L'utilisation des marqueurs moléculaires dans le cadre de l'amélioration qualitative du tabac

Use of molecular markers related to quality improvement of tobacco plant

François Dorlhac de Borne

Altadis, Institut du Tabac, Route de Sainte Alvère
24 100 Bergerac

Bull. ARN, 2001, p. 47-56

Résumé

Au cours des deux dernières décennies, les contraintes réglementaires et la pression des consommateurs ont incité les professionnels du tabac à développer de nouvelles variétés présentant des caractéristiques permettant de réduire les risques sanitaires pour le consommateur. L'utilisation des techniques de création variétale par des moyens naturels a permis d'obtenir des résultats significatifs concernant les principaux composés chimiques indésirables de la fumée de tabac.

Cependant, cette évolution est relativement lente, et l'utilisation de nouveaux outils d'évaluation des génotypes tels que les marqueurs moléculaires devraient permettre de progresser plus rapidement. L'identification des principaux gènes impliqués dans la formation de certains précurseurs des hydrocarbures aromatiques polycyliques et des nitrosamines est en cours, et devrait permettre de disposer à moyen terme de moyens d'évaluation plus performant.

L'obtention de variétés de tabac résistantes aux principaux pathogènes n'est d'autre part pas à négliger du fait de la réduction de l'usage des produits phytosanitaires sur les cultures, et un nombre conséquent de marqueurs moléculaires sont dès à présent à la disposition du sélectionneur.

Enfin, la réalisation d'une carte génétique du tabac devrait s'avérer être indispensable dans l'avenir afin d'identifier les différentes régions du génome liées aux caractères complexes tels que le rendement en goudrons de la fumée.

Abstract

During two last decades, new regulations and consumers pressure encouraged the professionals of the tobacco to develop new varieties with the aim to enhanced safety for the consumer. Significant results were obtained by conventional means concerning some major chemical compounds of smoke tobacco.

However, this evolution is relatively slow, and the use of new tools to evaluate genotypes such as molecular markers should offered the possibility to progress more quickly. Identification of principal genes implied in the formation of some precursors of polynuclear aromatic hydrocarbons and nitrosamines is in progress, and should make it possible to have more powerful means of assessment rapidly.

Obtaining varieties of tobacco resistant to principal pathogens is important too because the use of pesticides is reduced significantly, and a consequent number of molecular markers is now at the disposal of the breeder.

Finally, the achievement of a genetic map of tobacco should be essential in the future to identify genomic areas linked to complex characters such as tar yield of smoke.

Introduction

De nos jours, l'industrie du tabac est soumise à des contraintes réglementaires de plus en plus strictes, alors que les exigences des consommateurs liées à la santé publique vont en s'accroissant. Le rôle clé de la recherche est de répondre à cette demande en développant de nouvelles variétés de tabac.

Alors que, dans les années 60, le sélectionneur avait pour mission principale l'amélioration des rendements, les programmes d'amélioration variétale doivent aujourd'hui se concentrer sur la qualité de la matière première, et en particulier sa composition chimique. Si les teneurs en goudrons ou en nicotine de part la réglementation sont en premier lieu visées, la réduction de l'application de certains produits phytosanitaires dans la culture du tabac est également une préoccupation constante

Les origines possibles des composés chimiques indésirables de la fumée de tabac

Il apparaît que trois types principaux de composés chimiques issus de la combustion du tabac peuvent être considérés comme pouvant avoir un effet sur le consommateur (Leffingwell, 1999) :

- les hydrocarbures polycycliques aromatiques issus des terpènes, des phytostérols, de la paraffine, des acides aminés et des composés pariétaux tels que la cellulose.
- les nitrosamines (TSNA) dérivées de la nicotine, de la nornicotine et du nitrite.
- et les amines aromatiques formées à partir des acides aminés, des alcaloïdes et des protéines.

