Contributions de la recherche de gène-candidat pour la compréhension du rôle de la diversité génétique dans la réponse adaptative des conifères méditerranéens à la sécheresse

par Santiago C. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Delphine GRIVET & Giovanni G. VENDRAMIN

Une caractéristique majeure du climat méditerranéen est l'existence de sécheresses saisonnières. Pour les arbres dont les graines germent au printemps ou au début de l'été, de graves sécheresses entraînent une forte mortalité aux premiers stades de développement et peuvent empêcher la régénération naturelle de la forêt ; les arbres adultes peuvent également mourir, en particulier lorsque les sécheresses sont récurrentes et aiguës, ce qui à son tour attire les ravageurs et les maladies, entraînant le dépérissement général de la forêt. En outre, un effet indirect de la sécheresse est l'augmentation de la taille, de l'intensité et de la fréquence des incendies de forêt, constituant l'une des principales menaces à la survie de la forêt méditerranéenne. Des expérimentations en arboretums (tests de provenances et tests combinés de provenances-descendances) ont montré une variation génétique notable quant à la réponse à la sécheresse pour les essences forestières au niveau de l'espèce, de la population et des individus, ainsi que des différences dans les mécanismes de réponse à la sécheresse (par exemple la production de biomasse par rapport à l'efficacité de l'utilisation de l'eau). Par exemple, des estimations issues d'études sur la variance additive pour l'efficacité de l'utilisation de l'eau (EUE) au niveau de la population et de la famille des pins méditerranéens ont montré un gradient phénotypique du pin d'Alep du sud au nord, une espèce xérique possédant une large distribution dans la région méditerranéenne (VOLTAS *et al.* 2008). De nouvelles approches fondées sur le séquençage d'ADN de

gènes-candidats (c'est-à-dire de gènes potentiellement impliqués dans l'expression d'un caractère d'intérêt) sont très prometteuses pour évaluer les niveaux de variation génétique adaptative des arbres forestiers méditerranéens. L'existence d'une diversité génétique des caractères liés à la sécheresse (et la variation moléculaire sous-jacente) est primordiale puisque l'adaptation repose essentiellement sur la variation génétique continue (et moins sur de nouvelles mutations). En outre, compte tenu de la rapidité du changement climatique attendu dans un proche avenir — en particulier dans le bassin méditerranéen où une diminution importante des précipitations et un réchauffement marqué sont prévus (GIORGI and LIONELLO 2008) — la capacité des arbres forestiers à opérer des changements génétiques rapides est d'une importance primordiale. Ce fait est d'autant plus vrai si l'on considère que les estimations récentes des taux de migration des arbres forestiers et de la vitesse du changement climatique indiquent que la plupart des arbres forestiers ne seront pas en mesure de migrer à la vitesse nécessaire pour suivre leur optimum écologique, la seule alternative restante étant soit de s'adapter in situ, soit de disparaître (PETIT *et al.* 2008 ; AITKEN *et al.* 2008).

Dans cet article, nous présentons un bref résumé de nos études de génétique des populations en cours sur les gènes-candidats à la réponse à la sécheresse de deux pins méditerranéens répandus, le pin maritime (*Pinus pinaster* Aiton) et le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Le pin maritime est cantonné à la Méditerranée occidentale, ses populations naturelles méridionales atteignant le Haut-Atlas au Maroc. Trois principaux groupes de gènes ont été identifiés chez cette espèce sur la base de marqueurs moléculaires neutres (BURBAN & PETIT 2003 ; BUCCI *et al.* 2008) : un groupe occidental (la plupart de la péninsule ibérique et l'ouest de la France), un groupe oriental (Corse, France méditerranéenne, Italie et Tunisie) et, curieusement, un autre groupe composé par des populations hautement différenciées provenant du Maroc. Les preuves fossiles et l'inférence phylogénétique ont montré que cette espèce a une présence historique dans la Méditerranée occidentale, en particulier dans la péninsule ibérique (JARAMILLO-CORREA *et al.* 2010). Le pin d'Alep, au contraire, semble être un colonisateur récent de la Méditerranée occidentale, ce qui peut avoir des conséquences importantes pour son adaptabilité au sein de cet espace puisque sa colonisation a été accompagnée d'une réduction substantielle de sa variabilité génétique (voir ci-dessous). Pourtant, cette espèce dispose toujours d'une diversité génétique importante au sein de sa population native de l'Est (principalement en Grèce et, plus marginalement, en Turquie).

