

Evaluation de l'effet de la conservation du matériel végétal sur la quantité et la qualité de l'ADN, en vue de la mise en place d'une politique de gestion du stockage des échantillons.

Matthieu Lingrand¹ ; Caroline Scotti-Saintagne¹ ; Sylvie Oddou-Muratorio¹

Marianne Correard² ; Olivier Gilg² ; Franck Rei² ; Anne Roig¹

Patrice Brahic³

¹ : INRAE, UR629 Ecologie des Forêts Méditerranéennes (URFM), Domaine Saint Paul, Site Agroparc, FR-84914 Avignon Cedex 9, France. matthieu.lingrand@inrae.fr

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

Matthieu Lingrand	Technicien de Recherche à l'URFM (UR629) où je réalise l'empreinte génétique des arbres en utilisant la technique des marqueurs microsatellites en multiplex. J'ai intégré récemment l'unité ECOBIOP dans laquelle mon travail porte sur le poisson à travers des activités de biologie moléculaire et d'élevage.
Caroline Scotti-Saintagne	Ingénieure de Recherche à l'URFM (UR624). Mes travaux en génétique des populations permettent de reconstruire l'histoire évolutive des forêts méditerranéennes et d'étudier leur capacité à évoluer dans un contexte de changement climatique.
Sylvie Oddou-Muratorio	Directrice de recherches et généticienne à l'URFM (UR629) puis à ECOBIOP (UMR 5254). Mes travaux cherchent à évaluer la contribution de l'adaptation génétique à la réponse des populations d'arbres forestiers ou de poissons diadromes à des variations de leur environnement sur un petit nombre de générations.
Marianne Correard	Technicienne Responsable Base de Données à l'UEFM (Mise à jour des bases, travail en étroite collaboration avec les équipes de terrains).
Olivier Gilg	Technicien de recherche à l'UEFM. Référent phénologie de l'unité et technicien dans l'équipe Sites ateliers.
Franck Rei	Technicien équipe sites ateliers et Co-gestionnaire des dispositifs Sud Est du réseau de GÉNétique Forestière pour la Recherche (GEN4X).
Anne Roig	Ingénieur d'étude en biologie moléculaire dans l'unité de recherche Ecologie des Forêts Méditerranéennes - URFM (UR 629). J'exerce mon activité sur la Plateforme Régionale du centre INRAE PACA - LBM - (site d'Avignon). Les thématiques sur lesquelles je suis impliquée ont pour objectif la compréhension du fonctionnement de la dynamique et de la diversité des écosystèmes forestiers méditerranéens (arbres et insectes).

Patrice Brahic

Responsable de la pépinière de Cadarache, ONF.

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 a eu pour but d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN obtenu à partir d'échantillons de quatre espèces d'arbres méditerranéens. 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) ne sont pas ceux qui présentent la moins bonne qualité d'ADN.

Mots-clés : Biologie moléculaire, échantillons végétaux, qualité ADN, stockage

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 evaluate 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 in function of the method and duration of sample conservation. In addition, samples retained over the longest period or with the most basic (dry) method are not those with the poorest DNA quality.

Keywords : Molecular biology, plant samples, DNA quality, storage

Contexte et objectif

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.

L'objectif de ce projet, pour lequel nous avons demandé l'appui du département EFPA (Ecologie 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**. La qualité de l'ADN nécessaire pour les analyses de biologie moléculaire reste en effet largement méconnue, ainsi que l'effet sur cette qualité 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. 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.

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. De façon générale, nous avons deux hypothèses. La première que la conservation du matériel à -20°C ou à -80°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.

Matériel 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 est 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 le pin et plus de 50 % des échantillons de cèdre (Tableau 1). En revanche, aucun des 24 échantillons de hêtre du projet ne présente de bande nette. Des variations sont également 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.