Les résidus de produits phytosanitaires appliqués sur les cultures afin de lutter contre certains pathogènes sont également une source de préoccupations.

L'exploitation par le sélectionneur de la variabilité naturelle comme source de création variétale

La plupart des précurseurs chimiques cités précédemment sont présents à des degrés divers dans les différentes variétés de tabac (Tab. 1). Il a ainsi été observé à l'Institut du Tabac de Bergerac (ITB) que ces teneurs pouvaient varier très fortement d'un type de tabac à l'autre, mais aussi entre variétés de tabac du même type.

L'obtenteur va donc chercher à tirer partie de cette variabilité en transférant un caractère d'intérêt original dans une lignée élite à la base des variétés commerciales. Afin d'obtenir ce résultat, le sélectionneur procède par rétrocroisement (Fig. 1). Pour cela, il réalise une série d'hybridations entre la lignée receveuse et la lignée donneuse du caractère recherché. Les descendants sont ensuite croisés pendant au moins cinq générations par la lignée receveuse. Ceci permet d'augmenter la part de la lignée élite dans le fond génétique des descendants, tout en veillant à conserver le caractère intéressant par élimination des individus n'ayant pas ce caractère.

Burley	
Nicotine	1,9 - 3,4 (mg/cig)
Nornicotine	0,1 - 0,7 (%MS)
Alcaloïdes totaux	2,4 - 4,1 (%MS)
Nitrate	1,2 - 2,5 (%MS)
Azote total	3,1 - 3,9 (%MS)
Goudrons	11,7 - 16,3 (mg/cig)
Cellulose	3,5 - 15,1 (%MS)
Potassium	1,1 - 5,4 (%MS)
Flue-cured	
Nicotine	0,4 - 1 (mg/cig)
Alcaloïdes totaux	0,4 - 1,7 (%MS)
Azote total	1,3 - 2 (%MS)
Goudrons	12,8 - 19,4 (mg/cig)

Tableau 1 : Variabilité naturelle des principaux précurseurs chimiques impliqués dans la formation des composés chimiques indésirables de la fumée de tabac. Ces valeurs ont été observées à l'ITB sur les tabacs utilisés en sélection.

