

Évaluer l'effet du temps et de la méthode de conservation du matériel végétal sur la quantité et la qualité de l'ADN extrait

Matthieu LINGRAND¹
Caroline SCOTTI-SAINTAGNE¹
Sylvie ODDOU-MURATORIO¹
Marianne CORREARD²
Olivier GILG²
Franck REÏ²
Anne ROIG¹
Patrice BRAHIC³

CORRESPONDANCE

matthieu.lingrand@inrae.fr

RÉSUMÉ

L'URFM stocke plus de 40 000 échantillons végétaux soit à -20 °C soit à température ambiante après déshydratation. Le projet présenté dans cet article avait pour but d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN obtenu à partir d'échantillons de quatre espèces d'arbres méditerranéens faisant l'objet de recherches récurrentes à l'URFM : trois conifères (le pin de Salzman, le sapin pectiné et le cèdre de l'Atlas) et un feuillu (le hêtre commun). L'hypothèse retenue est que la durée de conservation a un effet sur la qualité du matériel génétique ; nous n'avons aucun a priori sur l'effet de la méthode de conservation. Pour mesurer la qualité de l'ADN, nous avons effectué des analyses de génotypage et de séquençage couramment utilisées au laboratoire. Nos résultats montrent une variation entre les quatre espèces étudiées, en fonction du mode et de la durée de conservation, sur la quantité et la qualité de l'ADN. De plus, nous avons montré que les échantillons conservés sur la plus longue période ou avec la méthode la plus basique (à sec) présentent une bonne qualité d'ADN contrairement à des échantillons plus récents.

MOTS-CLÉS

Biologie moléculaire, échantillons végétaux, qualité ADN, stockage.

1 INRAE, UR629 Écologie des Forêts Méditerranéennes (URFM), Domaine Saint Paul, Site Agroparc, FR-84914 Avignon Cedex 9, France.

2 INRAE, UE0348 Unité Expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne. INRA-UEFM Domaine Saint Paul, Site Agroparc 84914 Avignon, France.

3 Office National des Forêts, Pôle National des Ressources Génétiques Forestières, Route du barrage 13115 Saint Paul Lez Durance, France.

Assessing the effect of time and conservation method of plant material on the quantity and quality of extracted DNA

Matthieu LINGRAND¹

Caroline SCOTTI-SAINTAGNE¹

Sylvie ODDOU-MURATORIO¹

Marianne CORREARD²

Olivier GILG²

Franck REÏ²

Anne ROIG¹

Patrice BRAHIC³

CORRESPONDENCE

matthieu.lingrand@inrae.fr

ABSTRACT

URFM stores more than 40,000 plant samples either at -20°C or at room temperature after dehydration. The aim of the project presented in this article was to assess the quantity and quality of DNA obtained from samples of four Mediterranean tree species. To evaluate DNA quality, we performed genotyping and sequencing analyses commonly used in the laboratory. Our results showed a variation among species in the quantity and the quality of DNA as a function of the method and duration of sample conservation. In addition, samples kept over the longest period or with the most basic (dry) method were not those with the poorest DNA quality

KEYWORDS

Molecular biology, plant samples, DNA quality, storage.

1 INRAE, UR629 Écologie des Forêts Méditerranéennes (URFM), Domaine Saint Paul, Site Agroparc, FR-84914 Avignon Cedex 9, France.

2 INRAE, UE0348 Unité Expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne. INRA-UEFM Domaine Saint Paul, Site Agroparc 84914 Avignon, France.

3 Office National des Forêts, Pôle National des Ressources Génétiques Forestières, Route du barrage 13115 Saint Paul Lez Durance, France.

Introduction

Les établissements de recherche se sont engagés dans une nouvelle organisation de leurs infrastructures de recherche pour en faire des lieux de production et de collecte des données mieux partagés entre les équipes d'un même organisme et avec ses partenaires (chantiers #OpenScience et #OpenData). Beaucoup d'efforts sont ainsi consacrés à INRAE et dans d'autres établissements de recherche pour archiver, traiter et partager les données expérimentales acquises au cours des programmes de recherche. En amont des données proprement dites, se pose la question de la conservation et du suivi de la qualité des échantillons de matériel végétal ou animal qui ont permis d'acquérir ces données.

Le cas de la conservation des échantillons végétaux à l'URFM (Unité de Recherche en écologie des Forêts Méditerranéennes) illustre bien cette problématique. Dans le cadre de ses recherches sur la dynamique des écosystèmes forestiers méditerranéens, l'URFM et son partenaire l'UEFM (Unité expérimentale Entomologie et Forêt Méditerranéenne) ont mis en place un dispositif de conservation des échantillons végétaux, constitués de feuilles et de graines. Ce dispositif recouvre la gestion physique et le suivi des échantillons dans les enceintes de stockage, mais aussi leur intégration dans une base de données (BDD), créée en interne (par C. Pichot), afin de tracer l'origine du matériel récolté, le localiser dans les enceintes et gérer les quantités de matériel restantes au fil du temps. Cette BDD compte actuellement plus de 40 000 échantillons. Ces échantillons ont été collectés dans des peuplements divers, parfois éloignés du laboratoire, et sur des arbres qui ont pu mourir depuis la collecte du matériel, ce qui les rend d'autant plus précieux. Beaucoup de ces échantillons ont été utilisés pour générer des données (par génotypage et séquençage) dans le cadre de projets scientifiques de biologie et génétique des populations, mais une partie n'a encore jamais fait l'objet d'analyses. L'objectif de la conservation de ces échantillons est de disposer facilement de matériel pour de futures analyses (par exemple, avec de nouvelles techniques de biologie moléculaire), dans le cadre de projets de l'URFM ou en partenariat. Néanmoins, cela nécessite de s'assurer de la bonne qualité de la conservation du matériel. En outre, la multiplication du nombre d'échantillons stockés nous contraint à faire des choix en matière de mode de conservation. Initialement, deux modes de conservation étaient utilisés : (1) une enceinte de stockage à -20 °C et (2) un congélateur à -80 °C. En 2012, un troisième mode de stockage a commencé à être utilisé, le stockage d'échantillons

« secs » après leur déshydratation à l'étuve.