La disponibilité croissante de ressources génomiques d'espèces de conifères permet le développement d'approches fondées sur le séquençage des gènes-candidats, malgré la grande taille du génome de ces espèces (environ sept fois le génome humain). Actuellement, différentes initiatives américaines et européennes ont été lancées pour obtenir la première séquence complète d'un génome de conifère. Notre approche est basée sur la sélection de gènes-candidats pour des caractères adaptatifs pertinents, dans notre cas sur la réponse ou la tolérance à la sécheresse. Dans les études sur

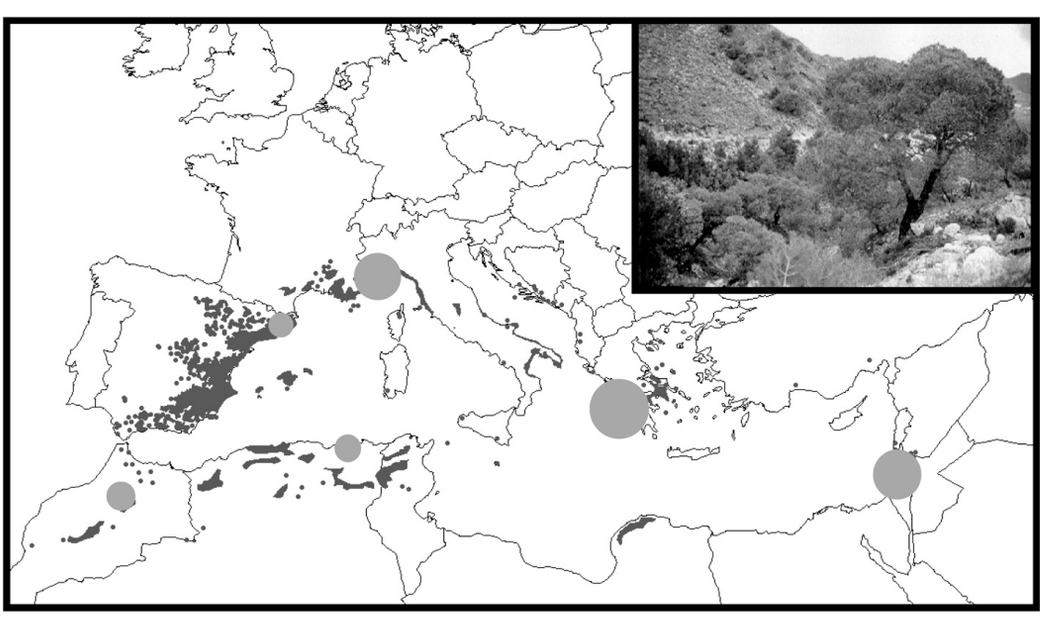

Fig. 1 : Carte de répartition de *P. halepensis* (gracieusement fournie par EUFORGEN, le programme européen de conservation des ressources génétiques forestières) et la diversité moyenne des nucléotides (estimée par π, la différence moyenne intrapopulationnelle par paire parmi les séquences) de dix gènes-candidats de réponse à la sécheresse (la taille des disques est proportionnelle au niveau de diversité nucléotidique).

les pins rapportées ici (voir les détails dans GRIVET *et al.* 2009, 2010 et JARAMILLO-CORREA *et al.* 2010), nous nous sommes concentrés sur les familles de gènes qui sont connues pour être sur-exprimées au cours de la sécheresse et de la phase ultérieure de récupération (tels que différentes déhydrines), ainsi que sur certains gènes ayant des rôles majeurs dans les mécanismes généraux de réponse au stress (comme le 4-coumarate : CoA ligase, 4CL, gène). Ces gènes ont aussi des liens fonctionnels avec les mécanismes globaux de réponse à la sécheresse qui ont été étudiés pour des espèces modèles, notamment chez *Arabidopsis* et différentes espèces cultivées. Par exemple, les déhydrines agissent comme des stabilisateurs de structure ayant des propriétés de protéine-chaperon chez plusieurs espèces de plantes (CLOSE 1997). Après la sélection d'un ensemble de gènes pertinents, nous avons tâché d'obtenir un échantillon de séquences au niveau de la population (typiquement, dix méga-gamétophytes, le tissu haploïde des graines de pin, ont été séquencés pour chaque population) couvrant toute la gamme de l'espèce et de populations cibles. Par exemple, 77 à 122 individus (selon le gène) ont été séquencés chez le pin maritime, incluant les populations de la côte humide atlantique (1235 mm de précipitations annuelles) et les populations des zones arides dans le sud de l'Espagne (357 mm de précipitations annuelles). Enfin, une série de tests de neutralité de nouvelle génération a été effectuée (tels que les tests composés de Zeng, ZENG *et al.* 2007) pour détecter les signatures de la sélection intervenant à différentes échelles temporelles ; nous avons aussi cherché des corrélations entre les fréquences d'allèle/haplotype dans les gènes-candidats et les variables climatiques sous l'hypothèse que ces corrélations pourraient dévoiler les gènes qui sous-tendent l'adaptation aux variations des facteurs environnementaux.

