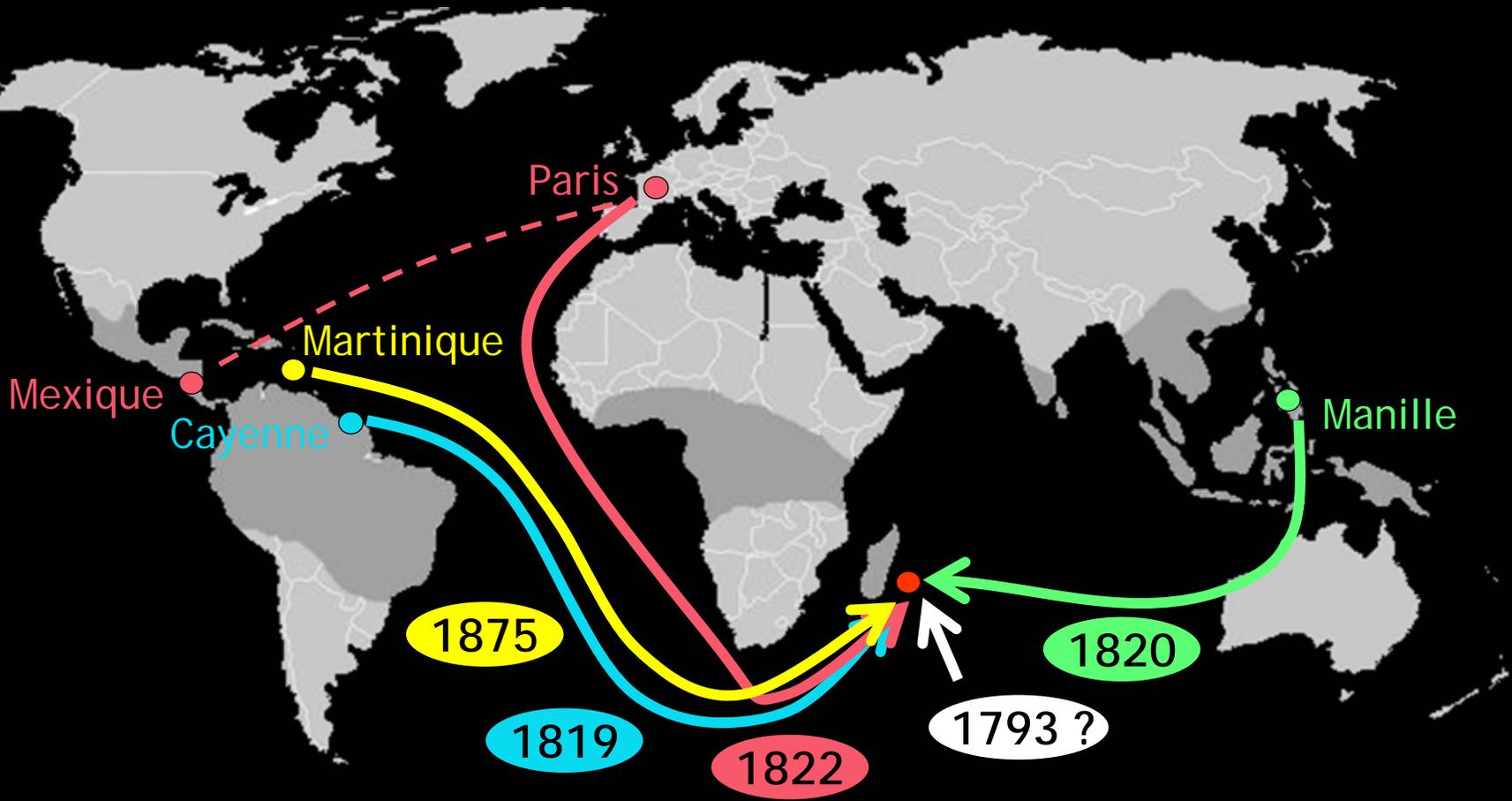
Hypothèses de travail

- ✓ H1 : Introductions de matériels différents ?





Origine de la culture réunionnaise





Hypothèses de travail

- ✓ H1 : Introductions de matériels différents ?
- ✓ H2 : Rôle possible de la reproduction sexuée ?
- ✓ H3 : Accumulation de mutations somatiques ?

ANALYSE GÉNÉTIQUE

- ✓ H4 : Polyploidisation ?

ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE

- ✓ H5 : Variations de méthylation ?

ANALYSE ÉPIGÉNÉTIQUE



Diversité génétique

Processus génétiques à l'origine de
la diversification
des vanilliers





Objectifs

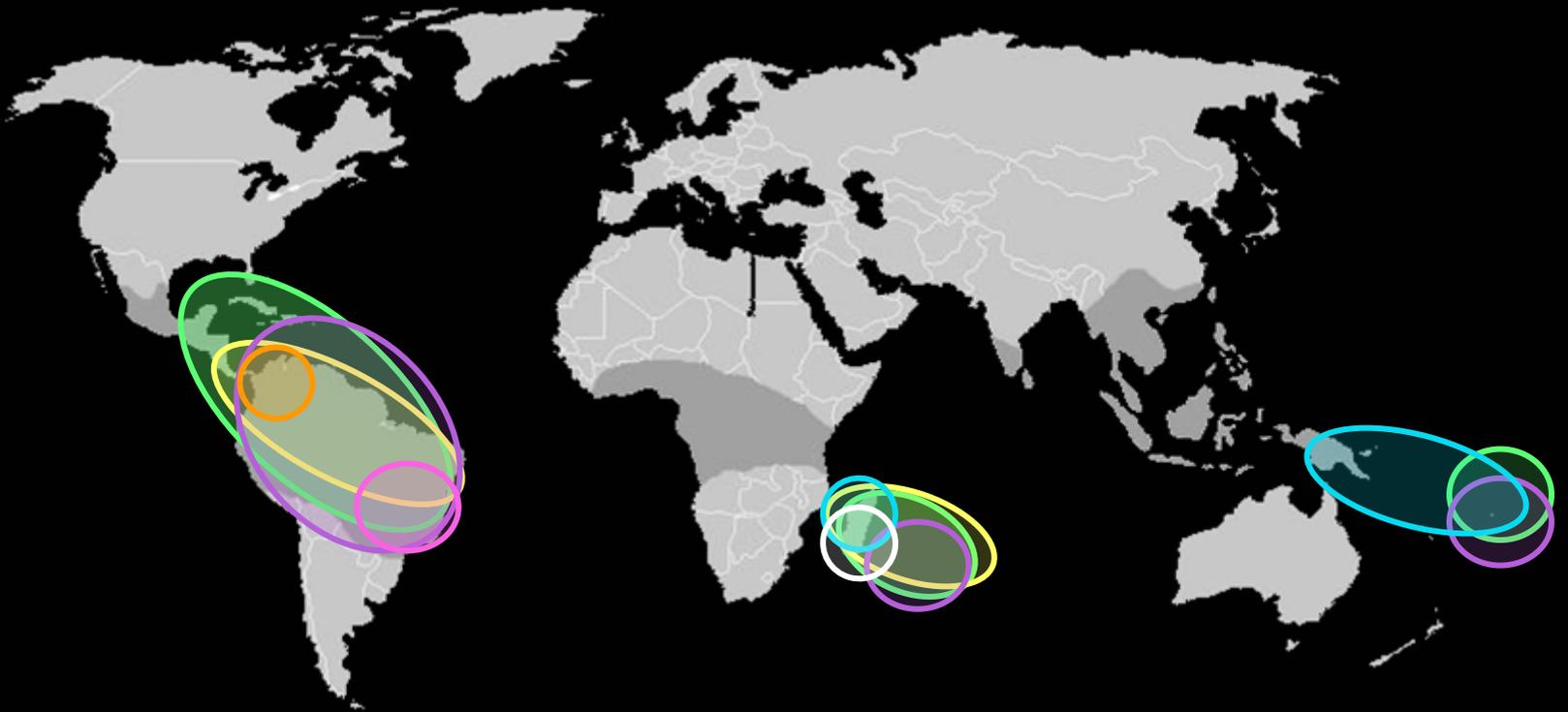
- ✓ Analyse des schémas d'introduction et de diversification de *V. planifolia* à La Réunion
- ✓ Comparaison avec les schémas d'introduction des autres aires de culture (Océan Indien, Polynésie, Antilles)
- ✓ Comparaison avec les niveaux de diversité des espèces américaines cultivée (*V. tahitensis*) et spontanées (*V. pompona*, *V. bahiana*)





Matériel et méthodes

<i>V. planifolia</i>	289	<i>V. pompona</i>	21
<i>V. bahiana</i>	16	<i>V. tahitensis</i>	11
<i>V. odorata</i>	1	<i>V. hybrides</i>	6
<i>V. sp.</i>	31	TOTAL	375



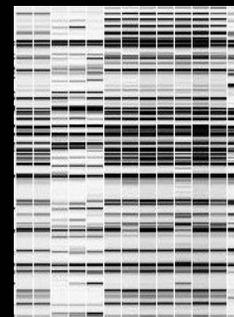


Matériel et méthodes

<i>V. planifolia</i>	289	<i>V. pompona</i>	21
<i>V. bahiana</i>	16	<i>V. tahitensis</i>	11
<i>V. odorata</i>	1	<i>V. hybrides</i>	6
<i>V. sp.</i>	31	TOTAL	375