La qualité de l'ADN nécessaire pour les analyses de biologie moléculaire reste en effet largement méconnue (méthode de dosage, présence d'inhibiteurs, taille des fragments), ainsi que l'effet du mode et de la durée de conservation de l'échantillon végétal. Il serait en particulier souhaitable de déterminer une « date de péremption » pour les échantillons que nous conservons.

De façon générale, nous avons deux hypothèses. La première considérait que la conservation du matériel à -20 °C devrait permettre d'avoir une meilleure qualité et quantité d'ADN que la conservation à sec. Toutefois, les aléas associés aux enceintes froides (problèmes de décongélation partielle des échantillons lors de pannes ou de leur manipulation) pourraient réduire cette qualité/quantité d'ADN. La deuxième hypothèse était que la qualité et quantité d'ADN diminuent avec la durée de conservation.

L'objectif du projet présenté ici, pour lequel nous avons demandé l'appui du département EFPA (Écologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques), est d'étudier **l'impact du mode et de la durée de conservation du matériel végétal sur la quantité et la qualité de l'ADN utilisé pour des projets scientifiques mettant en œuvre des techniques de biologie moléculaire.**

Pour atteindre cet objectif, nous avons mesuré l'effet du mode et de la durée de conservation des échantillons végétaux sur la qualité et la quantité de l'ADN extrait à partir d'un lot de 48 échantillons choisis parmi les 40 000 stockés. La qualité et la quantité d'ADN ont été évaluées par différentes approches utilisées en routine au laboratoire et systématiquement comparées entre échantillons conservés et témoins « frais » récoltés sur le terrain juste avant les analyses.

Matériels et méthodes

Afin de limiter les coûts du projet liés à la récolte des échantillons témoins, les individus sélectionnés pour les analyses ont été choisis en fonction de leur situation géographique (à proximité de l'URFM et sur des sites régulièrement visités). Les analyses en laboratoire ont été effectuées au sein du LBM (Laboratoire de Biologie Moléculaire), plateforme régionale qui accueille différentes unités du centre de recherche d'Avignon.

Par ailleurs, nous avons optimisé l'analyse en tenant compte des contraintes techniques du laboratoire. Par exemple, le séquenceur utilisé étant limité à 48 échantillons par passage, nous nous sommes basés sur ce nombre pour définir le plan d'expérience du projet (Annexe 1). Enfin,

nous avons dupliqué cette plaque pour tester la reproductibilité de nos résultats.

Sélection des échantillons conservés et de leur témoin positif

Nous avons sélectionné les échantillons pour cette étude en interrogeant la BDD. Les critères de sélection ont été : la situation géographique des arbres d'origine des prélèvements, la durée de conservation des échantillons et la méthode de stockage des échantillons. Enfin, nous nous sommes concentrés sur quatre espèces d'arbres forestiers faisant l'objet de recherches récurrentes à l'URFM : trois conifères (le pin de Salzman, le sapin pectiné et le cèdre de l'Atlas) et un feuillu (le hêtre commun). En intégrant ces différentes contraintes, nous avons analysé un total de 23 échantillons de cèdre (correspondant à 13 individus, 3 durées de conservation et 2 méthodes de stockage), 23 échantillons de sapin (correspondant à 5 individus, 3 durées de conservation et 2 méthodes de stockage), 24 échantillons de hêtre (correspondant à 14 individus, 4 durées de conservation et 2 méthodes de stockage), 24 échantillons de pin de Salzman (correspondant à 18 individus, 5 durées de conservation et 1 méthode de stockage) et, enfin, 2 échantillons négatifs. Les échantillons négatifs correspondent à deux puits vides en pré-extraction qui vont suivre l'ensemble du processus et sont utilisés pour mettre en évidence une potentielle contamination (Annexe 1).

Pour chaque espèce, entre 5 et 8 échantillons témoins positifs ont été pré-sélectionnés au laboratoire. Pour chaque échantillon témoin, un arbre remplaçant a également été choisi pour prévenir les éventuels aléas de la récolte (arbre mort ou difficile à retrouver sur le terrain). Ces témoins positifs (« échantillons frais ») ont été prélevés sur trois sites (le Ventoux pour le sapin et le hêtre, la plantation comparative du Treps pour le cèdre et la pépinière de Cadarache pour le pin de Salzman).

Récolte et mise en plaque

La semaine précédant la récolte des témoins positifs, les échantillons conservés et enregistrés en BDD ont été extraits des enceintes climatiques et mis en plaque. Deux plaques identiques ont été préparées et stockées à -20 °C.

La semaine de la récolte, les prélèvements de feuilles et d'aiguilles ont été réalisés en double, sur trois jours (un jour/site), les échantillons ont été transportés à -170 °C à l'aide de matériel adapté. Les témoins positifs ont été conservés ainsi jusqu'à la mise en plaque.