Les niveaux de diversité en nucléotides dans les gènes-candidats de réponse à la sécheresse étaient plus élevés dans *P. pinaster* que dans *P. halepensis*, malgré son étroite répartition en région méditerranéenne. Des différences au sein des espèces se sont aussi révélées dans la distribution d'haplotype pour chaque espèce, avec *P. pinaster* qui montre beaucoup d'haplotypes différents à des fréquences similaires, et *P. halepensis* qui montre moins d'haplotypes avec seulement un seul qui est commun, quasiment figé. Les faibles niveaux de diversité en nucléotides chez le pin d'Alep sont davantage notables dans l'ouest de son aire de répartition (Cf. Fig. 1 et GRIVET *et al.* 2009) où la plupart des gènes étaient figés ou presque figés pour des haplotypes particuliers (Cf. Fig. 2), une conséquence probable de la vaste colonisation de la Méditerranée occidentale par d'anciennes populations de pins d'Alep de Grèce et de Turquie, et un impact plus important des glaciations dans cette frange de l'espèce. Des analyses moléculaires ont aussi révélé un goulot d'étranglement intense et relativement récent chez le pin d'Alep, ainsi qu'une division entre les populations Nord-Africaines et Ibériques des espèces bien antérieure au dernier maximum glaciaire, bien que pas aussi ancienne que celle estimée pour le pin maritime (JARAMILLO-CORREA *et al.* 2010). Au contraire, le pin maritime semble abriter une diversité abondante de ces gènes, grâce à une démographie plus stable. D'autre part, à cause de sa

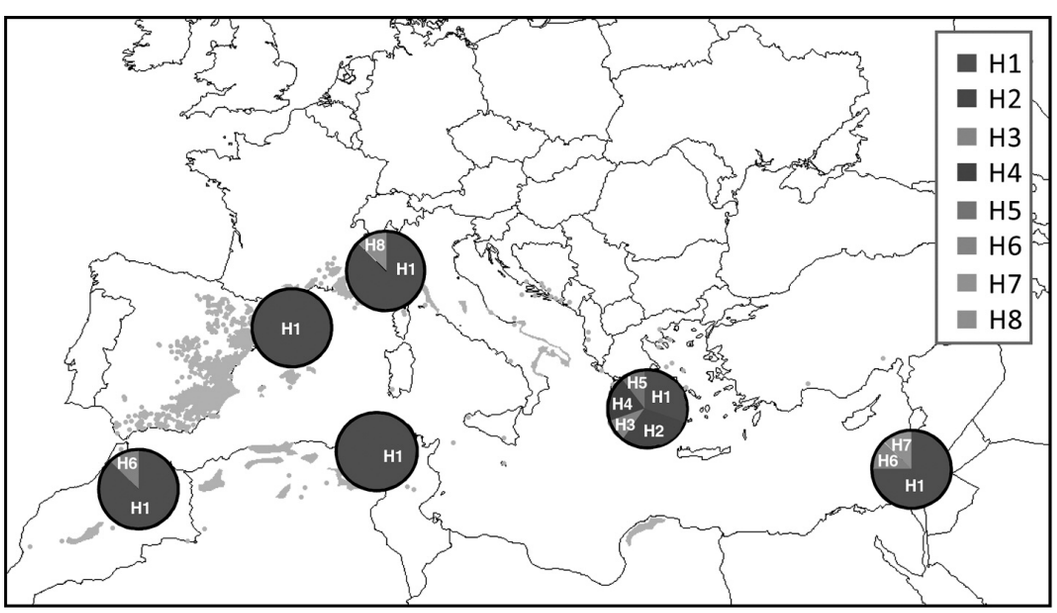

Fig. 2 :
Distribution des haplotypes du gène-candidat dhn1 superposé sur la carte de répartition de *P. halepensis*. La faible diversité de ce gène dans la région occidentale est remarquable.

Santiago C. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ
Delphine GRIVET
Unité d'écologie et de génétique forestières, Centre de recherche forestière (CIFOR), INIA, Madrid (Espagne)
Mél : santiago@inia.es

Giovanni G. VENDRAMIN
Institut de Génétique des Plantes, Division de Florence, Comité national de recherche, Sesto Fiorentino, Florence Italie

distribution davantage mésique, une hétérogénéité environnementale plus grande (de l'aride à l'humide) aurait résulté en des pressions sélectives contrastées de nature à augmenter le niveau général de diversité au niveau des gènes-candidats.