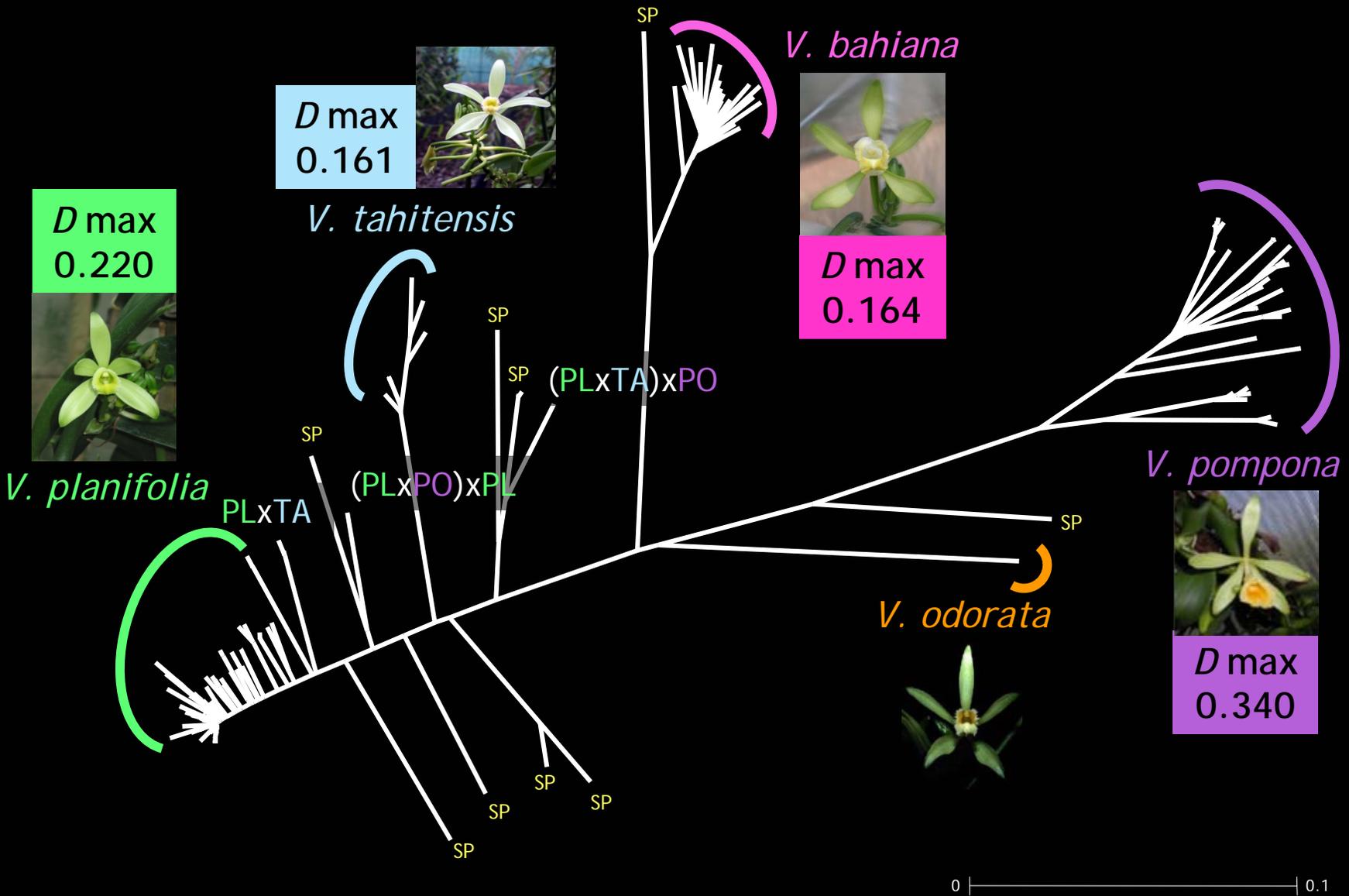
✓ AFLP

- Analyse intra-spécifique
- Analyse inter-spécifique (espèces proches)
- Neutres, dominants
- Large couverture du génome
- Nombreux marqueurs révélés





Diversité inter-spécifique



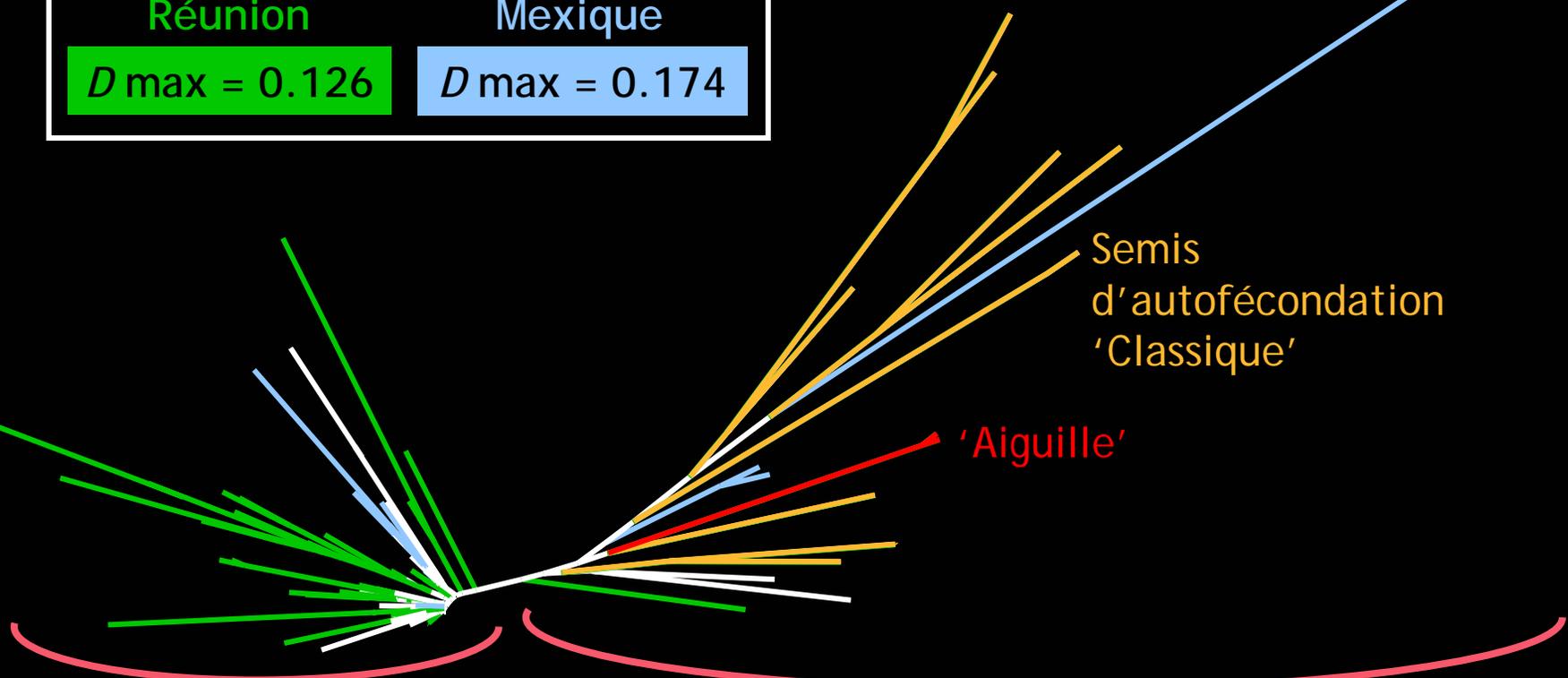
375 accessions, 942 marqueurs AFLP, Indice Sokal et Michener, NJ





Diversité intra-spécifique *V. planifolia*

Réunion	Mexique
$D_{max} = 0.126$	$D_{max} = 0.174$



284 accessions =
101 génotypes

$D_{max} = 0.106$
 $D_{mean} = 0.011$

19 accessions

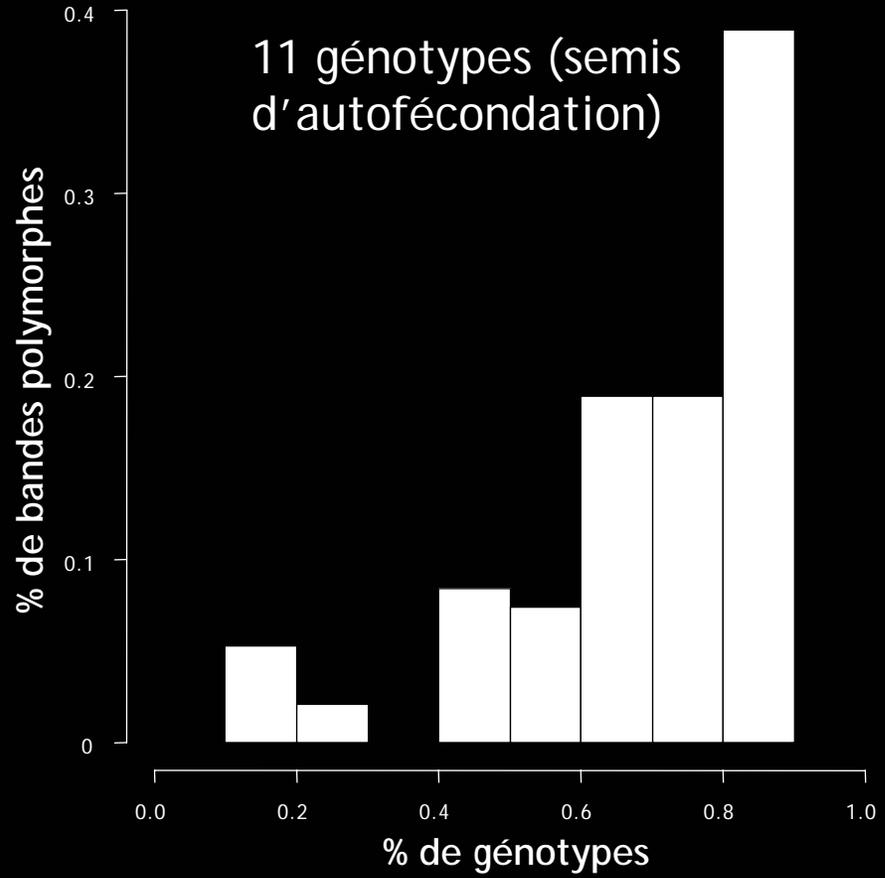
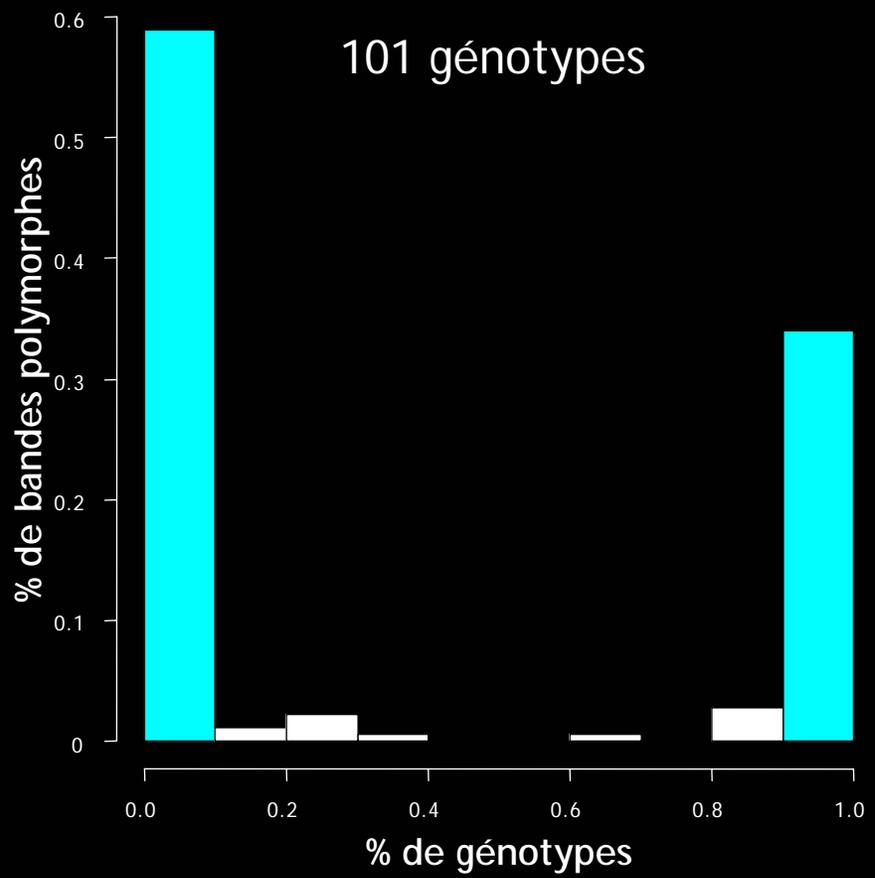
$D_{max} = 0.190$
 $D_{mean} = 0.105$