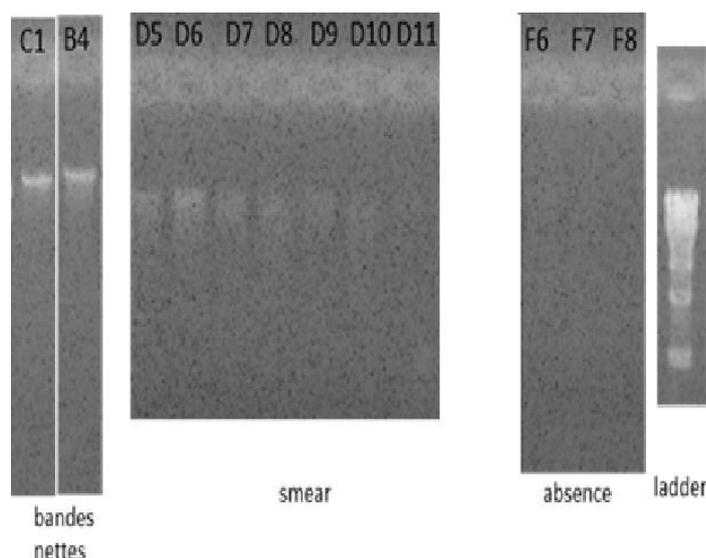


Tableau 1. Pourcentage de bandes nettes observées pour chaque espèce selon le mode de conservation.

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		
		Année	Pourcentage	Année	Pourcentage	Année	Pourcentage	Année	Pourcentage	
Echantillons stockés à -20°C		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 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.

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

Espèce	Pourcentage de bandes nettes ou dégradées			
	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

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 et dégradées							
	Cèdre		Pin		Sapin		Hêtre	
Témoins positifs	57		100		80		87	
Echantillons stockés à -20°C	Année	Pourcentage	Année	Pourcentage	Année	Pourcentage	Année	Pourcentage
	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

Quantité d'ADN évaluée par dosage

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

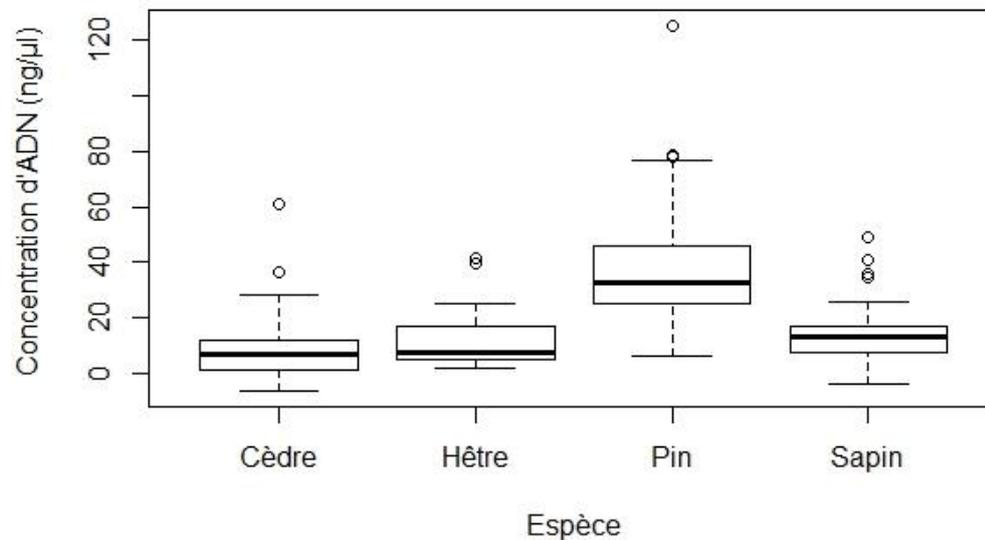
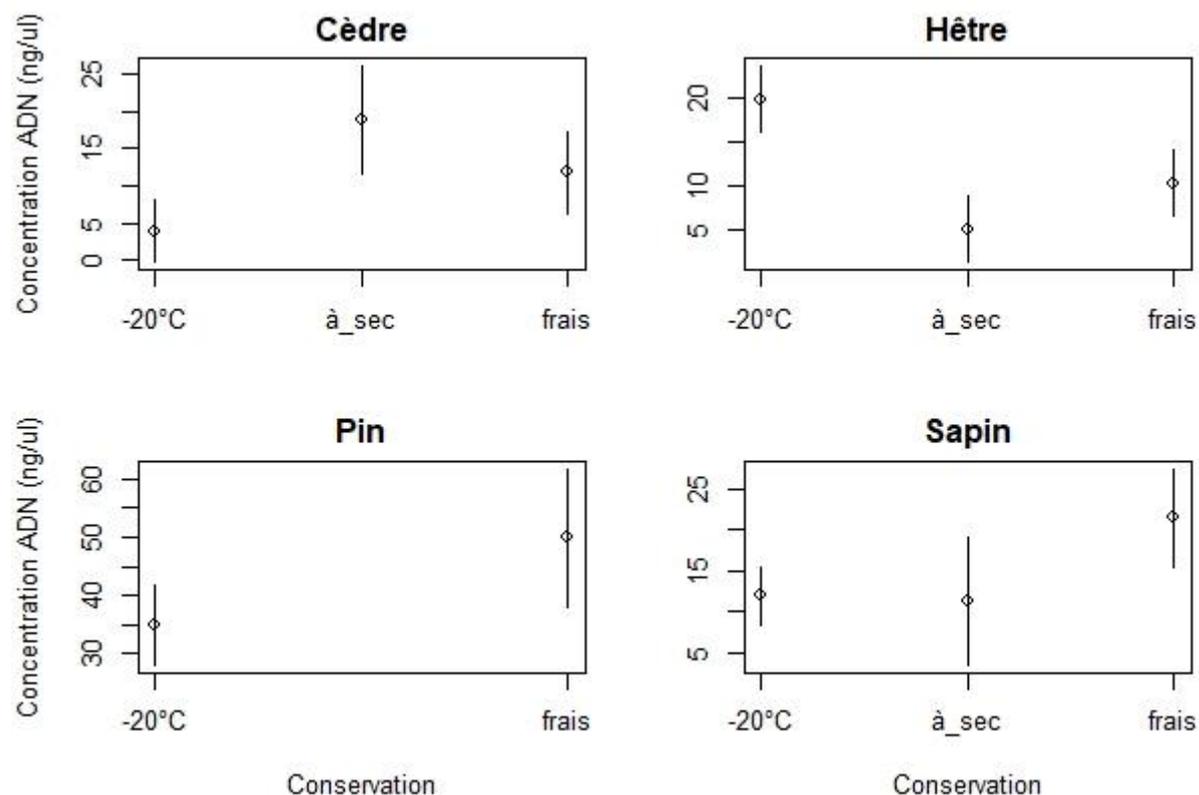