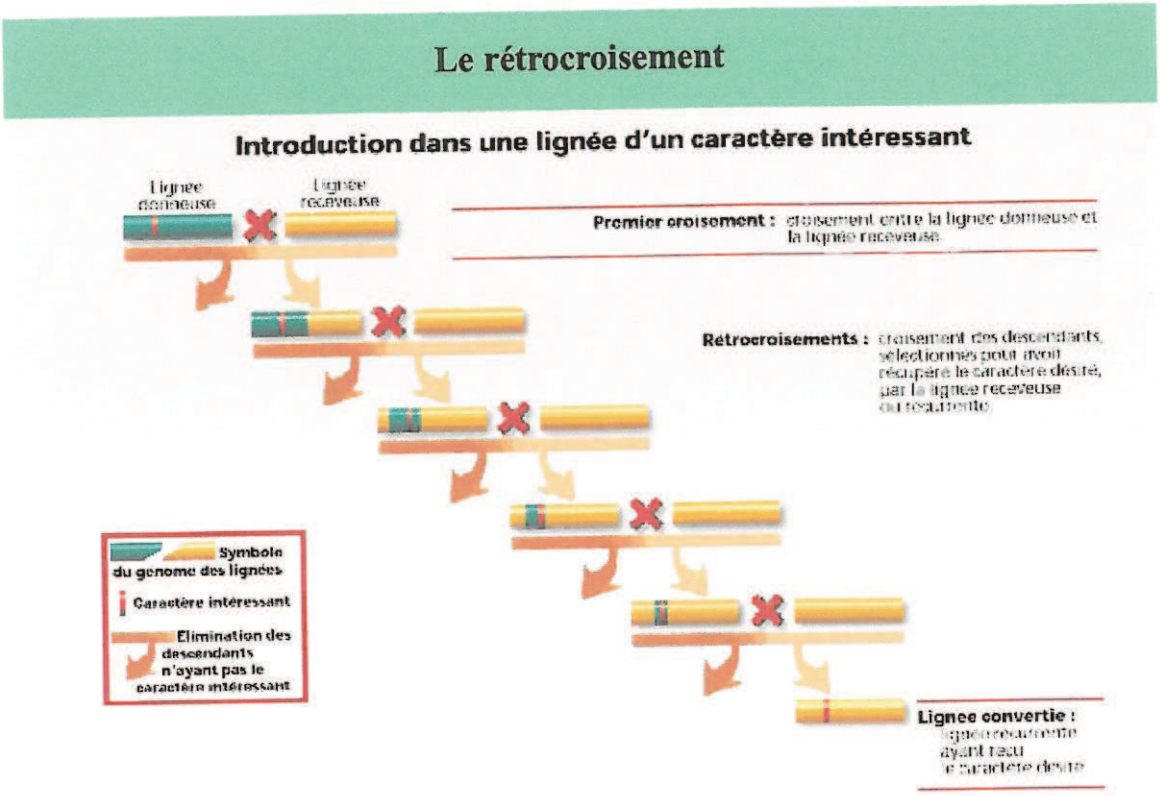

Figure 1 : Principe du rétrocroisement (source GNIS)

Cette technique a permis d'obtenir des variétés de tabac commerciales résistantes au virus Y de la pomme de terre, au mildiou (*P. tabacina*), à l'oïdium (*E. cichoraceam*), et à la pourriture noire des racines (*C. elegans*). En conséquence, compte-tenu de la diminution de l'application de certains produits phytosanitaires utilisés dans la lutte contre ces pathogènes, la présence de résidus dans la matière première s'en est trouvée réduite.

Les limites actuelles du processus de sélection

Bien que les efforts réalisés jusqu'à présent aient permis une amélioration qualitative importante des variétés cultivées, le potentiel moyen en goudrons des tabacs utilisés en sélection à l'ITB a par exemple diminué en 5 ans de 19 à 15 mg/cigarette (Fig. 2) (Verrier, communication personnelle), on constate tout de même que cette évolution est relativement lente du fait de la difficulté à pouvoir diriger avec grande précision le choix des plantes retenues à chaque cycle du processus de rétrocroisement. L'évaluation du potentiel d'une variété repose en effet sur des critères chimiques et morphologiques, sensibles aux facteurs climatiques et environnementaux. Ce mode d'évaluation impose de mener la culture jusqu'à son terme et nécessite ainsi de tester un grand nombre d'individus en plein champ.

Le test cotylédon développé par Schiltz et Izard (1962) permet d'évaluer à un stade précoce le potentiel d'un variété mais seulement en fonction d'un nombre limité de critères. La volonté actuelle de réduire les teneurs en certains composés de la matière première impose donc de trouver de nouveaux indicateurs plus fiables et faciles à mettre en œuvre.

