

# Étude et maîtrise des variants somaclonaux chez le palmier à huile

**Estelle JALIGOT**

Physiologiste végétal

**Pascal ILBERT**

Biotechnologiste

**Alain RIVAL**

Physiologiste végétal

## La variation somaclonale « *mantled* » chez le palmier à huile : caractéristiques

L'intérêt généré par la culture du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), première source végétale de corps gras au monde et source importante de revenus pour de nombreux pays du Sud, a motivé il y a plus de 30 ans la sélection des meilleurs arbres pour la production en huiles et leur multiplication conforme par embryogenèse somatique *in vitro*. Lors du passage de l'échelle du laboratoire à l'échelle de la plantation-pilote, on a pu constater qu'une proportion non négligeable de palmiers régénérants présentaient une variation somaclonale caractérisée par une féminisation apparente des pièces florales mâles : l'anomalie « *mantled* » (ainsi nommée en raison de l'aspect mantelé du fruit). Cette malformation, plus ou moins prononcée selon les génotypes des arbres-mères et affectant un pourcentage variable de leur descendance clonale (5 % en moyenne), si elle est réversible au cours du temps, constitue néanmoins un risque considérable pour la production. L'élaboration d'un test de détection précoce et fiable de l'anomalie « *mantled* » est aujourd'hui le préalable indispensable à l'exploitation des plants clonaux à l'échelle industrielle (Rival et Parveez, 2005).

Les caractéristiques de l'anomalie « *mantled* » (hétérogénéité spatio-temporelle, réversion, transmission non-Mendélienne par voie sexuée et aggravation du phénotype au cours des cycles successifs de culture *in vitro*), alliées à l'absence apparente d'altérations de la structure du génome ou des gènes (Rival *et al.*, 1997 et 1998), ont permis de poser dès 1998 l'hypothèse de son origine épigénétique (fig. 3). Cette piste de travail a semblé d'autant plus attractive que les mécanismes épigénétiques ont été impliqués dans la réponse cellulaire aux régulateurs de croissance ainsi que dans les phénomènes de différenciation ; enfin, leurs dysfonctionnements donnent dans certains cas naissance à des phénotypes analogues au phénotype « *mantled* » (Finnegan *et al.*, 1998 et 2000).

## Recherche de marqueurs moléculaires de la variation « *mantled* »

Afin d'explorer cette voie, l'équipe Palmiers IRD/Cirad a entrepris de comparer les phénomènes épigénétiques à l'œuvre chez les régénérants normaux et variants somaclonaux, selon deux axes principaux :  
– l'étude du transcriptome, afin de dégager d'éventuelles différences dans l'expression des gènes entre les deux types de régénérants. L'approche de differential display RT-PCR a permis d'identifier des marqueurs différentiels sur la base de l'accumulation de leur transcrits (Tregear *et al.*, 2002). Plus récemment, l'élaboration de bibliothèques soustractives et l'étude de leur composition sur macroarrays a conduit à l'isolement de marqueurs candidats, et leur validation par RT-PCR quantitative ou semi-quantitative est en cours. Toutefois, dans les deux cas, les profils différentiels semblent se limiter à un nombre réduit de génotypes, aussi n'est-il pas possible d'identifier un marqueur de l'anomalie qui soit universellement utilisable en conditions de production industrielle ;

– l'étude de la méthylation de l'ADN, qui est un mécanisme de régulation transcriptionnelle des gènes. Un important déficit en méthylation de l'ADN a rapidement été mis en évidence dans le génome des tissus porteurs de l'anomalie, par comparaison avec leurs homolo-