0 ————— 0.1





Diversité intra-spécifique *V. planifolia*



Allèles rares majoritaires
Mutations ponctuelles

➔ Reproduction végétative

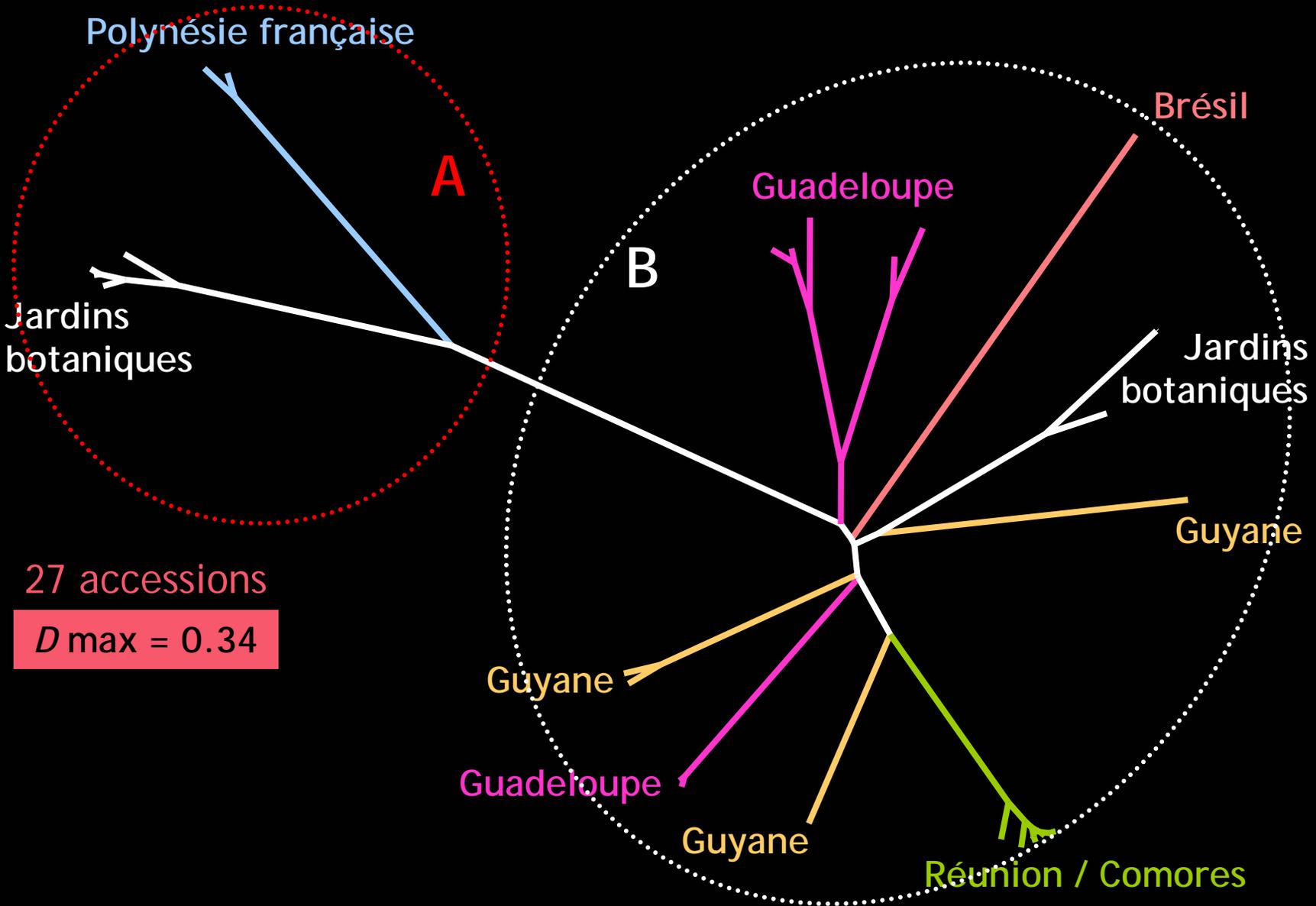
Disparition des allèles rares
Ségrégation des allèles

➔ Reproduction sexuée



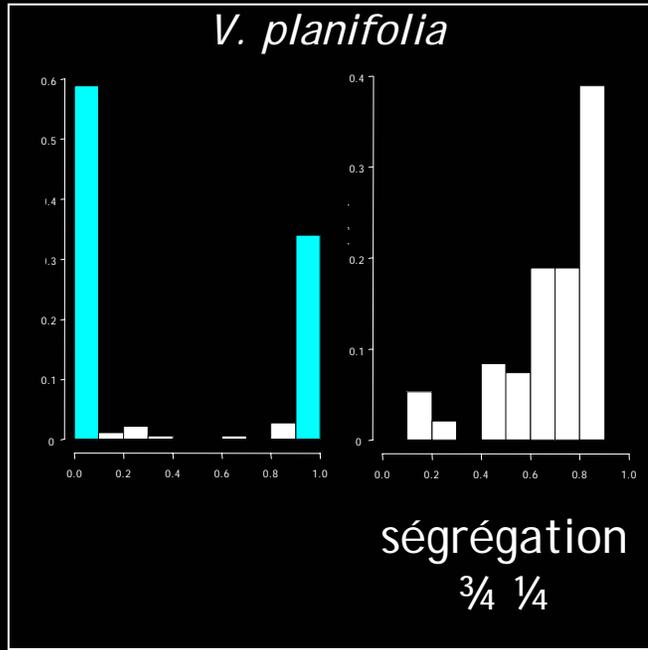
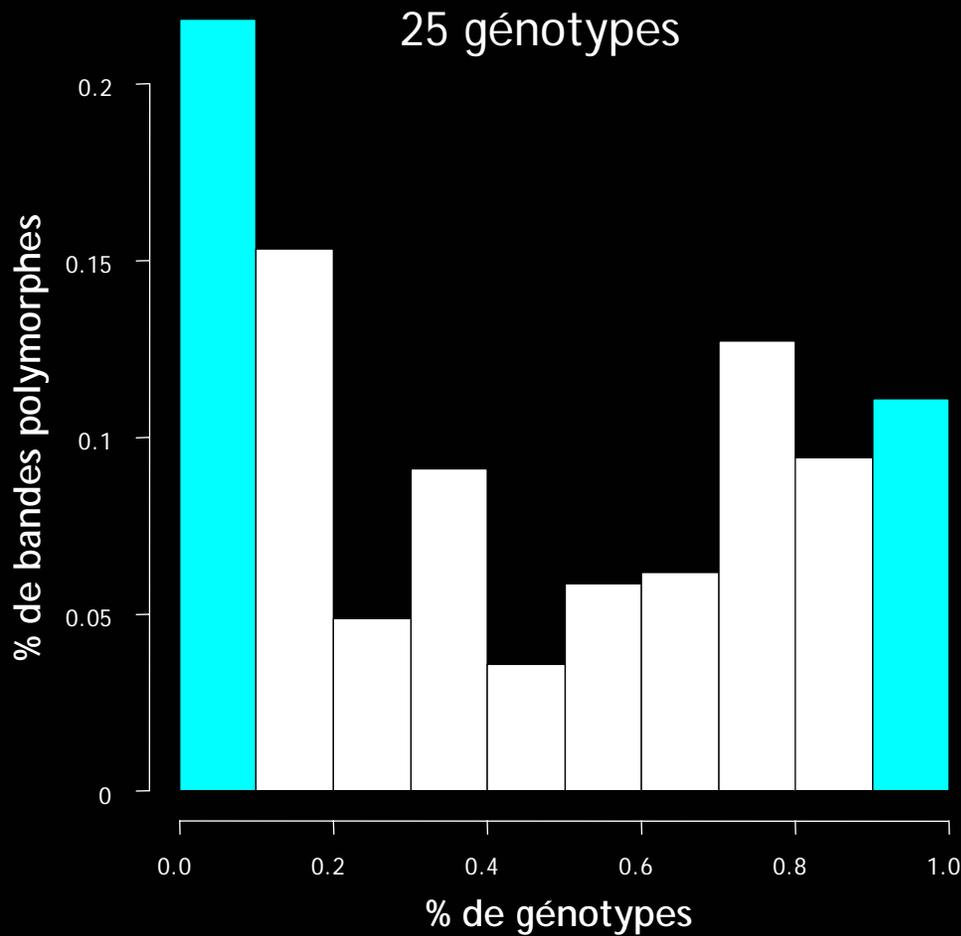


Diversité intra-spécifique *V. pompona*





Diversité intra-spécifique *V. pompona*



Allèles rares et allèles en ségrégation

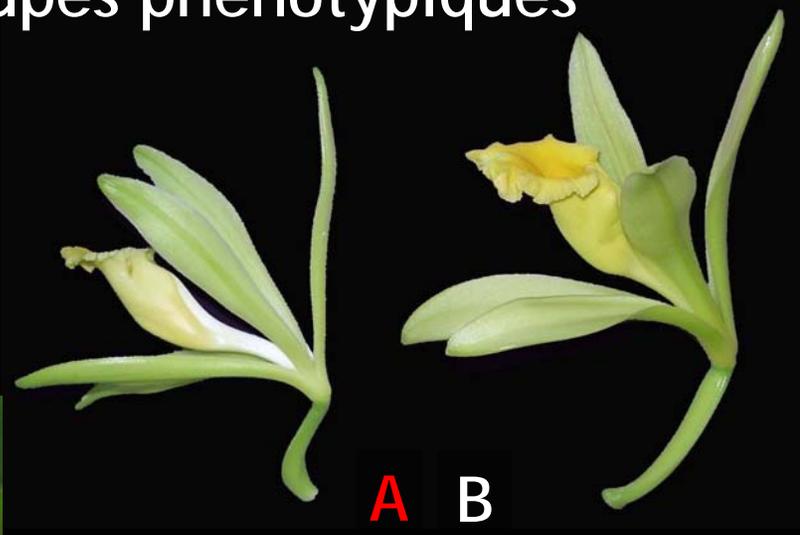
➔ Combinaison des reproductions végétative et sexuée





Diversité intra-spécifique *V. pompona*

✓ Deux groupes phénotypiques





Conclusions

- ✓ Origine clonale des *V. planifolia* introduites dans les îles de l'Océan Indien, du Pacifique et des Antilles ('Mansa') > nombre d'introductions ?
- ✓ Faible niveau de diversité génétique chez *V. planifolia* à La Réunion
- ✓ Evolution des phénotypes : accumulation de mutations somatiques à travers la reproduction végétative
 - ➔ Phénotype 'Aiguille' issu de reproduction sexuée
 - ➔ Particularités des types 'Mexique', 'Stérile', 'Grosse Vanille', 'Variegata' par rapport au type 'Classique' > non expliquées



Approche cytogénétique

Rôle de la polyploidie dans la
diversification des
vanilliers





Objectifs et questions

- ✓ Polyploidie : rôle important dans évolution des plantes
- ✓ Nombreux impacts : cellule, génome, reproduction, physiologie et développement, distribution géographique
- ✓ Deux niveaux de ploïdie (2x et 4x) chez *V. tahitensis* (Tonier 1951; Duval 2006)
- ✓ Existe-t-il de la polyploïdie ?
 - Chez *V. planifolia*
 - Chez *V. pompona*

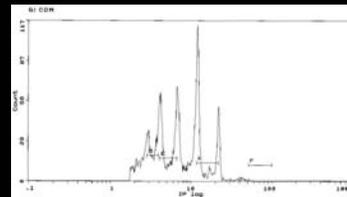




Méthodes

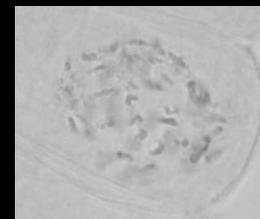
✓ Cytométrie en flux

- Quantité d'ADN nucléaire
- Niveau de ploïdie



✓ Microdensitométrie de Feulgen

- Confirmation des données de cytométrie



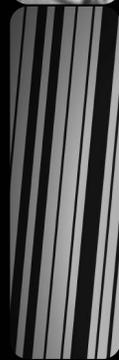
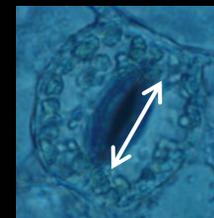
✓ Comptages chromosomiques