Analyses au laboratoire

Notre objectif était d'évaluer la qualité des échantillons à l'aide d'analyses classiques, réalisées en routine dans le cadre des projets de biologie moléculaire, couramment mises en œuvre à l'URFM. Toutes ces analyses ont été systématiquement effectuées sur les deux plaques répliquées, sauf le séquençage qui n'a été effectué que sur l'une des deux plaques.

L'ADN des échantillons de feuilles et d'aiguilles a été extrait à l'aide du DNeasy 96 plant kit (Qiagen), puis conservé sous forme aliquotée dans plusieurs plaques.

Un dépôt sur gel d'agarose à 1 % a tout d'abord été réalisé afin d'apprécier visuellement la qualité globale de l'ADN et de mettre en évidence d'éventuelles dégradations avec la présence de « smears » (trainées). Les résultats du gel ont été notés sous forme d'une variable à trois catégories : a) présence d'une bande nette (bonne qualité d'ADN) ; b) présence d'une bande dégradée (qualité moyenne) ; c) absence de bande (absence ou faible quantité d'ADN).

La quantité d'ADN a été ensuite évaluée par un dosage au NanoDrop™ (Thermo Scientific). Avec cette approche, la mesure des absorbances du spectre permet de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques. Nous avons aussi dosé l'ADN avec la méthode PicoGreen™ (Invitrogen), basée sur l'utilisation d'un colorant fluorescent spécifique de l'ADN double-brin et considérée comme plus précise que la technique au NanoDrop™.

Deux analyses classiques de biologie moléculaire ont enfin été réalisées : (a) l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex de marqueurs microsatellites spécifiques de chacune des espèces, (b) le séquençage à partir d'amorces trnH-psbA qui ciblent l'ADN chloroplastique, utilisées couramment dans le cadre de projets de code-barres moléculaires ou Barcoding (Annexe 2).

Analyses statistiques

Une analyse de variance de type II a été réalisée pour tester la significativité des principaux effets qui affectent la qualité et la quantité de l'ADN. La masse de matériel pesée au départ a été incluse dans le modèle en co-facteur ainsi que l'effet plaque (analyse répétée sur les deux plaques).

Résultats

Qualité de l'ADN visualisée sur gel d'agarose

Le dépôt sur gel d'agarose a montré une importante variabilité de la qualité de l'ADN entre espèces (Figure 1). Des bandes nettes ont été obtenues pour plus de 70 % des échantillons

de sapin et de pin et pour plus de 50 % des échantillons de cèdre (Tableau 1). En revanche, aucun des 24 échantillons de hêtre du projet ne présentait de bande nette. Des variations ont également été observées pour les témoins positifs avec 57 % de bandes nettes pour le cèdre, 80 % pour le sapin, 100 % pour le pin et aucune bande nette pour le hêtre, alors qu'on aurait pu s'attendre à 100 % de bandes nettes avec ce matériel frais. L'état du matériel récolté (phase du cycle de l'arbre en fonction de la saison) et les aléas liés au transport et au stockage de matériel frais expliquent probablement les proportions obtenues plus faibles que celles attendues.

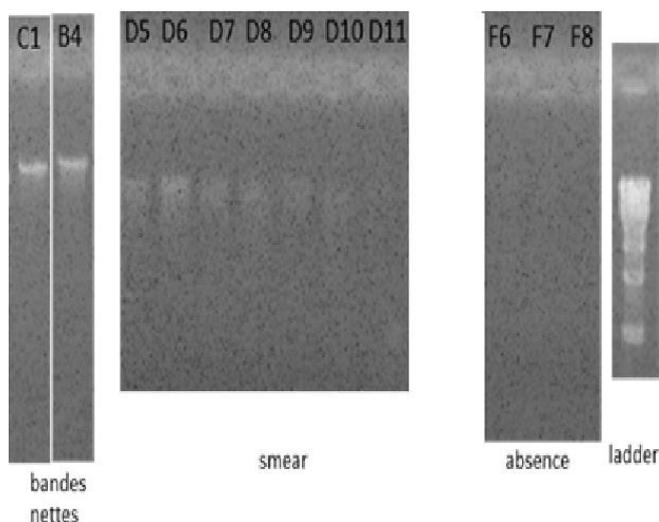


Figure 1. Exemple de visualisation de la qualité de l'ADN sur gel agarose 1 % en tampon d'électrophorèse TAE 1X.

Ce gel montre différents dépôts de 5µl ADN + 2µl tampon de charge + 5µl d'eau avec une échelle de poids moléculaire avec 2µl de 100bp DNA Ladder (PROMEGA). L'indication au-dessus des puits correspond à la position des échantillons sur la plaque.

Tableau 1 : Pourcentage de bandes nettes observées pour chaque espèce selon le mode de conservation

ESPÈCE	Pourcentage			
	TOTAL (TÉMOINS POSITIFS INCLUS)	POUR LES TÉMOINS POSITIFS	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À SEC
CÈDRE	57	57	58	50
HÊTRE	0	0	0	0
PIN	71	100	61	NA*
SAPIN	74	80	80	33

* NA. non analysable par absence de matériel de ce type

L'ANOVA a permis de mesurer quantitativement l'effet de la méthode de conservation sur la qualité de l'ADN, évaluée par la présence de bandes nettes sur gel d'agarose. Pour toutes les espèces, le témoin (frais de l'année) donne toujours une proportion égale ou supérieure (Tableau 1) de bandes nettes. Pour le cèdre et le hêtre, la méthode de conservation (-20 °C ou à sec) ne joue pas sur la proportion de bandes nettes. En revanche, pour le sapin, le matériel sec est déconseillé pour avoir une bande nette sur agarose.