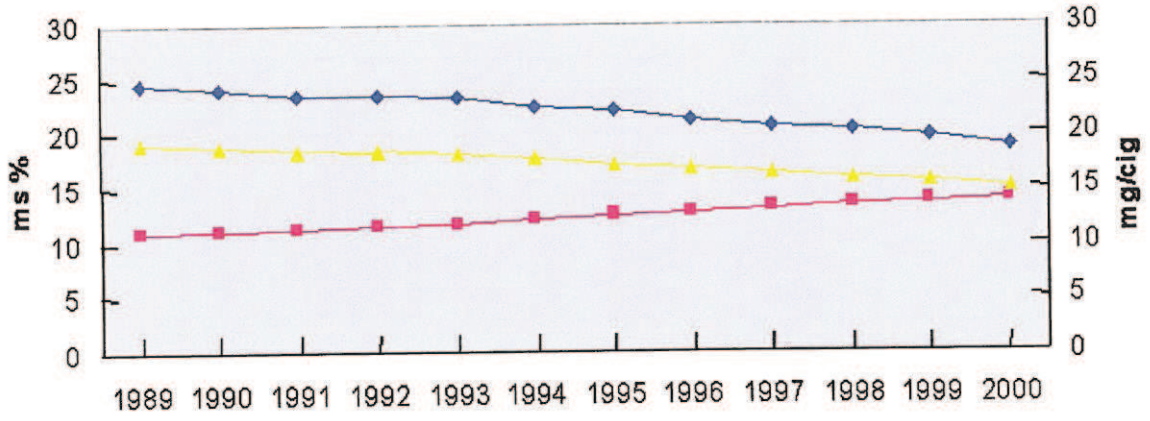

Figure 2 : Evolution des taux moyens de goudrons (jaune), sucre (bleu), et de cendre observée à l'ITB entre 1989 et 2000 (J.L. Verrier, non publié)

Intérêt des marqueurs moléculaires en sélection

Les techniques récentes de biologie moléculaire permettent d'obtenir des marqueurs moléculaires d'ADN, grâce auxquels il est possible de suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique. Ces marqueurs sont des séquences

codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus (Fig. 3). Certains des gènes impliqués dans les différentes voies métaboliques ou certaines portions de chromosomes proches de ces gènes peuvent servir de marqueurs. Les marqueurs moléculaires sont insensibles aux facteurs environnementaux et traduisent ainsi le potentiel réel de la plante pour le caractère considéré

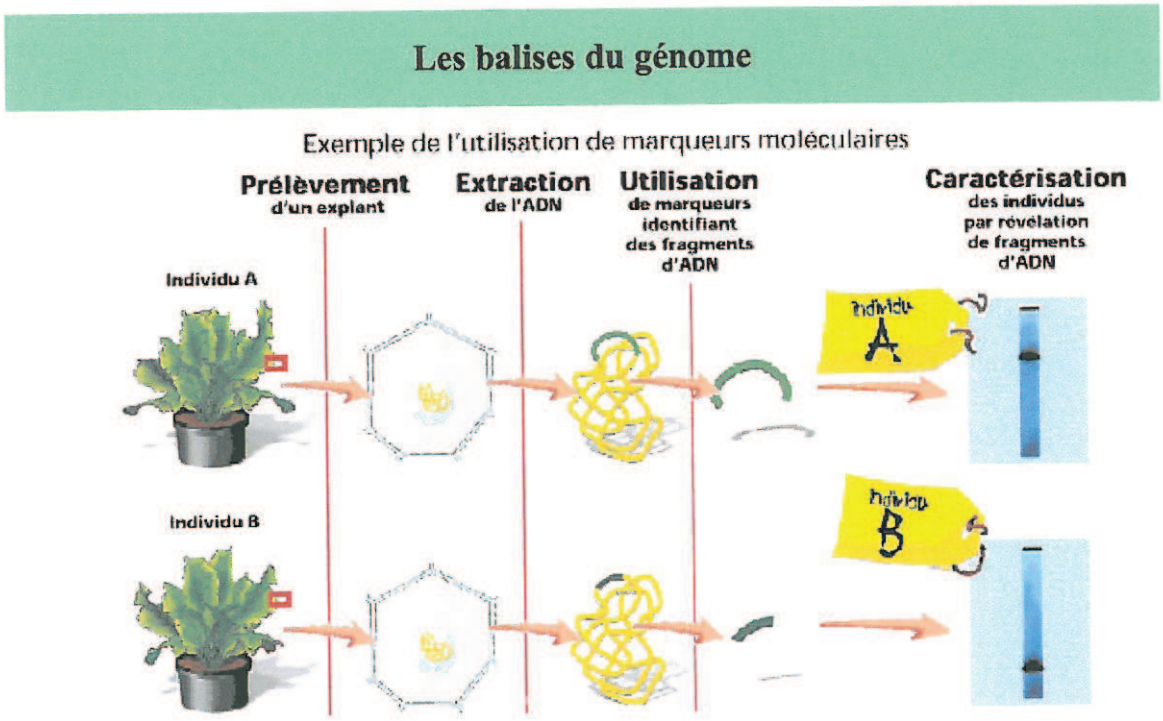

Figure 3 : Exemple d'utilisation des marqueurs moléculaires (source GNIS)