- Cellules des racines aériennes
 - Vérifier les niveaux de ploïdie
- Cellules du pollen en formation
 - Evaluer le nombre chromosomique de base



✓ Mesures de longueurs de stomates

- Impact de la ploïdie sur la morphologie





Matériel végétal

V. planifolia

- 50
- 3
- 6
- 12

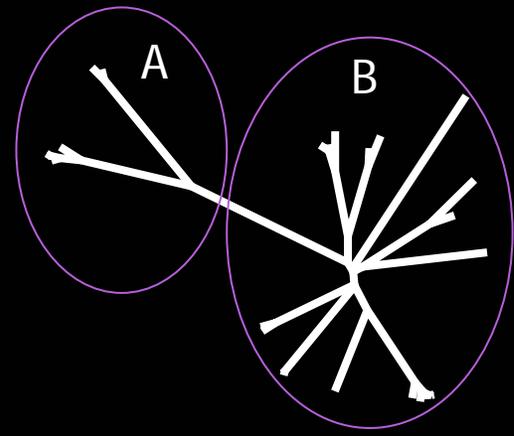
- Cytométrie en flux
- Microdensitométrie
- Comptages chromosomiques
- Longueurs de stomates

V. pompona

- 18
- 0
- 8
- 12

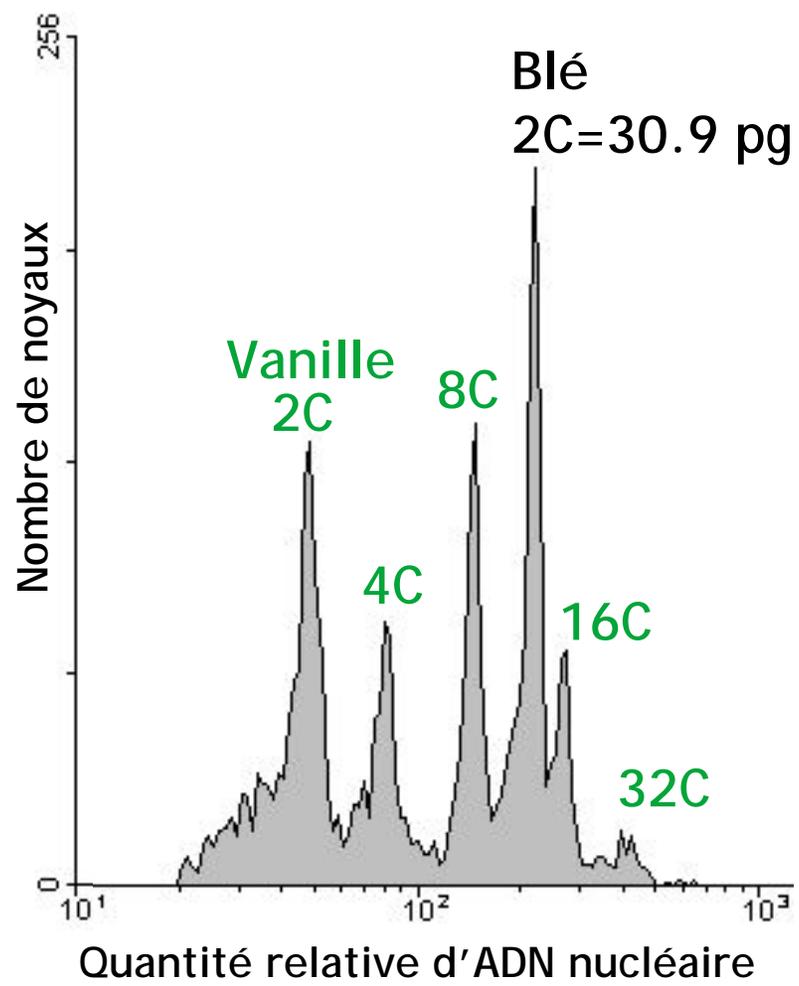
- ✓ Types morphologiques
- ✓ Origines géographiques
- ✓ Groupes génétiques

- ✓ Origines géographiques
- ✓ Groupes génétiques





Une forte endoréplication dans les feuilles



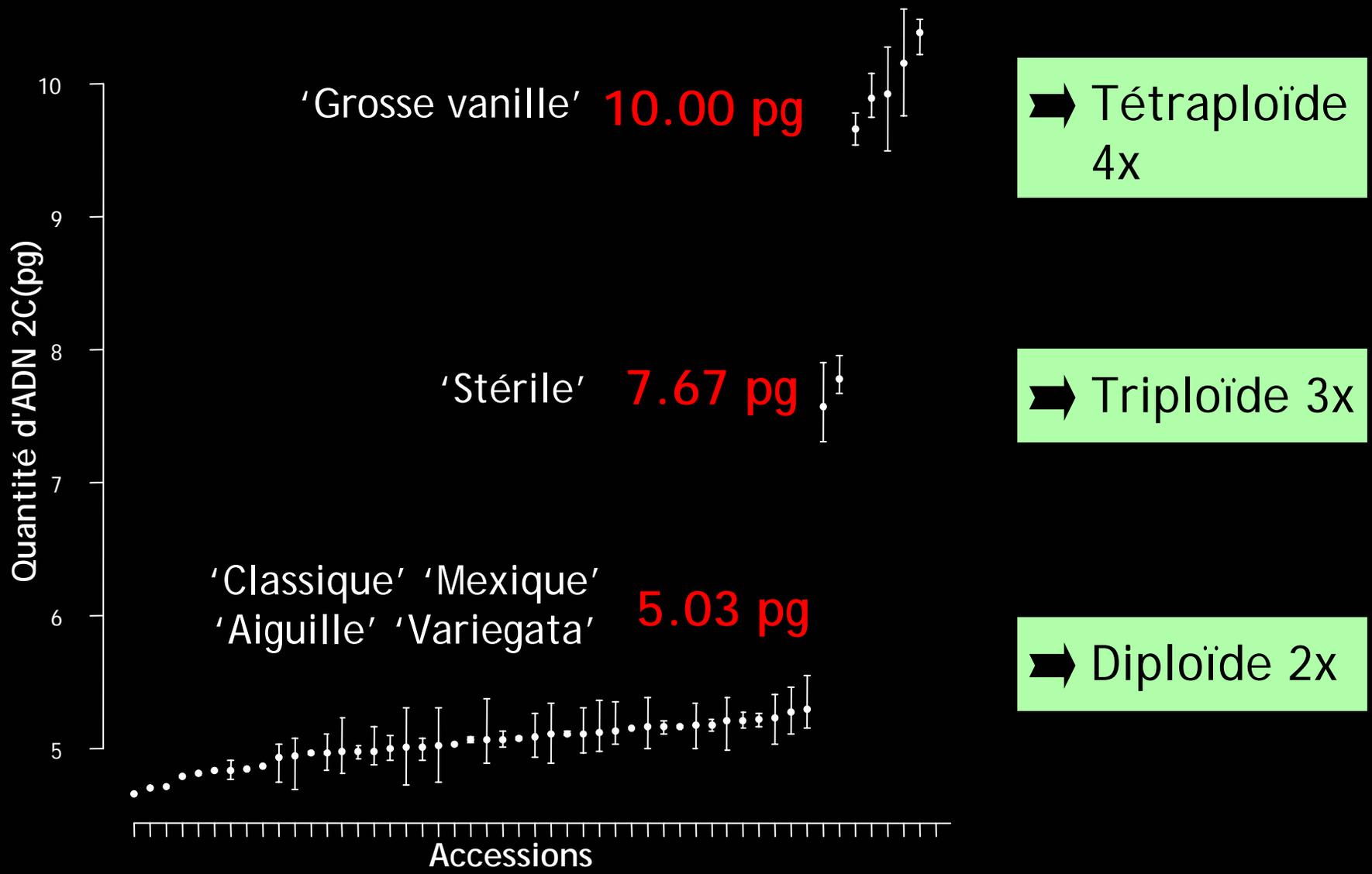
- ✓ 3 à 5 pics par histogramme
- ✓ noyaux 2C 4C 8C 16C et 32C
- ✓ 1er pic = noyau 2C

Histogramme de *V. planifolia* ('Mexique' PLm0001)



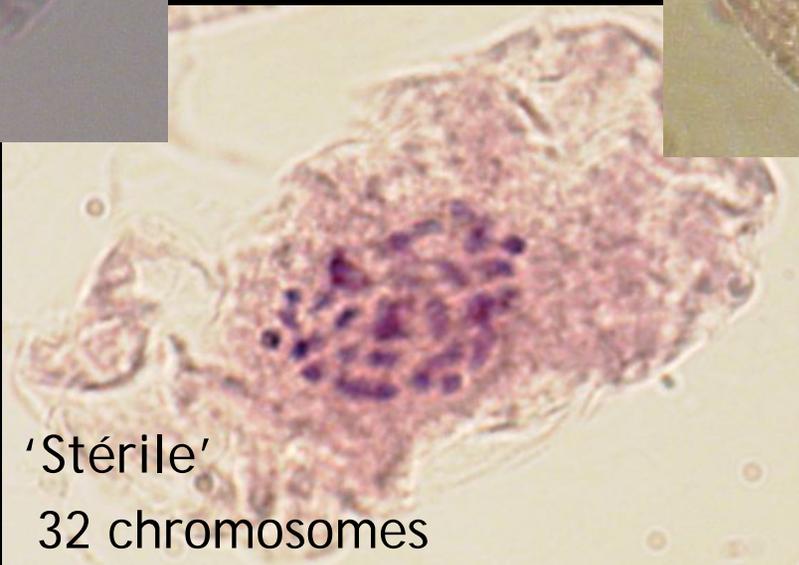
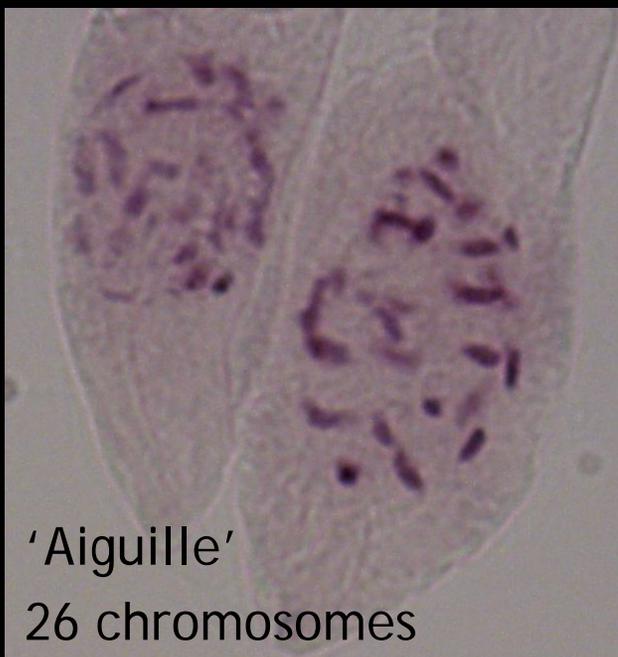
Polyploidie chez *V. planifolia*