gues provenant d'arbres conformes (fig. 1) (Jaligot *et al.*, 2000). Cette découverte a ensuite été étayée par l'identification de séquences uniques présentant également une hypométhylation chez les individus anormaux (Jaligot *et al.*, 2002 et 2004). Toutefois, l'influence forte exercée par l'origine génétique sur les taux et profils de méthylation ne permet pas, là non plus, de faire de ces séquences des marqueurs discriminants entre palmiers normaux et anormaux. Il est donc apparu crucial de s'intéresser aux régulations épigénétiques ciblant des gènes susceptibles d'avoir un lien fonctionnel avec l'anomalie « *mantled* », par le biais d'une approche gènes candidats. Nous avons ainsi démontré récemment (Rival, Jaligot *et al.*, 2008) que le phénotype anormal n'est pas lié à une sous-expression des gènes codant pour les ADN-méthyltransférases, enzymes responsables de la méthylation de l'ADN (fig. 2). Nos projets actuels se tournent vers l'étude des régulations épigénétiques gouvernant la morphogenèse florale au niveau des gènes de type MADS-box, précédemment isolés au sein du laboratoire (Adam *et al.*, 2006 et 2007).

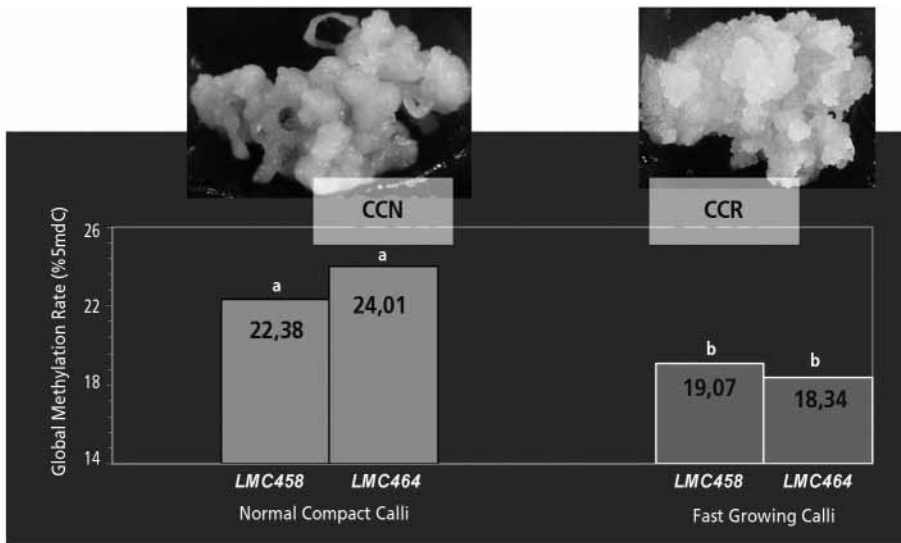


Figure 1

Estimation du taux de méthylation génomique par HPLC chez des Cals à croissance nodulaire (CCN), qui génèrent en moyenne 5% de palmiers « *mantled* », et chez des Cals à croissance rapide (CCR), qui donnent 100 % de palmiers variants. Les données associées à des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 1‰ (Jaligot *et al.*, 2000).

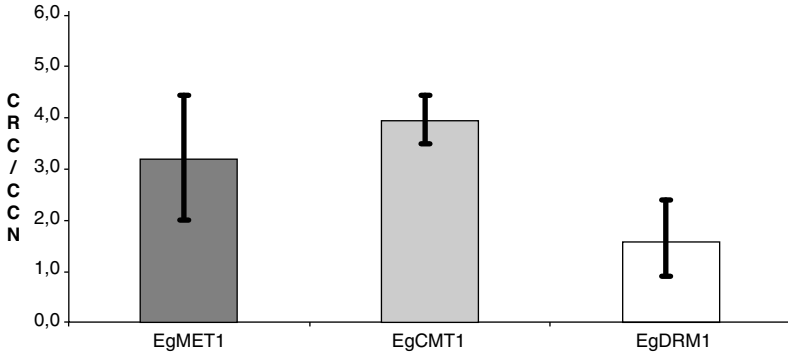


Figure 2

Comparaison de l'accumulation de transcrits entre CCN et CCR pour chacun des trois gènes majeurs codant pour des ADN-méthyltransférases chez le palmier à huile. Pour un gène d'ADN-méthyltransférase donné, la production nette de transcrits est quantifiée par *real-time* PCR et normalisé par rapport à un « gène domestique » unique, et le ratio [accumulation chez CCR]/[accumulation chez CCN] est calculé (Rival, Jaligot *et al.*, 2008).