Les principales cibles envisageables à court terme

Nitrosamines spécifiques du Tabac (TSNA)

Les TSNA se forment au cours du séchage des feuilles de tabac par l'intermédiaire de processus bactériens, mais aussi lors de la combustion de la cigarette. Ils résultent d'un combinaison entre certains alcaloïdes (en particulier la nicotine et la nornicotine) et des composés dérivés du nitrate. L'obtention de marqueurs moléculaires impliqués dans la synthèse des alcaloïdes seraient donc précieuse afin d'obtenir des variétés à faible teneur en nicotine et nornicotine.

La nicotine

Les principaux gènes impliqués dans la voie de synthèse de la nicotine ont été clonés (Hashimoto et Yamada, 1994) et ne présentent pas de polymorphisme. Cependant, les gènes responsables de la régulation de cette voie de synthèse sont en cours d'identification à l'ITB. Certains d'entre eux présentent une expression différentielle et des marqueurs polymorphes pourraient en dériver.

La nornicotine

Le gène impliqué dans la déméthylation de la nicotine en nornicotine code probablement pour un cytochrome de type P450 (Fannin et Bush, 1992). L'utilisation de lignées de tabac quasi-isogéniques a récemment permis à l'ITB d'identifier 2 gènes candidats présentant une expression différentielle.

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques

Parmi les composés présents dans les goudrons, Les hydrocarbures polycycliques aromatiques occupent une place majeure. Ils se forment lors de la combustion de la cigarette, et sont issus d'une combustion incomplète des composés carbonés tels que les composés pariétaux dont fait partie la cellulose.

La cellulose

Plusieurs gènes codant pour la cellulose synthase ont été obtenus chez *A. thaliana*, et grâce à l'obtention de mutants, la spécificité de certaines de ces enzymes a été caractérisée. Un gène orthologue a été cloné à l'ITB chez *N. tabacum*, et d'autres devraient pouvoir être identifiés rapidement.

Le potassium

Le potassium a une influence sur la combustibilité du tabac, et a donc en conséquence un impact sur la formation des goudrons dans la fumée. Un gène codant pour un transporteur de potassium a été obtenu chez *A. thaliana*, l'identification de gènes orthologues reste à réaliser chez *N. tabacum*.

Résistance aux pathogènes

C'est dans le domaine de l'obtention de marqueurs moléculaires associés aux gènes de résistance aux pathogènes que la progression la plus rapide a pu être observée au cours des cinq dernières années.

Virus Y de la Pomme de terre (PVY)

Chez le tabac, la résistance au PVY résulte de l'absence d'un fragment de chromosome dans lequel se trouverait une protéine de mouvement nécessaire au développement du virus. Dix marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ont été obtenus par Noguchi (1999), alors que 2 marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ont été identifiés à l'ITB par Julio (2001).

Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV)

Le gène N de résistance au TMV a été cloné par Dinesh-Kumar (1995)

Pourriture noire des racines (C.elegans)

Bai et al. (1995) ont obtenu 2 marqueurs RAPD associés au gène de résistance issu de *N. debneyi*. L'un étant couplé avec la présence du gène, l'autre étant absent.

Nématodes

Dans le cas de *Meloidogyne incognita*, c'est le gène Rk qui confère la résistance au tabac. Six marqueurs RAPD ont été identifiés par Yi (1998).