✓ Cytométrie en flux et microdensitométrie



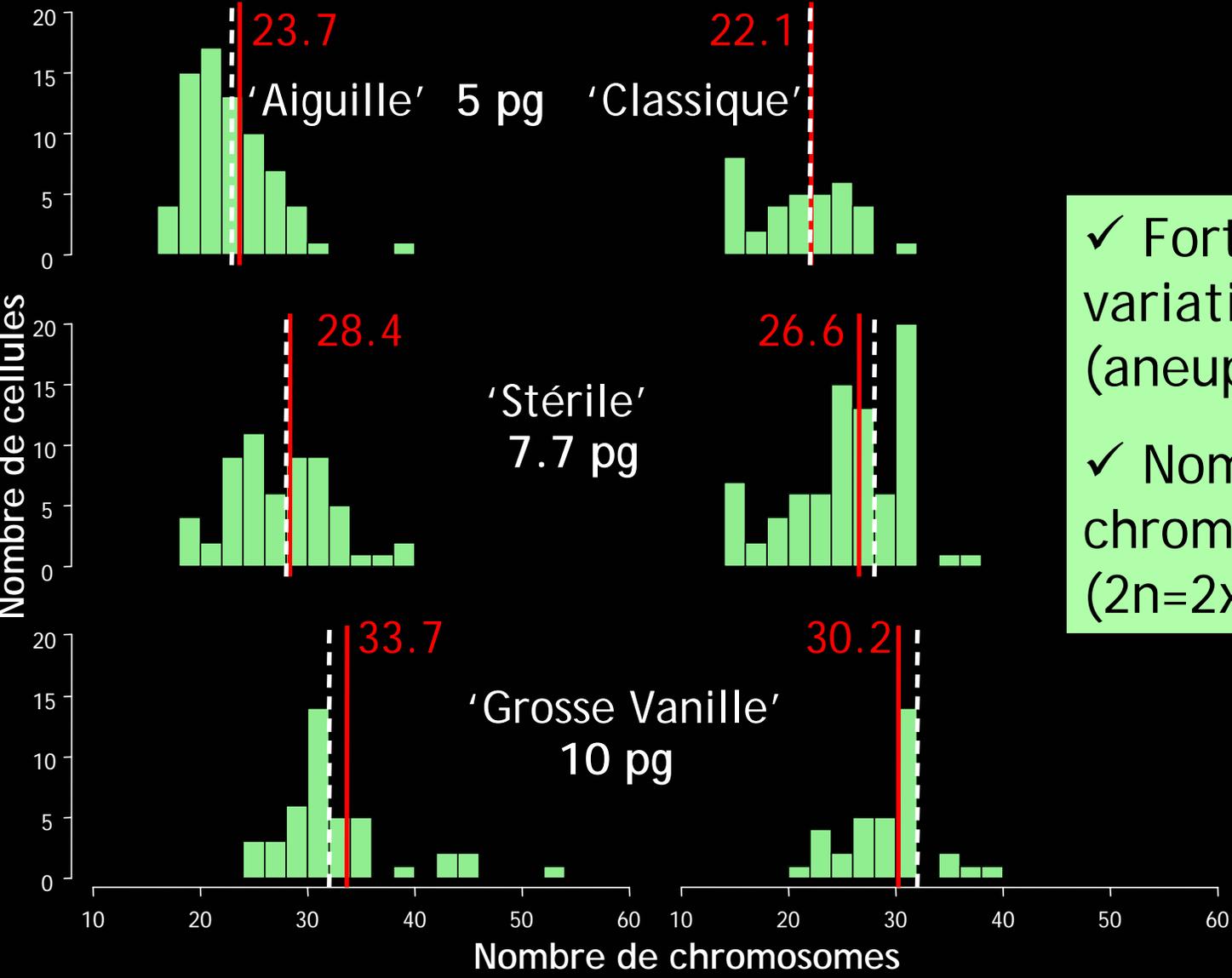
Polyploidie chez *V. planifolia*

✓ Comptages chromosomiques sur racines



Polyploidie chez *V. planifolia*

✓ Comptages chromosomiques sur racines



✓ Forte variation (aneuploïdie)
✓ Nombre chromosomique ($2n=2x=32$) ?

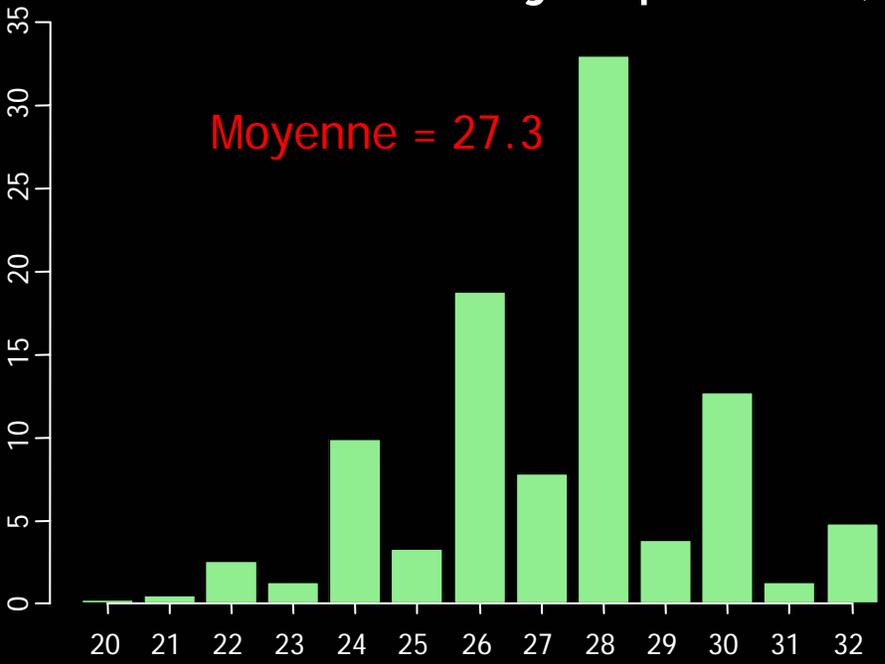




Que nous apprend la bibliographie ?

- ✓ La majorité des publications indique
 - *V. planifolia* $2n = 32$
(Hoffmann 1929, 1930 ; Heim 1954 ; Chardard 1963 ; Martin 1963)

- ✓ D'autres références indiquent un nombre variable selon les cellules
 - $2n = 13-32$ jusqu'à 53 (Hurel-Py 1938)



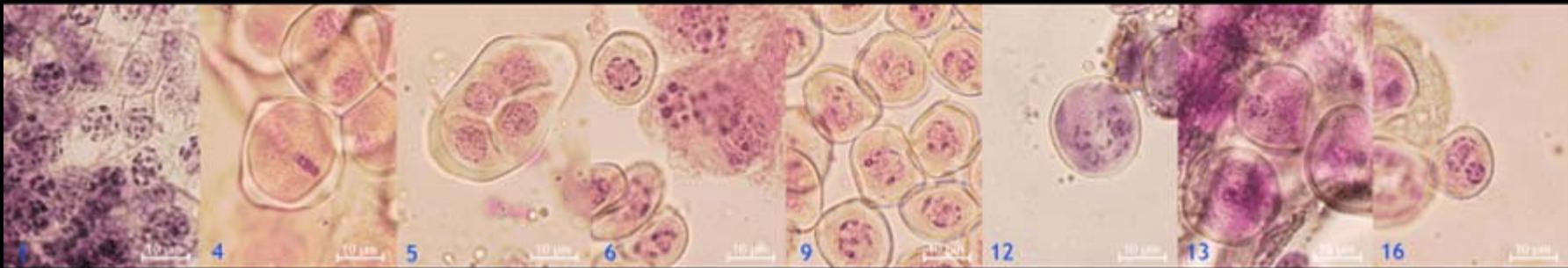
- associations somatiques pendant la mitose (Nair et Ravindran 1994)

➔ Rechercher le nombre chromosomique de base



Polyploidie chez *V. planifolia*

- ✓ Comptages chromosomiques sur pollen

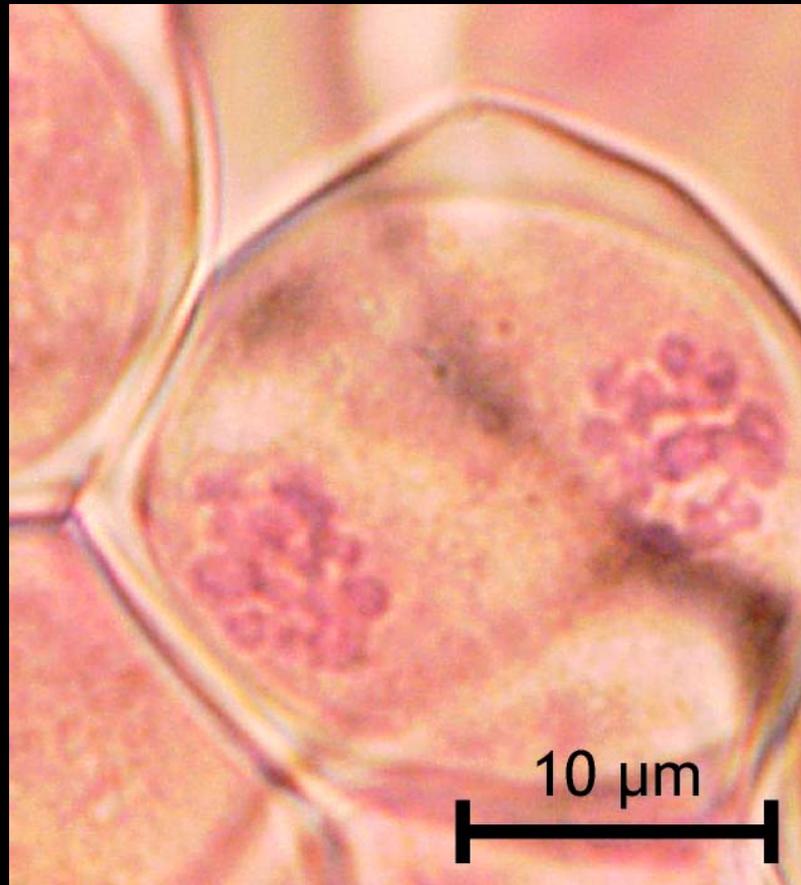


- ✓ Correspondance entre stades de développement des boutons floraux et stades de formation des grains de pollen