La réponse à la sécheresse est un trait extrêmement complexe, car les arbres forestiers utilisent des stratégies très différentes pour affronter la sécheresse. De plus, les réponses à la sécheresse font appel à plusieurs processus métaboliques interférents et pas complètement connus. Cette flagrante nature "polygénique" de la réponse à la sécheresse laisse supposer que seuls quelques gènes ont un rôle majeur, alors que la plupart des processus liés à la sécheresse seraient contrôlés par un nombre important de gènes ayant un rôle mineur, et par leurs interactions. L'étude exhaustive d'un gène-candidat relatif aux traits de sécheresse est encore manquante pour la plupart des essences forestières, mais, à en juger par d'autres caractères mieux connus, des polymorphismes dans les gènes-candidats avec des effets phénotypiques supérieurs à 5% de la variance du trait demeureraient rares (voir, par exemple, MARTÍNEZ *et al*. 2007 pour les traits de propriété du bois, ou HOLLIDAY *et al*. 2010 pour le débourrement et la tolérance au froid). Néanmoins, en utilisant un large champ de tests de neutralité, on a trouvé certains des gènes-candidats étudiés évoluant selon des schémas non neutres. Curieusement, deux d'entre-eux ont montré des corrélations statistiques avec les variables de température, en particulier avec des températures extrêmement élevées ou basses, et pourraient constituer des outils de grande valeur pour le suivi de la diversité génétique adaptative chez ces deux pins méditerranéens.

Conclusions

Bien que, jusqu'à présent, la découverte de la variation adaptative au niveau moléculaire (c'est-à-dire des marqueurs fonctionnels) ne progresse que lentement dans les espèces non-modèles, des premiers travaux comme celui présenté ici illustrent le grand potentiel de ces outils dans l'identification de populations propices pour la conservation génétique ainsi que des facteurs environnementaux favorisant l'adaptation des arbres forestiers. Ces approches sont également très prometteuses pour la prédiction du phénotype dans les programmes d'amélioration et les plantations. Dans l'avenir, il est prévu que les techniques moléculaires basées sur des polymorphismes de gènes-candidats seront utilisés pour surveiller les changements dans la composition génétique des populations à travers le temps et l'espace, et pour évaluer la réponse génétique des arbres forestiers aux futurs changements climatiques et environnementaux.

S.G.M., D.G., G.V.

Références

Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S. 2008. Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications* 1: 95-111.

Bucci G, González-Martínez SC, Le Provost G, Plomion C, Ribeiro MM, Sebastiani F, Alía R, Vendramin GG. 2007. Range-wide phylogeography and gene zones in *Pinus pinaster* Ait. revealed by chloroplast microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 16: 2137-2153.

Burban C, Petit RJ. 2003. Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Mol. Ecol.* 12: 1487-1495.

Close T. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* 100: 291-296.

Giorgi F, Lionello P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob. Planet. Change* 63: 90-104.

González-Martínez SC, Wheeler NC, Ersoz E, Nelson CD, Neale DB. 2007. Association genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood property traits. *Genetics* 175: 399-409.

Grivet D, Sebastiani F, González-Martínez SC, Vendramin GG. 2009. Patterns of polymorphism resulting from long-range colonization in the Mediterranean conifer Aleppo pine. *New Phytol.* 184: 1016-1028.

Grivet D, Sebastiani F, Alía R, Bataillon T, Torre S, Zabal-Aguirre M, Vendramin GG, González-Martínez SC. 2010. Molecular footprints of local adaptation in two Mediterranean conifers. Molecular Biology and Evolution (in press; doi: 10.1093/Molbev/msq190).

Holliday JA, Ritlan K, Aitken S. 2010. Widespread, ecologically relevant genetic markers developed from association mapping of climate-related traits in Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *New Phytol.* 188: 501-514.

Jaramillo-Correa JP, Grivet D, Terrab A, Kurt Y, de-Lucas AI, Wahid N, Vendramin GG, González-Martínez SC. 2010. The Strait of Gibraltar as a major biogeographic barrier in Mediterranean conifers: a comparative phylogeographic survey. *Mol. Ecol.* 19: 5452-5468.

Petit RJ, Hu FS, Dick CW. 2008. Forests of the past: A window to future changes. *Science* 320: 1450-1452.

Voltas J, Chambel M, Prada M, Ferrio J. 2008. Climate-related variability in carbon and oxygen stable isotopes among populations of Aleppo pine grown in common-garden tests. *Trees Struct. Funct.* 22: 759-769.

Zeng K, Shi S, Wu CI. 2007. Compound tests for the detection of hitchhiking under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1898-1908.