Concernant l'effet de la durée de conservation, nos résultats suggèrent une diminution de la qualité de l'ADN pour les échantillons conservés à -20 °C avec l'augmentation de la durée de conservation pour le pin (hors année 2011) et le sapin. Les six témoins positifs de pin testés présentent une bande nette, les échantillons de pin de 2012 et de sapin de 2011 et 2012 présentent 100 % de bandes nettes et le pourcentage descend à 33 % pour les échantillons de pin de 2008 et à 50 % pour les sapins de 2007 (Tableau 2).

Tableau 2 : Pourcentage de bandes nettes observées pour chaque espèce en fonction du temps de conservation pour les échantillons stockés à -20 °C

Pourcentage de bandes nettes								
	CÈDRE		PIN		SAPIN		HÊTRE	
TÉMOINS POSITIFS	57		100		80		0	
ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	Année	%	Année	%	Année	%	Année	%
	2001	71	2008	33	2007	50	2004	0
	2008	40	2009	67	2011	100	2008	0
			2010	67	2012	100		
			2011	50				
			2012	100				
	58		61		80		0	

Si la qualité de l'ADN est jugée satisfaisante dès lors qu'une bande, nette ou dégradée, est observée, la proportion d'échantillons de qualité correcte augmente (Tableau 3). Cela est particulièrement visible pour les échantillons conservés à -20 °C. Les résultats changent notablement pour le

Tableau 3 : Pourcentage de bandes nettes ou dégradées observées pour chaque espèce selon le mode de conservation

Pourcentage de bandes nettes ou dégradées				
ESPÈCE	TOTAL (TÉMOINS POSITIFS INCLUS)	POUR LES TÉMOINS POSITIFS	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	POUR LES ÉCHANTILLONS STOCKÉS À SEC
CÈDRE	74	57	100	50
HÊTRE	63	87	50	50
PIN	92	100	89	NA*
SAPIN	83	80	87	33

* NA : non analysable par absence de matériel de ce type

hêtre, pour lequel plus de 60 % des échantillons présentent une bande dégradée. Deux groupes se distinguent : (1) les témoins positifs et les échantillons conservés à -20 °C qui ont une qualité satisfaisante avec un pourcentage égal ou supérieur à 50 %, (2) la condition « à sec » avec un pourcentage inférieur ou égal à 50 %. Avec ce critère de qualité, les résultats sur le hêtre rejoignent ceux obtenus sur les autres espèces. De plus, il est également observé pour le hêtre une meilleure qualité des ADN pour les échantillons récents par rapport aux échantillons plus anciens (Tableau 4). Contrairement aux attendus pour le cèdre, nous obtenons le résultat inverse, à savoir 57 % de qualité satisfaisante pour les témoins positifs, 80 % de qualité satisfaisante pour les échantillons prélevés en 2008 et, enfin, 100 % de qualité satisfaisante pour les échantillons récoltés en 2001 (Tableau 4). Les hypothèses pour expliquer les données obtenues chez le cèdre, mais que nous n'avons pas été en capacité de vérifier, peuvent être en lien avec la période de l'année à laquelle a été réalisé le prélèvement (ce qui peut affecter la qualité de l'ADN extrait) ou à une défaillance technique du congélateur contenant les échantillons.

Quantité d'ADN évaluée par dosage

Tableau 4 : Pourcentage de bandes nettes et dégradées observées pour chaque espèce en fonction du temps de conservation pour les échantillons stockés à -20 °C

Pourcentage de bandes nettes								
	CÈDRE		PIN		SAPIN		HÊTRE	
TÉMOINS POSITIFS	57		100		80		0	
ÉCHANTILLONS STOCKÉS À -20 °C	Année	%	Année	%	Année	%	Année	%
	2001	100	2008	66	2007	75	2004	20
	2008	80	2009	67	2011	100	2008	100
			2010	100	2012	100		
			2011	100				
		2012	100					
	58		89		87		50	

Avec la méthode NanoDrop™, les mesures montrent une grande variabilité de la concentration en ADN pour les échantillons, qui peut aller de 1 à 120 ng/μl par exemple pour le pin (Figure 2). Les concentrations moyennes d'ADN par espèces obtenues avec le dosage au PicoGreen™ et le NanoDrop™ sont en général proches (Tableau 5). Le pin est l'espèce pour laquelle nous obtenons le meilleur rendement, suivi par le sapin, le hêtre et enfin le cèdre. Il est également à noter que la différence des moyennes des concentrations en ADN entre les deux plaques répétées est faible (de l'ordre de 0.5 ng/μl).

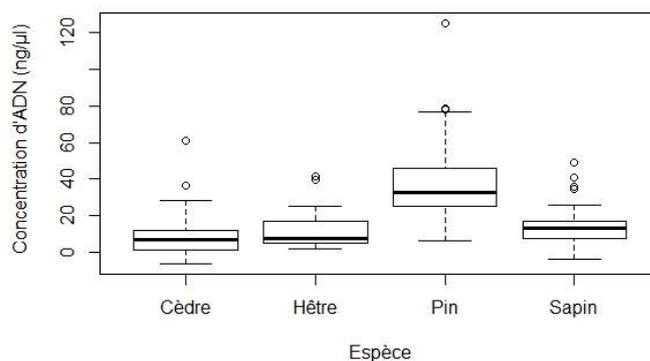


Figure 2. Quantité d'ADN (mesure avec le NanoDrop™) pour l'ensemble des échantillons d'une espèce donnée.