Polyploidie chez *V. planifolia*

- ✓ Comptages chromosomiques sur pollen

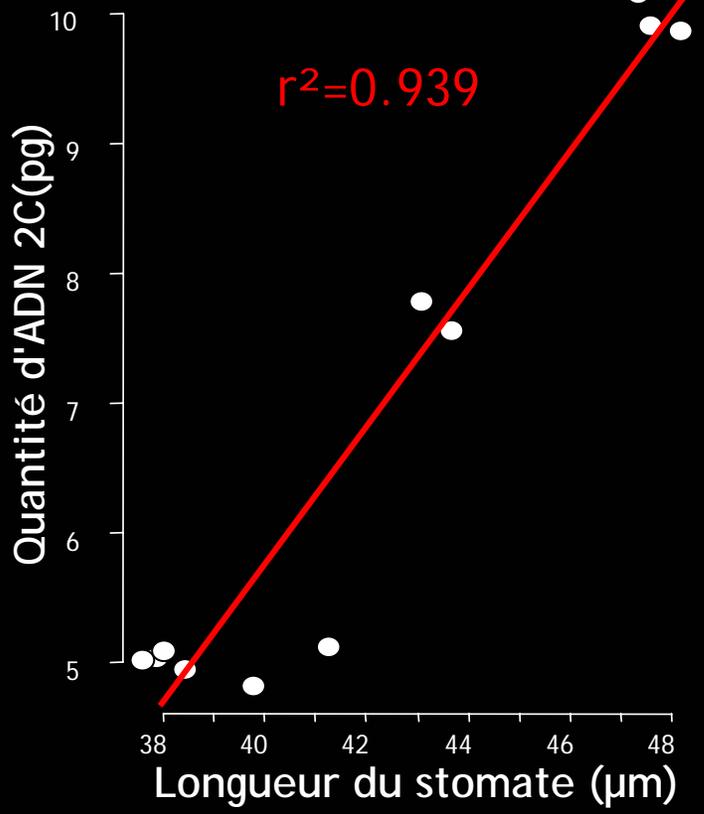
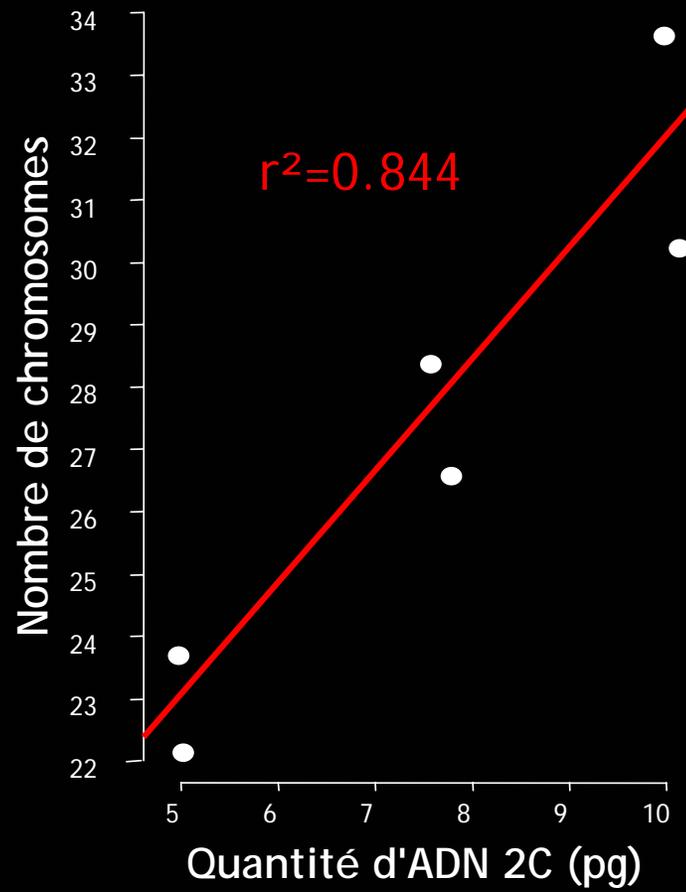


➔ *V. planifolia* 'Classique' 5 pg : $n = 16$



Polyploidie chez *V. planifolia*

✓ Corrélations entre les variables



- ✓ Fortes corrélations positives
- ✓ Stomates bons indicateurs de la ploïdie
- ✓ Auto-polyploïdisation récente (Bennett et Leitch, 2004)



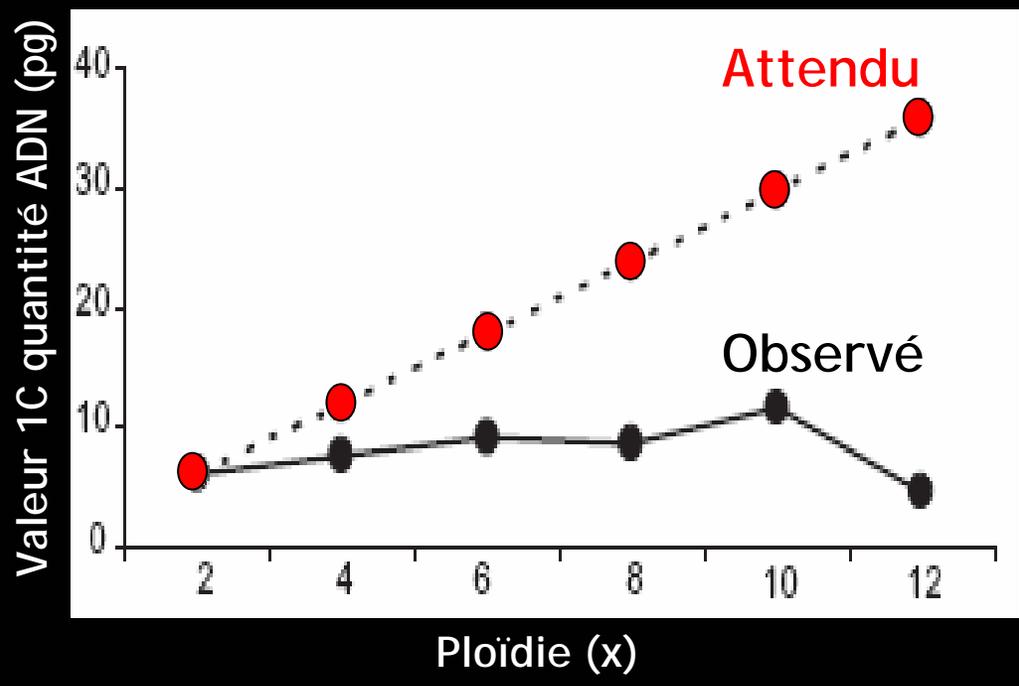


« Contraction génomique »

✓ Genome downsizing (Bennett & Leitch, 2004)

Plant DNA C-values Database

> Relation quantité d'ADN pg / niveau de ploïdie



• Polyploïdes récents
> corrélation attendue



Conclusions sur *V. planifolia*

- ✓ Auto-polyploïdisation récente de *V. planifolia* à La Réunion
 - 3 niveaux de ploïdie (2x, 3x, 4x)
 - Peu d'individus découverts
- ✓ Origine des 'Grosse Vanille' > tétraploïdes
 - Doublement des chromosomes > endopolyploïdie
 - Endomitose
 - Endoréplication
- ✓ Origine des 'Stérile' > triploïdes
 - Croisement diploïde x tétraploïde
 - Production de gamètes non réduits à la méiose suivie d'une auto-pollinisation

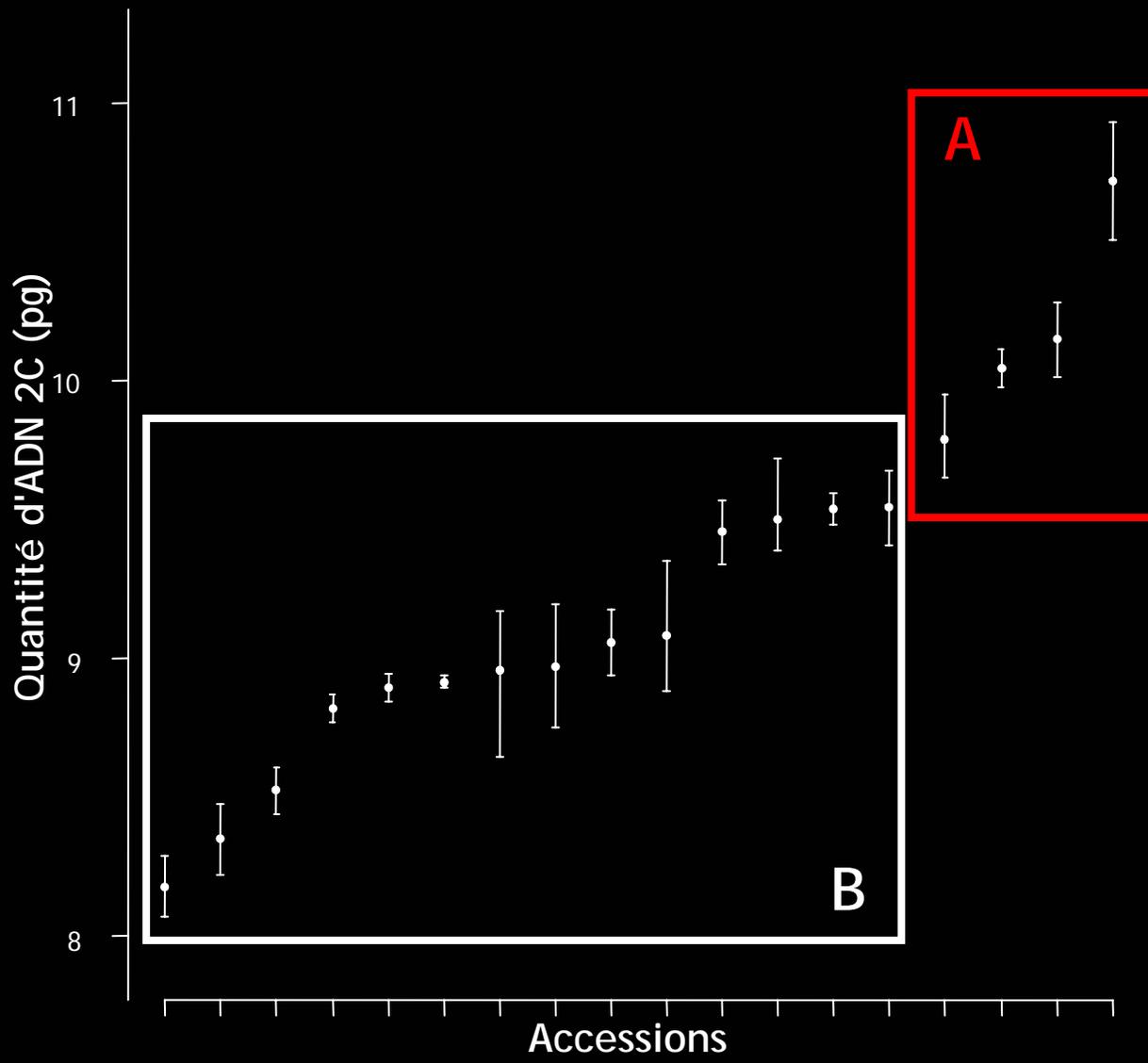


'Mexique', 'Variegata' ??