Tableau 5. Comparaison de la quantité moyenne d'ADN obtenue pour les différentes espèces et avec 2 méthodes de dosage.

Espèce	Concentration moyenne d'ADN (en ng/μl)			
	Pin	Sapin	Hêtre	Cèdre
Dosage NanoDrop™	57.41	21.16	12.06	3.79
Dosage PicoGreen™	60	24.90	9.96	12.2

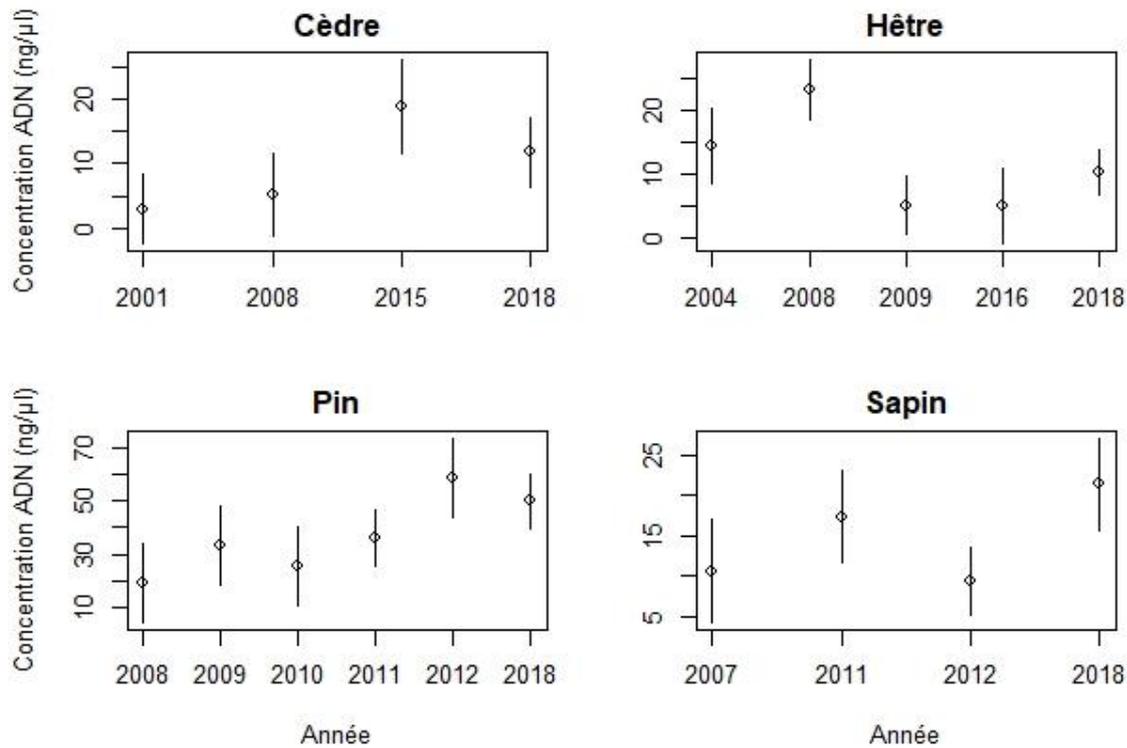
Pour les quatre espèces, l'effet de la méthode de conservation sur la concentration d'ADN mesurée avec le NanoDrop™ est significatif (Figure 3). Pour le cèdre, le matériel sec donne la meilleure concentration en ADN, alors que le meilleur mode de conservation pour le hêtre est le stockage à -20°C et 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 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).