Mildiou (P. tabacina)

Après étude par AFLP de la phylogénie de 131 variétés commerciales de tabac, Julio (2001) a pu associer 2 marqueurs avec la présence du gène dominant de résistance au mildiou.

Actions possibles après identification des marqueurs moléculaires

Identification des génotypes intéressants pour les caractères recherchés

Avant le lancement de tout programme de sélection, il est nécessaire d'identifier les meilleurs géniteurs pour les caractères recherchés. Les marqueurs moléculaires pourraient s'avérer être décisifs afin d'opérer ce choix parmi les centaines de génotypes dont dispose le sélectionneur. Un programme de détection des meilleurs génotypes vis-à-vis de la teneur en nicotine a déjà été lancé à l'ITB, alors que des travaux devraient débuter en collaboration avec le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'INRA de Versailles au cours de l'année 2001 afin d'identifier des variétés de tabac à faible teneur en cellulose possédant un type spécifique de cellulose synthase.

Utilisation des marqueurs dans les schémas de sélection à un stade précoce de développement

Les marqueurs moléculaires peuvent être précieux pour le sélectionneur car ils permettent de limiter le nombre de plantes à tester en plein champ, et offre une meilleure précision dans l'évaluation du potentiel de chaque individu pour le caractère concerné. Ils permettent d'autre part de pratiquer des tests en toutes saisons, alors que certains tests biologiques, comme dans le cas de la résistance au mildiou, ne peuvent être réalisés qu'à une période précise de l'année.

Afin de réaliser des tests au cours du processus de sélection, des protocoles basés sur l'utilisation des marqueurs moléculaires déjà disponibles ont été définis et validés pour les résistances au virus PVY et TMV, et pour la pourriture noire des racines (Fig. 4). La validation des tests pour la résistance *à Meloidogyne incognita* et au mildiou est en cours.