Tableau 5 : Comparaison de la quantité moyenne d'ADN obtenue pour les différentes espèces et avec 2 méthodes de dosage

ESPÈCE	Concentration moyenne d'ADN (en ng/μl)			
	PIN	SAPIN	HÊTRE	CÈDRE
DOSAGE NANODROPTM	57.41	21.16	12.06	3.79
DOSAGE PICOGREEN™	60	24.90	9.96	12.2

Les boîtes représentent l'intervalle interquartile (Q1 et Q3) et la ligne épaisse la médiane. Les extrémités des « moustaches » sont calculées en utilisant 1.5 x l'espace interquartile (la distance entre Q1 et Q3).

Pour les quatre espèces, l'effet de la méthode de conservation sur la concentration d'ADN mesurée avec le NanoDrop™ est significatif (Figure 3). Pour le cèdre, le matériel sec donne la meilleure concentration en ADN, alors que le meilleur mode de conservation pour le hêtre est le stockage à -20 °C, et le matériel frais pour le pin et le sapin. La concentration en ADN n'est pas significativement plus élevée pour le hêtre et le cèdre lorsque du matériel frais est utilisé, contrairement au pin et au sapin. De plus, comme les échantillons conservés à -20 °C sont situés dans

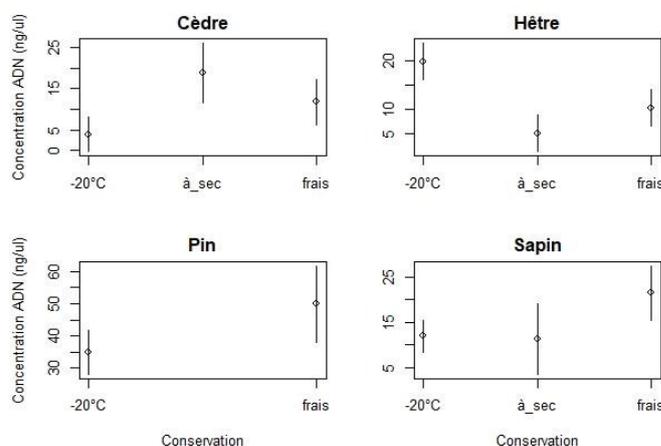


Figure 3. Concentration d'ADN obtenue en fonction de la méthode de conservation et de l'espèce. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.

différentes enceintes (chambre froide ou congélateurs), nous avons pu analyser l'effet enceinte au sein de la modalité « -20 °C » (pour une année donnée et seulement chez le cèdre et le sapin). Les résultats ne montrent pas d'effet significatif de l'enceinte (données non fournies).

Pour les quatre espèces, un effet significatif de l'année de récolte est observé sur la concentration en ADN (Figure 4). On s'attendait à ce que les concentrations d'ADN les plus élevées soient mesurées pour les échantillons récoltés les plus récemment. Cette tendance semble globalement valable pour le cèdre, le pin et le sapin (avec des exceptions), mais moins pour le hêtre. Là encore, l'état du matériel au moment de la récolte (phase du cycle de l'arbre en fonction de la saison) joue probablement un rôle sur la concentration d'ADN.

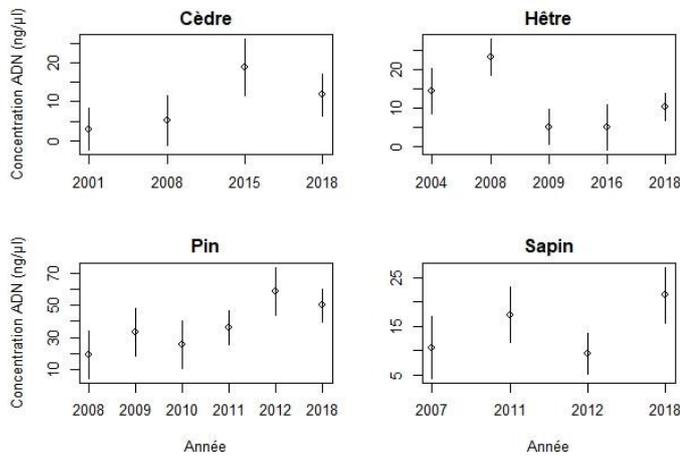


Figure 4. Concentration d'ADN obtenue en fonction de la durée de conservation et de l'espèce. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.

Amplification de marqueurs microsatellites et séquençage

Nous n'avons pas détecté d'effet significatif du mode ou de la durée de conservation sur la hauteur des pics des microsatellites (Figure 5).

La qualité de la séquence d'ADN (la longueur maximale de séquence lue) est significativement moins bonne chez le cèdre lorsque le matériel de départ est sec (Figure 6). Pour les autres espèces, nous ne détectons pas d'effet significatif.

Conclusion

Comme nous nous y attendions, cette étude montre que la qualité et la quantité d'ADN obtenue sont affectées par la durée et le mode de conservation des échantillons

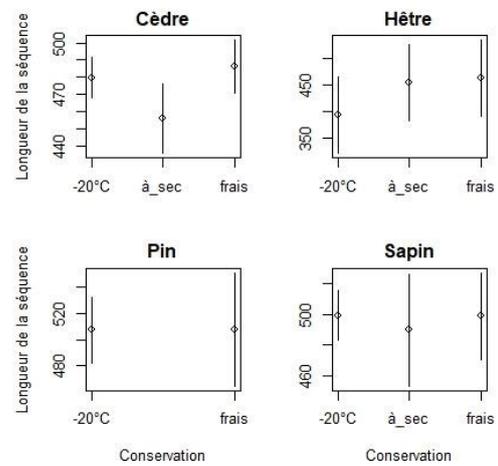


Figure 6. Longueur en bases de la séquence d'ADN lue en fonction de la méthode de conservation. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.