Polyploidie chez *V. pompona*

✓ Cytométrie en flux

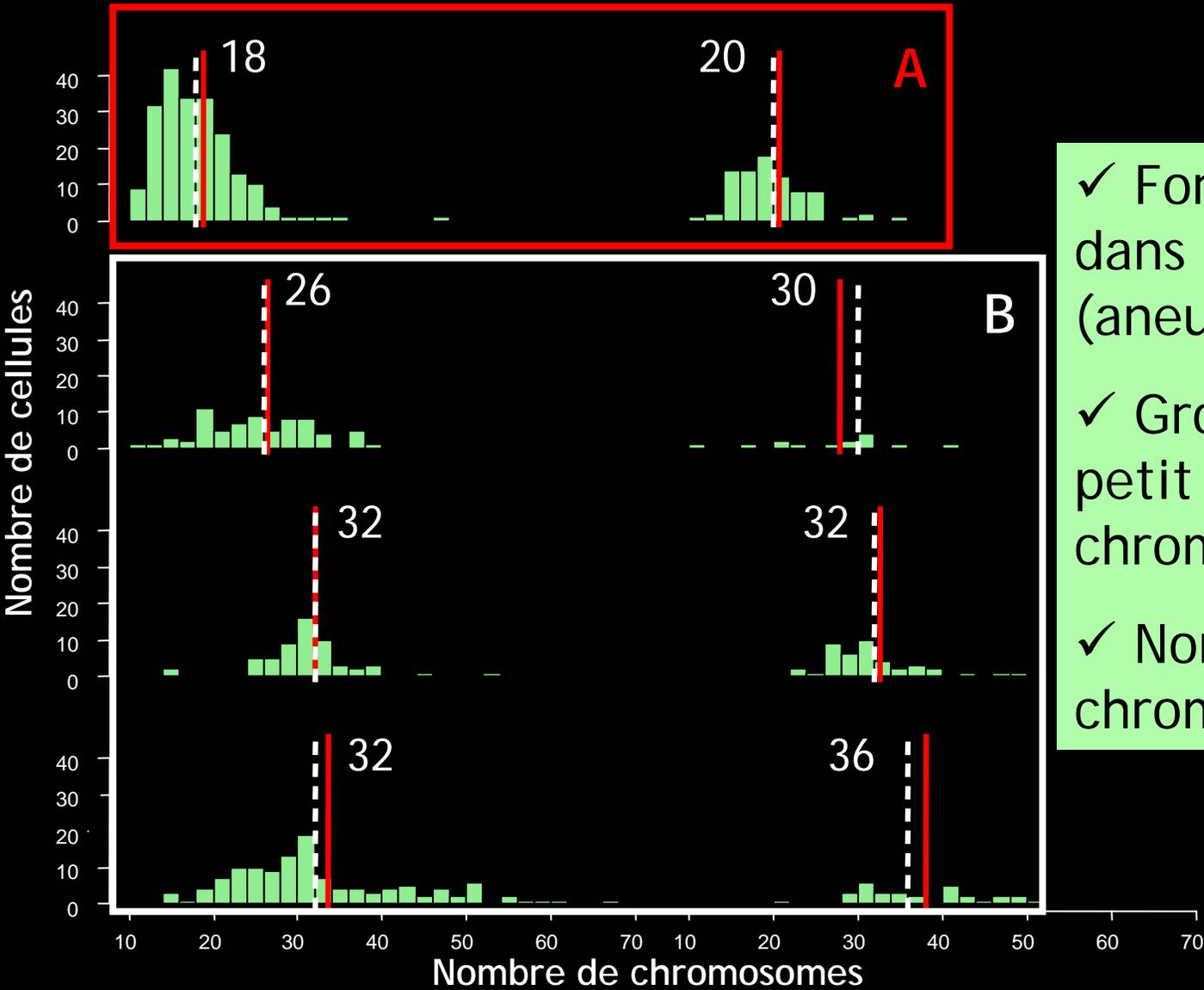


- ✓ 8.18 pg - 10.72 pg 2C
- ✓ Pas de groupes distincts
- ✓ $A > B$
- ✓ Même ordre de grandeur que 3x et 4x chez *V. planifolia*



Polyploidie chez *V. pompona*

✓ Comptages chromosomiques sur racines



- ✓ Forte variation dans les racines (aneuploïdie)
- ✓ Groupe A : petit nombre de chromosomes
- ✓ Nombre chromosomique ?



Polyploidie chez *V. pompona*

- ✓ Comptages chromosomiques sur pollen

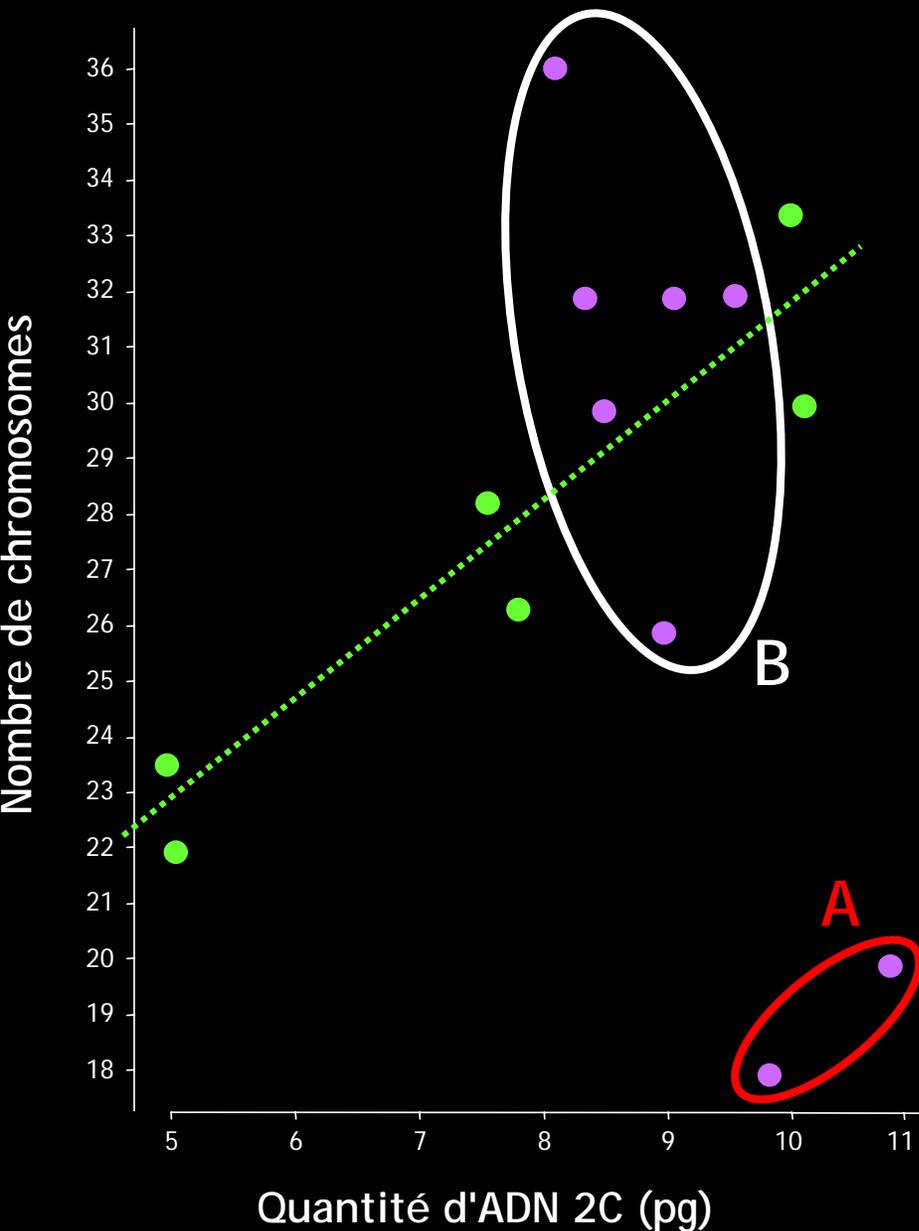


➔ *V. pompona* groupe B : $n = 32 >$ tétraploïde





Conclusions sur *V. pompona*



✓ *V. pompona* est tétraploïde (groupe B)

✓ Comportements différents *V. planifolia* - *V. pompona*

- Contraction génomique « Genome downsizing » (Bennett et Leitch 2004) ?



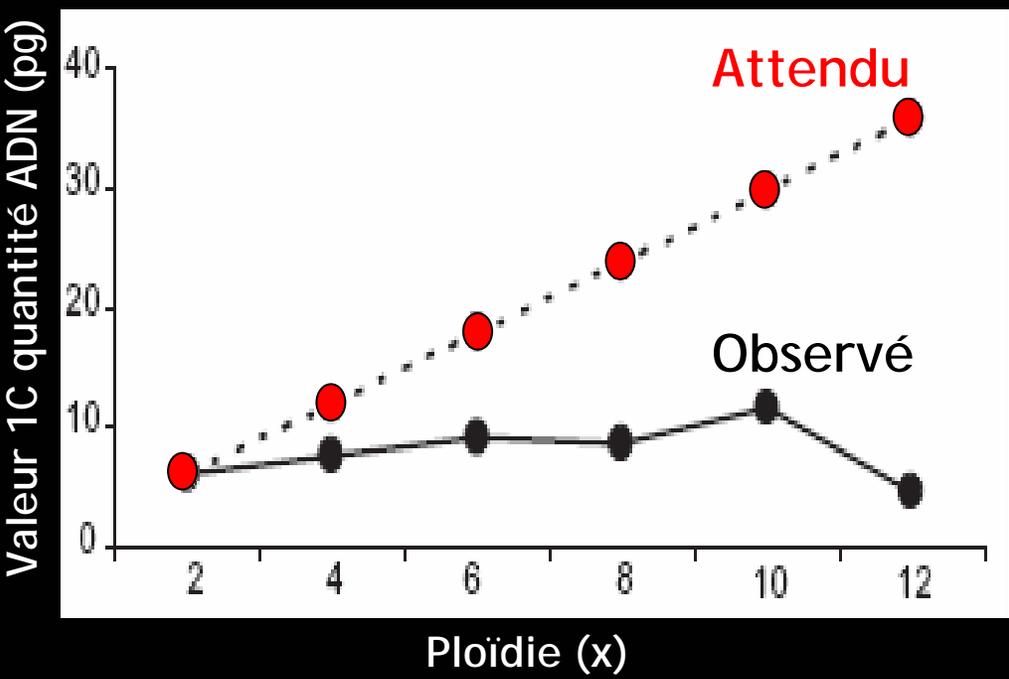


« Contraction génomique »

✓ Genome downsizing (Bennett & Leitch, 2004)

Plant DNA C-values Database

> Relation quantité d'ADN pg / niveau de ploïdie



• Polyploïdes récents
> corrélation attendue

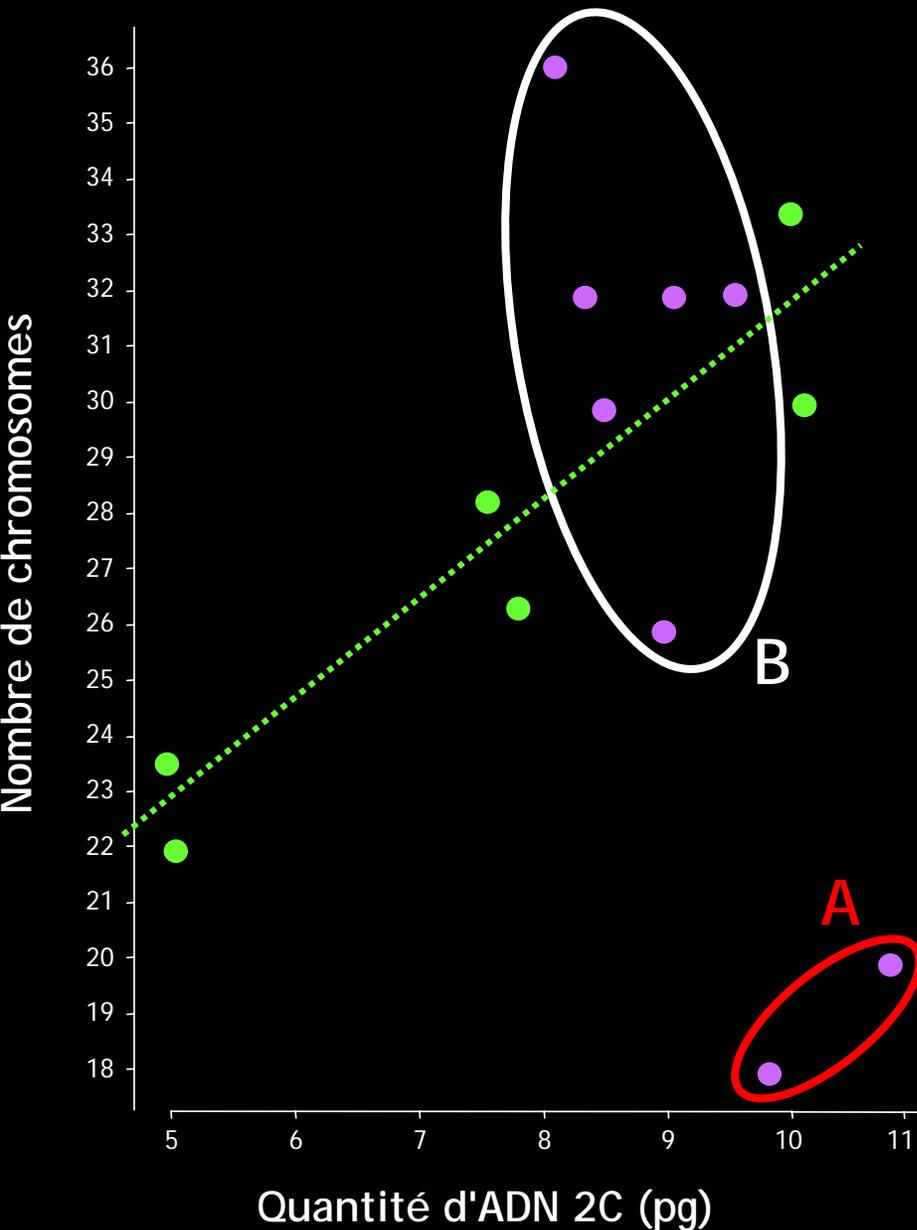


• Polyploïdes anciens
> perte d'ADN suivant la polyploïdisation





Conclusions sur *V. pompona*



✓ *V. pompona* est tétraploïde (groupe B)

✓ Comportements différents *V. planifolia* - *V. pompona*

- Contraction génomique « Genome downsizing » (Bennett et Leitch 2004) ?