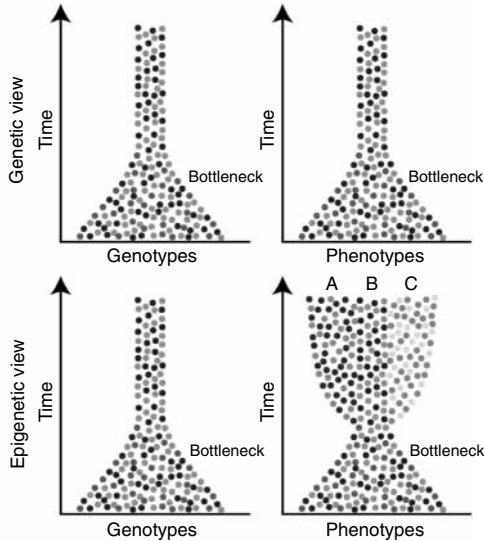


Figure 3

Comparaison entre la vision génétique et la vision épigénétique de la relation entre sélection et diversité génétique et phénotypique. Du point de vue de la génétique (en haut), l'application d'une pression de sélection tend à faire diminuer fortement, rapidement et durablement la diversité génétique et la diversité phénotypique d'une population. Du point de vue de l'épigénétique (en bas), la pression de sélection aboutit au contraire à l'émergence de nouveaux phénotypes, sans variation de la diversité génétique (Rapp et Wendel, 2005).

## Gestion du risque en exploitation commerciale

La gestion du risque d'apparition de hors-types dans une production clonale à l'échelle industrielle repose sur l'étude des conditions dans lesquelles apparaît la variation, ainsi que sur la description et le suivi des variants dans le temps.

Cette double démarche permet :

- d'apprendre à limiter l'incidence des variants dans la descendance clonale, en jouant sur les paramètres influant sur leur émergence (génotype, temps de culture, nature et dosage des régulateurs de croissances) ;
- de gérer le risque sur la part de variation impondérable, en panachant les génotypes mis en culture et en limitant le temps de culture et le nombre de vitroplants produits par génotype, en développant des protocoles « *hormones-free* » ;
- d'amender le protocole de micropropagation par retour d'expérience (*feed-back*).

Aujourd'hui des laboratoires affichent des objectifs de production de l'ordre de 1 million de vitroplants par an grâce à des dispositifs de suspensions embryogènes à grande échelle, et affirment pouvoir maintenir un pourcentage de variants somaclonaux inférieur à 2 %. Cependant l'efficacité de cette stratégie d'évitement est discutable, dans la mesure où elle repose sur la multiplication des opérations de clonage et impose par conséquent une moindre pression sur les arbres têtes de clones, et où, faute d'essais génétiques à grande échelle, les individus d'élite ne sont plus sélectionnés que sur leur rendement individuel et non plus sur leur valeur en croisement. Il existe par conséquent un risque élevé que la production de vitroplants, au lieu d'apporter un gain de rendement, ne reflète plus que la valeur moyenne du croisement dont est issu l'arbre-mère.

Des questions cruciales demeurent en suspens :

- sachant que le phénotype « *mantled* » proprement dit n'est détectable que sur les fleurs de palmiers adultes, et que la demande de l'industrie envers un kit de détection précoce de l'anomalie est très

fort, comment assurer le lien entre des marqueurs moléculaires issus de stades matures (et de tissus différenciés) et un matériel d'application nécessairement peu différencié ?

– le potentiel de variation épigénétique peut être extrêmement utile en sélection, en complément ou en substitut d'une variabilité génétique restreinte. Toutefois, on ignore encore les moyens d'évaluer cette variation et de la stabiliser au sein d'une descendance car les modalités de la transmission des profils épigénétiques sont encore, dans une large mesure, inconnues.