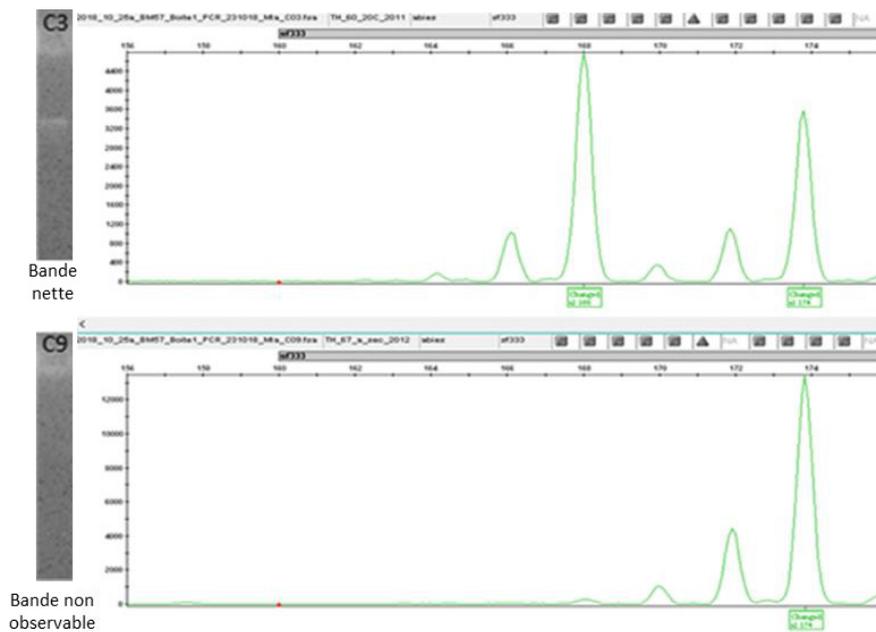


Figure 5. Comparaison de la migration sur gel d'agarose 1% et de la hauteur des pics de microsatellites pour deux échantillons de pin.

végétaux. Contrairement à ce que nous avons envisagé, ce ne sont pas forcément les échantillons frais qui donnent les meilleurs résultats. Il s'avère que le mode de conservation optimal dépend de l'espèce étudiée.

En ce qui concerne le mode de conservation, les plus fortes concentrations d'ADN sont obtenues avec le stockage à sec pour le cèdre, avec la conservation à -20 °C chez le hêtre et avec le matériel frais chez le sapin et le pin. Par contre, le mode de conservation maximisant la concentration d'ADN chez le cèdre est aussi associé à une moindre qualité des séquences obtenues (longueur de séquence lue diminuée). Nos résultats montrent également que, pour toutes les espèces étudiées, l'amplification des microsatellites n'est pas affectée par le mode ou la durée de conservation des échantillons.

En ce qui concerne la durée de conservation, ce ne sont pas toujours les échantillons les plus récents qui présentent la meilleure concentration ou qualité d'ADN, comme cela a été observé chez le hêtre et le cèdre. L'état du matériel au moment de la récolte doit aussi probablement avoir un effet.

Ce travail a d'ores et déjà permis de tirer un certain nombre d'enseignements pour la conservation des échantillons à l'URFM. Pour un usage courant, le mode de conservation à sec sera privilégié, car il ne donne pas de résultats significativement moins bons en termes de qualité et de quantité d'ADN, en revanche il présente l'avantage d'être moins coûteux et plus facile à mettre en œuvre.

Perspectives

Le projet présenté ici a permis d'étudier l'effet du mode et de la durée de conservation des échantillons végétaux sur la qualité de l'ADN extrait, lors de la mise en œuvre de techniques d'analyses de biologie moléculaire utilisées en

routine (amplification de microsatellites ou séquençage avec des amorces pour le barcoding). Il serait toutefois intéressant d'évaluer la qualité de l'ADN à travers d'autres techniques (géotypage SNP, séquençage d'ADN nucléaire, par exemple). Il serait également utile de poursuivre ce projet dans la durée et d'effectuer un nouveau test qualité, dans des conditions similaires, avec une partie au moins des échantillons analysés. Cela permettrait d'affiner l'étude de l'effet de la durée de conservation et, peut-être, de fixer une durée maximale de conservation des échantillons.

Un point soulevé pendant ce projet est la possibilité de conserver les échantillons sous forme d'ADN extrait à partir de matériel frais, plutôt que sous forme d'échantillons végétaux. Dans cette optique, et dans la lignée de ce projet, nous pourrions comparer l'ADN extrait d'échantillons végétaux conservés à -20 °C avec des ADN extraits de ces mêmes échantillons dans le cadre de nos projets de ces dernières années. Un autre point à évaluer concerne la possibilité de lyophiliser les échantillons à sec, avec un lyophilisateur de qualité, plutôt que de les sécher à l'étuve. Dans cette optique, nous envisageons d'évaluer la quantité/qualité de l'ADN extrait à partir d'échantillons végétaux stockés à -20 °C puis lyophilisés.