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.



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.

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

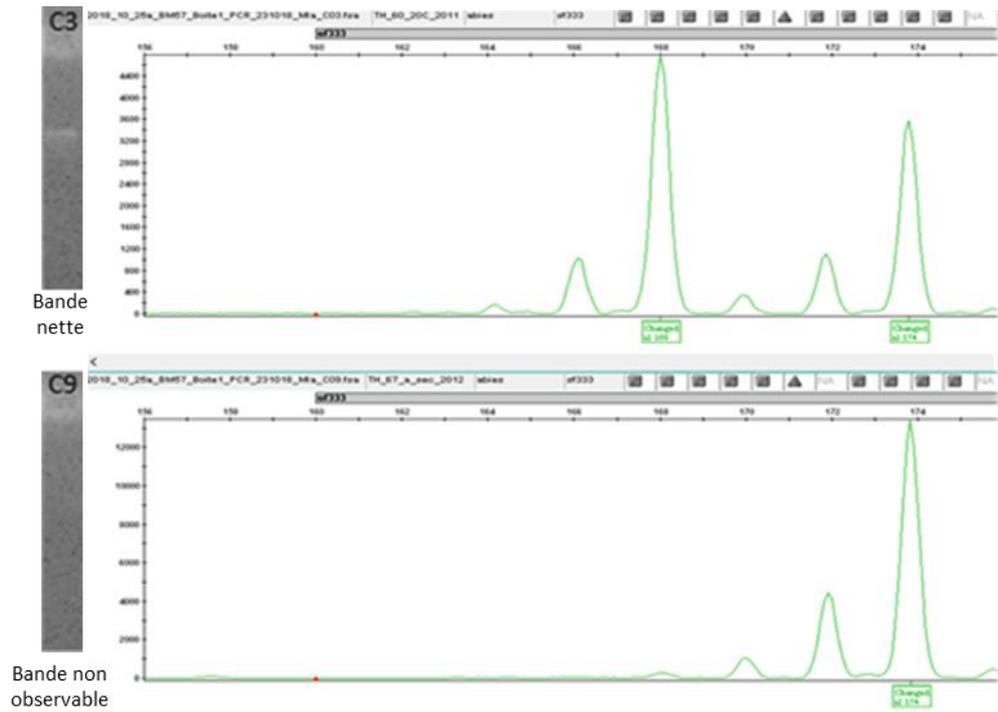
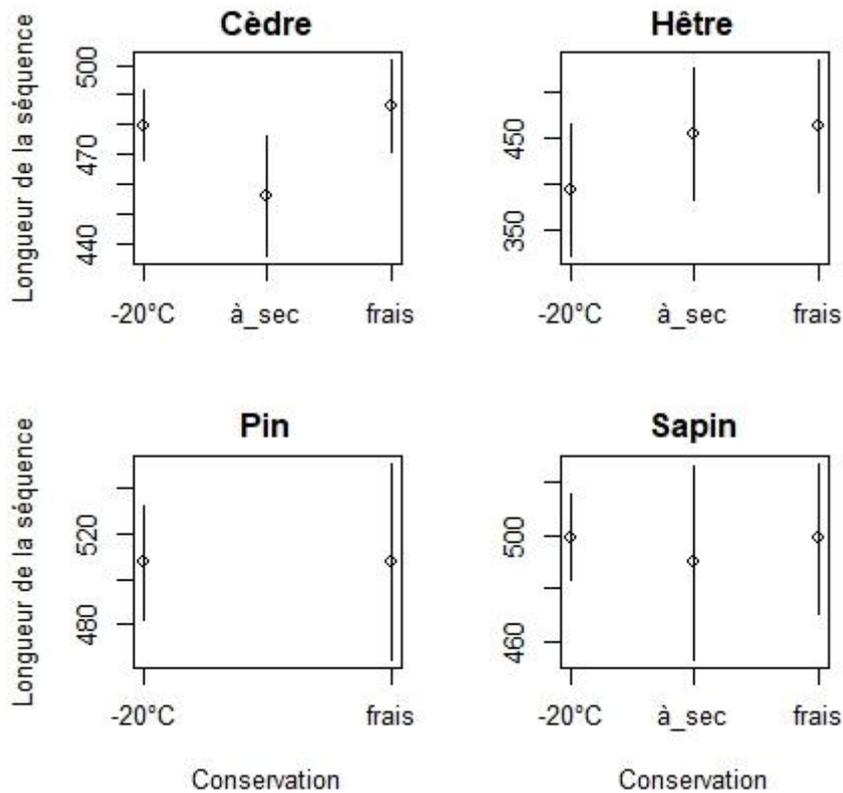