## Bibliographie

- ADAM H., JOUANNIC S., MORCILLO F., RICHAUD F., DUVAL Y., TREGEAR J. W., 2006 – MADS-box genes in oil palm (*Elaeis guineensis*): Patterns in the Evolution of the *Squamosa*, *Deficiens*, *Globosa*, *Agamous*, and *Sepallata* subfamilies. *J. Mol. Evol.*, 62: 15-31.
- ADAM H., JOUANNIC S., ORIEUX Y., MORCILLO F., RICHAUD F., DUVAL Y., TREGEAR J. W., 2007 – Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *J. Exp. Bot.*, 58 : 1245-1259.
- BEULÉ T., MARGUERETTAZ M., MORCILLO F., FUENTES I., SINGH R., TREGEAR J., 2007 – *Identification of early molecular markers associated with the mantled phenotype in micropropagated oil palms by subtractive PCR and cDNA array analysis*. PIPOC Meeting, Kuala Lumpur, Malaysia, August 2007 (poster).
- FINNEGAN E. J., GENDER R. K., PEACOCK W. J., DENNIS E. S., 1998 – DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49 : 223-247.
- FINNEGAN E. J., PEACOCK W. J., DENNIS E. S., 2000 – DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10 : 217-223.
- JALIGOT E., RIVAL A., BEULÉ T., DUSSERT S., VERDEIL J.-L., 2000 – Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell. Rep.*, 19 : 684-690.
- JALIGOT E., BEULÉ T., RIVAL A., 2002 – Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 104 : 1263-1269.
- JALIGOT E., BEULÉ T., BAURENS F.-C., BILLOTE N., RIVAL A., 2004 – Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAPs) associated with the « mantled » variant phenotype of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome*, 47 : 224-228.
- RIVAL A., BEULÉ T., BARRE P., HAMON S., DUVAL Y., NOIROT M., 1997 – Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue cultures and seed-derived plants. *Plant Cell. Rep.*, 16 : 884-887.

RIVAL A., BERTRAND L., BEULÉ T., COMBES M.-C., TROUSLOT P., LASHERMES P., 1998 – Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breeding*, 117 : 73-76.

RIVAL A., PARVEEZ M., 2005 – “*Elaeis guineensis*, Oil Palm”. In Litz R., ed. : *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. Biotechnology in Agriculture Series n° 29. CABI Publishing, Wallingford, UK : 113-143.

RIVAL A., JALIGOT E., BEULÉ T., FINNEGAN E. J., 2008 – Isolation and differential expression

of MET, CMT and DRM methyltransferase genes from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in relation with the “mantled” somaclonal variation. *J. Exp. Bot.*, 59 : 3271-3281.

TREGEAR J. W., MORCILLO F., RICHAUD F., BERGER A., SINGH R., CHEAH S. C., HARTMANN C., RIVAL A., DUVAL Y., 2002 – Characterisation of a defensin gene expressed in oil palm inflorescence: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *J. Exp. Bot.*, 53 : 1387-1396.



Colloques et séminaires

# Biotechnologies du palmier dattier

Éditrice scientifique  
Frédérique Aberlenc-Bertossi

**IRD**  
Éditions



Actes du 3<sup>e</sup> Séminaire du réseau AUF-BIOVEG  
« Biotechnologies du palmier dattier »  
Montpellier (France), 18-20 novembre 2008

# Biotechnologies du palmier dattier

---

Éditrice scientifique  
Frédérique Aberlenc-Bertossi

**IRD Éditions**  
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT

collection Colloques et séminaires

Paris, 2010

**Préparation des textes**

Sylvie Doulbeau

**Mise en page**

Bill Production

**Fabrication**

Catherine Plasse

**Maquette de couverture**

Michelle Saint-Léger

**Maquette intérieure**

Catherine Plasse

*Photo de couverture*

IRD/F. Aberlenc-Bertossi : « *Palmeraies, Tozeur (Tunisie).* »

La loi du 1<sup>er</sup> juillet 1992 (code de la propriété intellectuelle, première partie) n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article L. 122-5, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple ou d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (alinéa 1<sup>er</sup> de l'article L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon passible des peines prévues au titre III de la loi précitée.

© IRD, 2010

ISSN : 0767-2896

ISBN : 978-2-7099-1691-2