De plus, dans le cadre d'un autre projet sur le sapin, où une concentration importante en ADN était demandée pour des analyses de séquençage, nous avons effectué plusieurs modifications du protocole d'extraction. Nous sommes ainsi arrivés à multiplier par quatre la quantité d'ADN extraite. Avec ce protocole modifié, et l'obtention d'une plus grande quantité d'ADN sur du matériel pauvre en ADN de bonne qualité, nous pourrions éventuellement obtenir des données de génétique sur du matériel qui jusqu'à présent ne donnait pas de résultats. Des tests complémentaires, en lien avec les essais présentés dans cet article, seraient nécessaires pour valider cette hypothèse. ■

Références

- Dussert S., Engelmann F., Noirot M., 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *Cryo-letters* : 24, 149-160.
- Esnault F., Pellé R., Dantec J.-P., Bérard A., Le Paslier M.-C., Chauvin J.-E., 2016. Development of a potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) core collection, a valuable tool to prospect genetic variation for novel traits. *Potato Research*, 59, 4 : 329-343. DOI 10.1007/s11540-016-9332-x.
- Fabre J. and Dereuddre J., 1990. Encapsulation dehydration - A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters* 11(6) : 413-426.
- Gallard A., 2008. Étude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de ressources génétiques végétales : Compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle *Pélagonium*. Thèse de doctorat. École doctorale d'Angers.
- Huang B., Ruess H., Liang Q., Colleoni C., Spooner D., 2019. Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section *Petota*. *Scientific Reports* 9 : 44-54.
- Hawkes J. G., 1990. *The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, London.
- Marhadour S., Dargier C., Esnault F., Laversin N., Méar A., Perramant M. and Le Hingrat Y., 2014. Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants. *FranceInnovations Agronomiques* 35 : 161-172.
- Mix-Wagner G., 1999. The conservation of potato cultivars. *Potato Research* 42: 427- 436.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Kim H. H., Yoon J. W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F (2006). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species : Critical factors in droplet vitrification. *Cryo-letters* 27(4) : 223-234.
- Reed B (2021). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-letters* 22: 97-104.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama L (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Plant cell reports* vol 9: 30-33.
- Sakai A, Engelmann F (2007). Vitrification, encapsulation-Vitrification and droplet-vitrification : A review. *Cryo-letters* 28(3): 151-172.
- Spooner D., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G. J., 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: N41.
- Spooner D., 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups : An example in wild potatoes. *American journal of botany* 96(6) : 1177-1180.
- Tendille C. and Lecerf M., 1974. La multiplication végétative de l'asperge (*ASPARGUS OFFICINALIS* L.). Action de divers facteurs en particulier la nutrition minérale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance des plantules issues de ces méristèmes et sur la production de plante adultes. *Annales Amélioration des plantes* 24 (3) : 269-282.

Annexe 1 : Plan de plaque indiquant la position des échantillons

Les cellules en jaune correspondent aux échantillons de cèdre de l'Atlas, en vert de sapin pectiné, en bleu de hêtre et en rose de pin de Salzman. TP indique la position du témoin positif avec son espèce et son identifiant. Pour tous les autres échantillons, sont donnés l'identifiant, le mode de conservation et l'année de récolte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TP cèdre BABO118	BABO118 -20°C 2001 VentFey_6 G1_652	BABO118 -20°C 2008 VentFey_6 G1_653	RIAL2_114 -20°C 2001 VentFey_6 G1_654	CHEL_122 -20°C 2001 VentFey_6 G1_655	TIKJ_123 -20°C 2001	CHEL_122 -20°C 2008 Vent_137	TIKJ_123 -20°C 2008	TP cèdre RIAL2_114 ORIJ_142	MGUI2_147 -20°C 2001	TP cèdre VentFey_0 5_26 VentFey_0 5_23	VentFey_0 5_26 -20°C 2008
B	TP cèdre VentFey_6 G1_653	à sec 2015 TH_60	à sec 2015 TH_60	à sec 2015 TH_60	à sec 2015 TH_60	TP cèdre Vent_137 TH_67	-20°C 2001 TH_67	TP cèdre ORIJ_142 TH_67	-20°C 2001 TH_67	TP cèdre eVentFey_0 5_23 TH_100	-20°C 2008 TH_100	Témoin négatif
C	TP sapin TH_60	-20°C 2007 TH_59	-20°C 2011	-20°C 2012 TH_59	à sec 2012 TH_59	-20°C 2012 TH_80	-20°C 2011 TH_80	-20°C 2012 TH_80	à sec 2012	-20°C 2007 TH_100	-20°C 2011	TP sapin TH_67
D	TP sapin TH_59	-20°C 2011 257_2_56a	TH_59 -20°C 2012 257_2_56a à sec 2009	à sec 2012	-20°C 2007	-20°C 2011 257_2_58a à sec 2009	-20°C 2012	-20°C 2007 257_2_64	TP sapin TH_100 257_2_64	-20°C 2012 A7	TP sapin TH_80 B108	Témoin négatif C216
E	TP hêtre 257_2_56a	-20°C 2008 257_2_60a	257_2_60a à sec 2009	TP hêtre 257_2_58a 257_2_62	257_2_58a -20°C 2008 257_2_62	257_2_62	TP hêtre 257_2_64 TP hêtre VTX_68_01	-20°C 2008 individu 1 à sec 2016	à sec 2009 TP hêtre VTX_68_02	numbase 6410 -20°C individu 2 à sec 2016	numbase 6495 -20°C TP hêtre VTX_68_03	numbase 6594 -20°C individu 3 à sec 2016
F	TP hêtre 257_2_60a	-20°C 2008 PNS_1	PNS_2	TP hêtre 257_2_62 PNS_4	-20°C 2008	à sec 2009 PNS_413	ventoux sud PNS_414	PNS_415	ventoux sud TP	PNS_923	ventoux sud PNS_924	PNS_926
G	TP pin PNS_1	-20°C 2008 PNS_31	-20°C 2008 PNS_33	-20°C 2008 PNS_34	TP pin PNS_413	-20°C 2010 PNS_390	-20°C 2010 PNS_391	-20°C 2010 PNS_393	pin PNS_923 TP	-20°C 2012 PNS_689	-20°C 2012 PNS_692	-20°C 2012 PNS_694
H	TP pin PNS_31	-20°C 2009	-20°C 2009	-20°C 2009	TP pin PNS_390	-20°C 2011	-20°C 2011	-20°C 2011	pin PNS_689	-20°C 2011	-20°C 2011	-20°C 2011

Annexe 2 : Amorces et conditions PCR pour les marqueurs microsatellites et l'amplification du fragment de barcoding

Des sets d'amorces microsatellites spécifiques ont été utilisés pour chaque espèce.