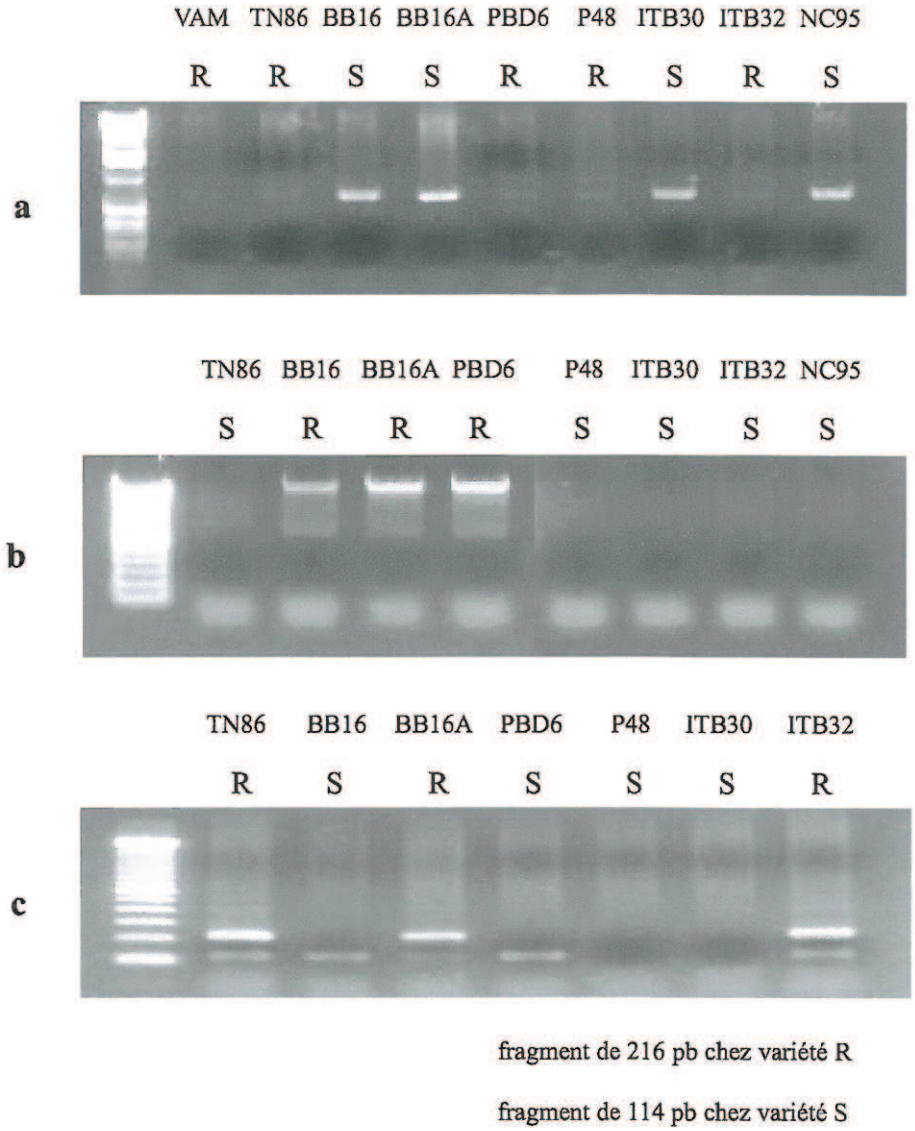

Figure 4 : Exemple des tests basés sur l'utilisation de marqueurs moléculaires issus de séquences codantes (TMV (b) ou non codantes (PVY (a) et pourriture noire des racines (c))

Conclusion

Les techniques récentes de la biologie moléculaire telles que la RAPD et l'AFLP ont permis d'obtenir rapidement des marqueurs moléculaires associés à des caractères simples. Cependant, dans le cas de caractères complexes tels que le rendement en goudrons dans la fumée, il sera nécessaire d'établir dans les années à venir une carte génétique du tabac afin d'identifier des QTLs (Quantitative Trait Loci). Ces QTLs représentant les différentes portions de chromosomes codant pour ces caractères. A la différence d'autres solanacées telles que la pomme de terre, la tomate ou le poivron, le polymorphisme observé chez le tabac est relativement faible, et l'accomplissement de cette tâche devrait donc en être rendu que plus délicat.

Références Bibliographiques

BAI D., REELEDER R. et BRANDLE J.E. (1995) Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco, *Theor. Appl. Genet* ., **91**, 1184-1189.

DINESH-KUMAR S.P., WHITMAN S., CHOI D., FEHL R., CORR C. et BAKER B. (1995) Transposon tagging of tobacco mosaic virus resistance gene N : Its possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4175-4180.

FANNIN F.F. et BUSH L.P. (1992) Nicotine demethylation in *Nicotiana*, *Med. Sci. Res.*, **20**, 867-868

HASHIMOTO T. et YAMADA Y. (1994) Alkaloid biogenesis : molecular aspects, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.*, **45**, 257-285.

JULIO E. (2001) Obtention de marqueurs moléculaires impliqués dans l'amélioration qualitative du tabac, étude de l'expression différentielle de certains gènes chez *Nicotiana tabacum*, *Mémoire de DRT*, Université Paul Sabatier, Toulouse, 58p.

LEFFINGWELL J.C. (1999) Basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types in Tobacco : production, chemistry and technology, Davis D.L. and Nielsen M.T., *Blackwell Science éd*, 265-284.

NOGUCHI S., TAJHIMA T., YAMAMOTO Y., OHNO T. et KUBO T. (1999) Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to potato virus Y (PVY), *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 822-829.

SCHILTZ P. et IZARD C. (1962) Susceptibilité cotylédonaire et résistance à *P. tabacina A.*, *C.R. Acad Agr. Fr.*, **6**, 561-564.

YI H.Y., RUFTY R.C. et WERNSMAN E.A. (1998) Mapping the Root-Knot nematode resistance gene (Rk) in tobacco with RAPD markers, *Plant disease*, **82**, 1312-1322.