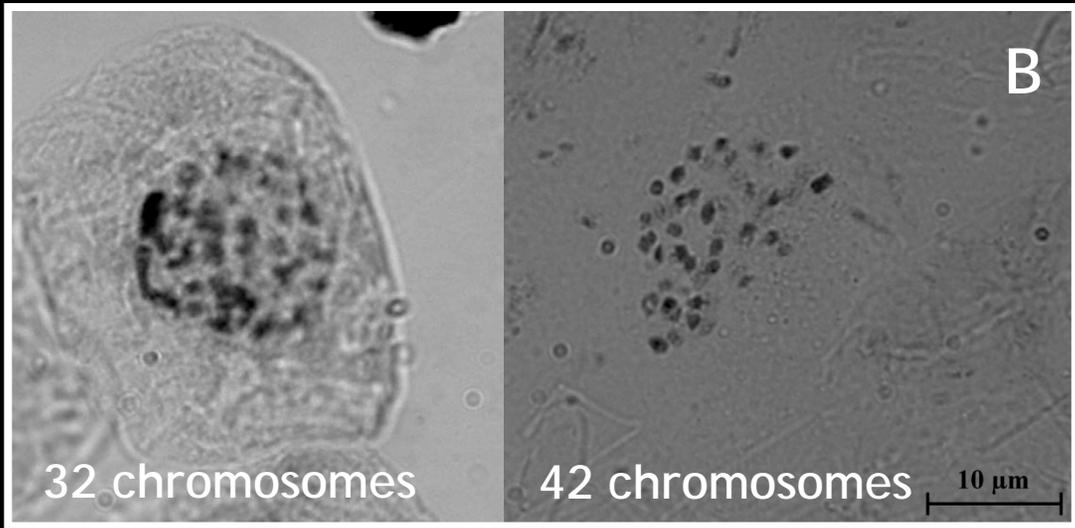
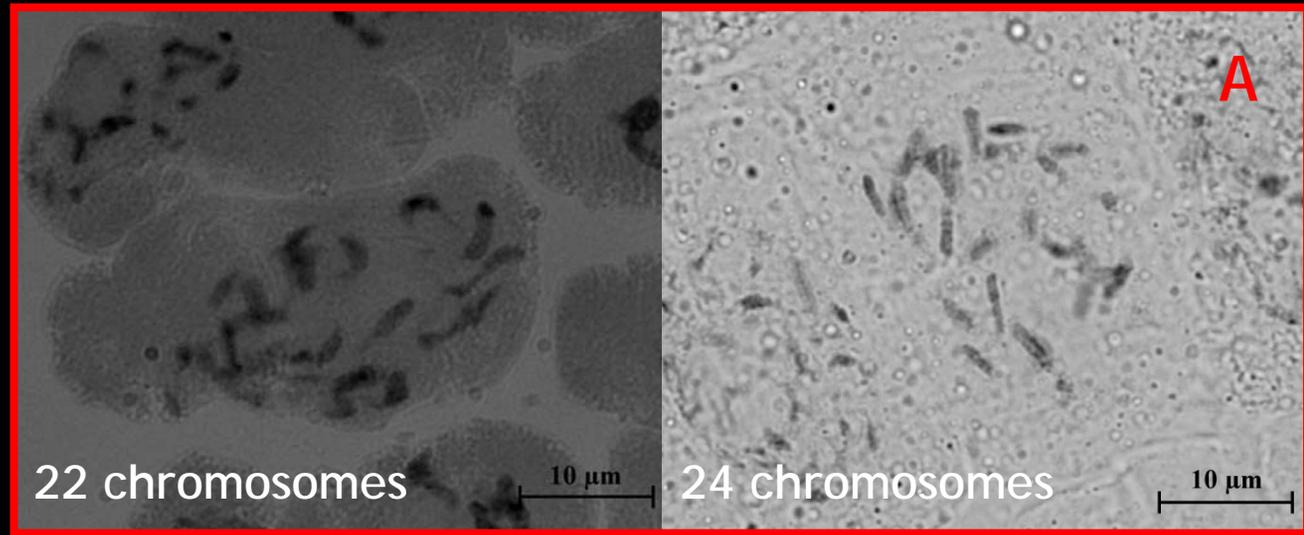
➔ *V. pompona* polyploïde ancien

- Fusions chromosomiques ?



Polyploidie chez *V. pompona*

✓ Comptages chromosomiques sur racines



✓ Accessions du groupe A ont des chromosomes plus gros que celles du groupe B



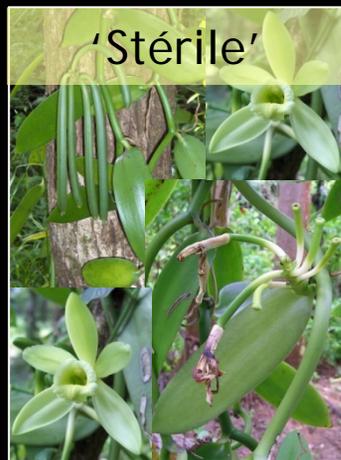
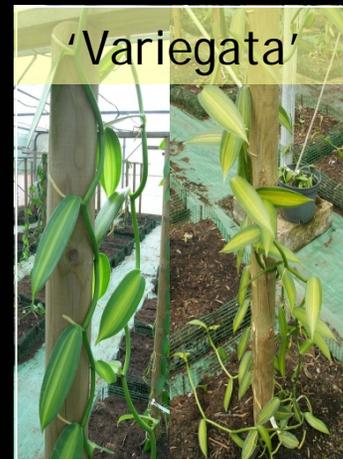
Conclusions Perspectives





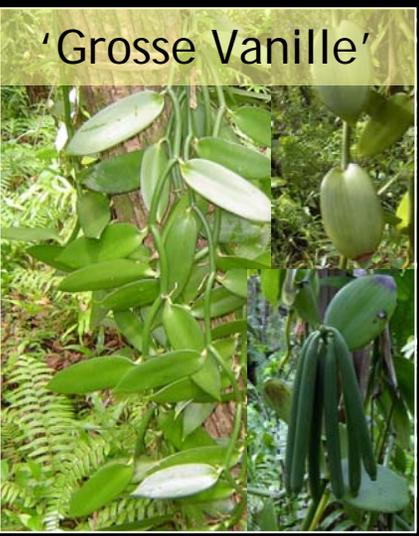
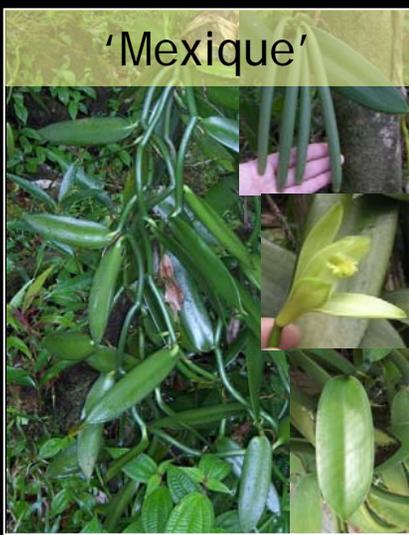
Rappel : objectif de la thèse

Expliquer les variations phénotypiques chez les *V. planifolia* de La Réunion sachant que la reproduction végétative est quasi-exclusive





Conclusions et perspectives





Conclusions et perspectives

'Mexique'	'Classique'	'Variegata'
?	Introduction du cv. mexicain 'Mansa'	?
'Aiguille'	'Stérile'	'Grosse Vanille'
Reproduction sexuée	Triploidie > Stérilité	Auto- tétraploidie





Conclusions et perspectives

'Mexique'	'Classique'	'Variegata'
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Variation épigénétique ? > pas MSAP ✓ Mutation dominante à effet pléiotropique ? 	Introduction du cv. mexicain 'Mansa'	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Variation épigénétique ? > pas MSAP ✓ Mutation chloroplastique ? ✓ Eléments transposables ?
'Aiguille'	'Stérile'	'Grosse Vanille'
Reproduction sexuée	Triploidie > Stérilité	Auto-tétraploidie

✓ Comparaison processus La Réunion vs. Mexique
'Oreja de Burro' / 'Stérile'





Conclusions et perspectives

- ✓ *V. planifolia* : base génétique étroite
 - Vulnérabilité aux aléas environnementaux

- ✓ Accroître la variabilité génétique
 - Autofécondation
 - Polyploidie
 - Hybridations inter-spécifiques
 - > amélioration résistance, productivité ...

- ✓ Gestion des ressources génétiques (doublons, futures prospections)

- ✓ Préciser les processus de diversification à l'échelle du genre > phylogénie et taxonomie





Publications

Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge

S Bory, M Grisoni, M-F Duval, P Besse (2007) *Genetic Resources and Crop Evolution*
doi:10.1007/s10722-10007-19260-10723 (acceptée mai 2007)

Development of microsatellite markers in cultivated *Vanilla*: polymorphism and transferability to other *Vanilla* species

S Bory, D Da Silva, A-M Risterucci, M Grisoni, P Besse, M-F Duval (2007)
Scientia Horticulturae doi:10.1016/j.scienta.2007.10.020 (acceptée octobre 2007)

Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean)

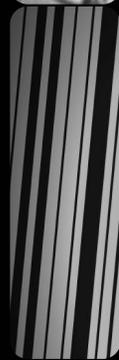
S Bory, P Lubinsky, A-M Risterucci, J-L Noyer, M Grisoni, M-F Duval, P Besse
(soumise) *American Journal of Botany*

Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae)

S Bory, O Catrice, SC Brown, IJ Leitch, R Gigant, F Chiroleu, M Grisoni, M-F Duval,
P Besse (soumise) *Annals of Botany*

Vanilla pompona (Orchidaceae) is an ancient polyploid species

S Bory, O Catrice, SC Brown, IJ Leitch, R Gigant, F Chiroleu, M Grisoni, M-F Duval,
P Besse (en préparation) *Annals of Botany*





Merci à tous
et particulièrement...

- les financeurs

(Région Réunion, Union Européenne, BRG, MOM)

- les labos d'accueil

(UMR PVBMT, ISV CNRS Gif / Yvette et IBP Orsay,
Jodrell Laboratory Kew)

- la Vanilla Dreamteam

(Pascale, Michel et Marie-France,
Katia et Jean-Bernard, Marion et Karin,
Anthony, Rodolphe et Louis)

- et tous les partenaires ayant
fourni le matériel végétal...