Hêtre

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
MFC7	Forward	AAAATACACTGCCCAAAA	(GA) ⁹	Vornam <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	CAGGTTTTGGTTCTTACAC		
Fs3_4	Forward	AGATGCACCACTTCAAATTC	(GCT) ⁶	Pastoreli <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	TCTCCTCAGCAACATACCTC		
Fs1_15	Forward	TCAAACCCAGTAAATTTCTCA	(GA) ²⁶	Pastoreli <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	GCCTCAATGAACTCAAAAAC		
Sfc1143	Forward	TGGCATCCTACTGTAATTTGAC	(AG) ²¹	Asuka <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	ATCCACCCACCATCTGTC		
Sfc0007-2	Forward	TGTCGCAAACATTGACAAGG	(AG) ²⁴	Asuka <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	GTGGATGTGAGGTCGTTGG		

Cèdre de l'Atlas

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
D4	Forward	GCTTTACGCAATTCCTCCTATG	(TC) ⁸ (AC) ⁶	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	TGAGAATTGTGAACCATTGAAAG		
C6	Forward	GGGTTATAAGTTTAATTATATGTGTG	(GT) ²⁷ (GA) ¹⁴	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	CACCACCTTGACTTCCCTTG		
D12	Forward	TGGTTTTCCACCTTAGTTTCC	(TC) ¹⁵	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	GGGATGGAAGGAATAAGATAGAGG		
Pt15169	Forward	CTGGATGGAATAGCAGCC	(C) ⁸ (T) ⁸ A(T) ⁸	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	GGAAGGGCATTAAAGTCATTA		

Sapin pectiné

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
SF333	Forward	ATTTGTTCAITTTGGTCCTG	(CA)12(TA)4	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	ACACAGGAAAAAGTCGGTAA		
SF1	Forward	TTGACGTGATTAACAATCCA	(CCG)9	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	AAGAACGACACCATTCTCAC		
SF50	Forward	CATTTGGTGCGGTTCAITTC	(GT)11(GC)10	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	AGTGGCATTTCACITATTGG		
SF78	Forward	FAM-CATTTGTTGTCITTTGTTTACA	(CGCA)8-(CA)15G(CA)8	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	TGCACCGTTTTGTTTTCC		

Pin de Salzmann

NOM DE L'AMORCE	SENS DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	MOTIF	BIBLIOGRAPHIE
Pt1254	Forward	CAATTGGAATGAGAACAGATAGG	(T)17	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	TGCGTTGCACTTCGTTATAG		
Pt15169	Forward	CTTGATGGAATAGCAGCC	(C)8(T)8A(T)8	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	GGAAGGGCATAAGGTCATTA		
Pt87268	Forward	GCCAGGGAAAATCGTAGG	(T)14	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	AGACGATTAGACATCAACCC		
Pt30204	Forward	TCATAGCGGAAGATCCTCTTT	(A)12(G)10	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	CGGATTGATCCTAACCATACC		

Les compositions des mélanges réactionnels de PCR sont différentes entre les espèces :

Mélange réactionnel de PCR pour le hêtre

MÉLANGE RÉACTIONNEL GLOBAL	CONCENTRATION FINALE DANS LE TUBE	VOLUME POUR 1 ÉCHANTILLON (EN µL)	VOLUMES PRÉLEVÉS POUR 100 ÉCHANTILLONS (EN µL)
PCR MASTER MIX (QIAGENTM)	1X	5	500
PRIMERS À 100µM	0.2µM	0.02	2*
Q_SOLUTION (QIAGENTM)	0.5X	1	100
H2O QSP		9	900

*2µl par primer utilisé

Mélange réactionnel pour les PCR sur conifères

MÉLANGE RÉACTIONNEL GLOBAL	CONCENTRATION FINALE DANS LE TUBE	VOLUME POUR 1 ÉCHANTILLON (EN µL)	VOLUMES PRÉLEVÉS POUR 100 ÉCHANTILLONS (EN µL)
PCR MASTER MIX (QIAGENTM)	1X	5	500
PRIMERS À 100µM	0.2µM	0.02	2*
Q_SOLUTION (QIAGENTM)	0.5X	1	100
H2O QSP		9	900

*2µl par primer utilisé

Programme PCR

94 °C durant 15 min (activation de la Taq HotStart présente dans le PCR Master Mix)

94 °C durant 30 s (dénaturation de l'ADN)

57 °C durant 90 s (hybridation des amorces)

72 °C pendant 90 s (élongation des brins d'ADN)

72 °C durant 20 min pour l'élongation finale

4 °C pendant 1 min pour faire redescendre la température et stopper l'activité enzymatique de la Taq polymerase

Amorces barcoding utilisées

CIBLE	NOM DE L'AMORCE	SÉQUENCE (DE 5' -> 3')	BIBLIOGRAPHIE
TRNH_2	trnH(GUG)f_HC	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Tate et Simpson, 2003
	psbAr_HC	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.