Figure 6. Longueur en bases de la séquence d'ADN lue en fonction de la méthode de conservation. Ce graphique montre les prédictions basées sur l'ANOVA.



Conclusions

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 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 dépendra de l'espèce étudiée.

En ce qui concerne le mode de conservation, les plus fortes concentrations d'ADN sont obtenus 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.

Perspectives

Ce projet 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 intéressant d'évaluer la qualité de l'ADN au travers d'autres techniques (génotypage SNP, séquençage d'ADN nucléaire par exemple). Il serait également utile de poursuivre dans la durée ce projet 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 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 extrait. 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 peut-être réussir à 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, sont à prévoir pour valider cette hypothèse.

Ce projet a d'ores et déjà permis de tirer un certain nombre d'enseignement 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, et il est en revanche moins coûteux et plus facile à mettre en œuvre.

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 « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

- Asuka Y, Tani N, Tsumura Y et Tomaru N (2004) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Mol Ecol Notes* 4:101–103. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00583.x>
- Chaib J, Danan S, Jouaud B, Hagen LS, Lefevre S et Fady B (2006) Identification and characterization of nuclear microsatellites in Mediterranean cedars (*Cedrus* sp.). *Mol Ecol Notes* 6:840-842. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01364.x>
- Cremer E, Liepelt S, Sebastiani F, Buonamici A, Michalczyk IM, Ziegenhagen B et Vendramin GG (2006) Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill. *Mol Ecol Notes* 6:374-376. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01238.x>
- Pastorelli R, Smulders MJM, Van't Westende WPC, Vosman B, Giannini R, Vettori C et Vendramin GG (2003) Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Mol Ecol Notes* 3:76-78. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00355.x>
- Tate J et Simpson B (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and Diverse Origins of the Polyploid Species. *Systematic Botany*. 28. 723-737. <https://doi.org/10.1043/02-64.1>

Vendramin GG, Lelli L, Rossi P et Morgante M (1996) A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol Ecol* 5:595–598. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00111.x>

Vornam B, Decarli N et Gailing O (2004) Spatial Distribution of Genetic Variation in a Natural Beech Stand (*Fagus sylvatica* L.) Based on Microsatellite Markers. *Conserv Genet* 5:561-570. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041025.82917.ac>

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	BABO118 -20°C 2008	RIAL2_114 -20°C 2001	CHEL_122 -20°C 2001	TIKJ_123 -20°C 2001	CHEL_122 -20°C 2008	TIKJ_123 -20°C 2008	TP cèdre RIAL2_114	MGUI2_14 7 -20°C 2001	TP cèdre VentFey_0 5_26	VentFey_0 5_26 -20°C 2008
B	TP cèdre VentFey_6 G1_653	VentFey_6 G1_652 à sec 2015	VentFey_6 G1_653 à sec 2015	VentFey_6 G1_654 à sec 2015	VentFey_6 G1_655 à sec 2015	TP cèdre Vent_137	Vent_137 -20°C 2001	TP cèdre ORIJ_142	ORIJ_142 -20°C 2001	TP cèdre VentFey_0 5_23	VentFey_0 5_23 -20°C 2008	Témoin négatif
C	TP sapin TH_60	TH_60 -20°C 2007	TH_60 -20°C 2011	TH_60 -20°C 2012	TH_60 à sec 2012	TH_67 -20°C 2012	TH_67 -20°C 2011	TH_67 -20°C 2012	TH_67 à sec 2012	TH_100 -20°C 2007	TH_100 -20°C 2011	TP sapin TH_67
D	TP sapin TH_59	TH_59 -20°C 2011	TH_59 -20°C 2012	TH_59 à sec 2012	TH_59 -20°C 2007	TH_80 -20°C 2011	TH_80 -20°C 2012	TH_80 -20°C 2007	TP sapin TH_100	TH_100 -20°C 2012	TP sapin TH_80	Témoin négatif
E	TP hêtre 257_2_56a	257_2_56a -20°C 2008	257_2_56a à sec 2009	TP hêtre 257_2_58a	257_2_58a -20°C 2008	257_2_58a à sec 2009	TP hêtre 257_2_64	257_2_64 -20°C 2008	257_2_64 à sec 2009	A7 numbase 6410 -20°C	B108 numbase 6495 -20°C	C216 numbase 6594 -20°C
F	TP hêtre 257_2_60a	257_2_60a -20°C 2008	257_2_60a à sec 2009	TP hêtre 257_2_62	257_2_62 -20°C 2008	257_2_62 à sec 2009	TP hêtre VTX_68_01 ventoux sud	individu 1 à sec 2016	TP hêtre VTX_68_02 ventoux sud	individu 2 à sec 2016	TP hêtre VTX_68_03 ventoux sud	individu 3 à sec 2016
G	TP pin PNS_1	PNS_1 -20°C 2008	PNS_2 -20°C 2008	PNS_4 -20°C 2008	TP pin PNS_413	PNS_413 -20°C 2010	PNS_414 -20°C 2010	PNS_415 -20°C 2010	TP pin PNS_923	PNS_923 -20°C 2012	PNS_924 -20°C 2012	PNS_926 -20°C 2012
H	TP pin PNS_31	PNS_31 -20°C 2009	PNS_33 -20°C 2009	PNS_34 -20°C 2009	TP pin PNS_390	PNS_390 -20°C 2011	PNS_391 -20°C 2011	PNS_393 -20°C 2011	TP pin PNS_689	PNS_689 -20°C 2011	PNS_692 -20°C 2011	PNS_694 -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	AAAATACACTGCCCCAAAA	(GA) ₉	Vornam <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	CAGGTTTTGGTTTCTTACAC		
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	ATTCCACCCACCATCTGTC		
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	GCTTTACGCAATTCCTCTATG	(TC) ₈ (AC) ₆	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	TGAGAATTGTGAACCATTGAAAG		
C6	Forward	GGGTTATAAGTTTTAATTATATGTGTG	(GT) ₂₇ (GA) ₁₄	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	CACCACCTTGACTTCCCTTG		
D12	Forward	TGGTTTTTCCACCTTAGTTTCC	(TC) ₁₅	Chaib <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	GGGATGGAAGGAATAAGATAGAGG		
Pt15169	Forward	CTTGGATGGAATAGCAGCC	(C) ₈ (T) ₈ A(T) ₈	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA		

Sapin pectiné

Nom de l'amorce	Sens de l'amorce	Séquence (de 5' -> 3')	Motif	Bibliographie
SF333	Forward	ATTTGTTTCATTTTGGTCCTG	(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	CATTTGGTGCGGTTCAATTC	(GT) ₁₁ (GC) ₁₀	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	AGTGGCATTTCACCTATTGG		
SF78	Forward	FAM-CATTGTTGTCTTTGTTTCACA	(CGCA) ₈ (CA) ₁₅ G(CA) ₈	Cremer <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	TGCACCGTTTTGTTTTTCC		

Pin de Salzmann

Nom	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	CTTGGATGGAATAGCAGCC	(C) ₈ (T) ₈ A(T) ₈	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA		
Pt87268	Forward	GCCAGGGAAAATCGTAGG	(T) ₁₄	Vendramin <i>et al.</i> , 1996
	Reverse	AGACGATTAGACATCCAACCC		
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 (QIAGEN™)	1X	5	500
Primers à 100µM	0.2µM	0.02	2*

Q_Solution (QIAGEN™)	0.5X	1	100
H ₂ O 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 (QIAGEN™)	1X	5	500
Primers à 100µM	0.2µM	0.02	2*
Q_Solution (QIAGEN™)	0.5X	1	100
H ₂ O 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 30s (dénaturation de l'ADN)

57°C durant 90s (hybridation des amorces)

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

} x 35 cycles

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	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	Tate et Simpson, 2003
	psbAr_HC	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	