

MARQUEURS MOLECULAIRES POUR LA DETERMINATION DU CARACTERE RESISTANT OU SENSIBLE DE PIMENTS/POIVRONS AUX NEMATODES A GALLES DES RACINES

Fazari A. , Pijarowski L., Djian-Caporalino C. ¹

Le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Les marqueurs moléculaires liés aux gènes cibles deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection assistée par marqueurs (MAS) pour les résistances aux maladies et ravageurs. Ils le sont d'autant plus que les tests de résistance sont lourds et longs, comme c'est le cas pour les nématodes, car ils peuvent être mis en évidence avant même que le caractère considéré ne soit exprimé et en l'absence de pathogène.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Marqueur SCAR (sequence characterized amplified region)

1.1.a. Objectif : mise en évidence d'un polymorphisme de séquence dû à des insertions ou délétions dans la séquence (différence de site d'hybridation d'une amorce spécifique). Après définition d'amorces spécifiques d'un fragment d'ADN polymorphe entre des plantes résistantes et sensibles, amplification de l'ADN par PCR et observation du polymorphisme sur gel d'agarose.

1.1.b. Hygiène et Sécurité : le BET (Bromure d'éthidium) utilisé pour visualiser sur gel sous UV les fragments d'ADN a un effet génotoxique, cancérigène et tératogène. Manipulation avec des gants. Stockage des déchets dans des containers spéciaux. Evacuation des déchets par une société spécialisée.

1.1.c. Matériels et réactifs :

Thermocycleur et cuve à électrophorèse

Tampon TBE 0,5 X

Gel d'agarose (Eurogentec) à 1,5% dans tampon TBE 0,5X (fragments d'ADN > 200 pb)

Gel d'agarose (Eurogentec) Small fragment à 2% dans tampon TBE 0,5X (fragments d'ADN < 200 pb)

Mix pour la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) :

Tampon Taq 1X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl)

dNTP Invitrogen (2,5 mM)

MgCl₂ (50 mM)

Amorce rev (30 ng/μl)

Amorce for (30 ng/μl)

Taq invitrogen (0.2 U)

H₂O stérile qsp 20 μl

Bleu 10X :

Bleu de bromophenol (Fluka) : 0,25%

Saccharose (Prolabo) : 40%

H₂O stérile qsp 10ml

Marqueur de poids moléculaire 1 Kb DNA Ladder (Life Technologies)

¹ INRA, UMR IPMSV 1064, 400 Route des Chappes, 06903 Sophia Antipolis

1.1.d. Méthode

- Extraction d'ADN à partir de feuilles selon la méthode de Bernatzky and Tanksley (1986) ou d'Edwards *et al.* (1991)

- 18,75 µl de mix PCR + 1,25 µl ADN à environ 80ng/µl

- Programme d'amplification PCR:

	94°C	3 min	}	35 fois ⊗ = température d'hybridation
	94°C	30 s		
(en °C)	⊗	30 s		
	72°C	1 min		
	72°C	5 min		
	20°C	∞		

- Dépôts sur gel d'agarose: 20 µl de produit PCR + 1µl BSU (bleu 10X).

- Electrophorèse horizontale dans tampon TBE 0,5X ; migration à 100 Volts.

- Coloration : bain BET dans eau osmosée 30 minutes sous agitation.

- Rinçage du gel dans un bain d'eau osmosée 5 minutes sous agitation.

- Observation des fragments amplifiés sous UV.

- Notation de la présence ou de l'absence de bande différentielle chez les plantes sensibles ou résistantes.

1.2. Marqueur CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)

1.2.a. Objectif : Mise en évidence d'un polymorphisme de séquence dû à la présence/absence d'un site de restriction. Après définition d'amorces spécifiques d'un fragment d'ADN polymorphe entre des plantes résistantes et sensibles, amplification par PCR, digestion par une enzyme de restriction dont le site n'est présent que chez un type de plante, observation du polymorphisme sur gel d'agarose.

1.2.b. Méthode : Même protocole que précédemment mais digestion nécessaire par une enzyme de restriction après l'étape de PCR pour faire apparaître le polymorphisme sur gel d'agarose.

- Digestion de 10 µl de produit PCR avec : 1X final de tampon de l'enzyme (Roche), 1X de BSA (Bovine Serum Albumin) (Promega) et 1 unité d'enzyme de restriction (Roche). Volume final ajusté à 20 µl (avec de l'eau distillée stérile). Digestion au bain marie 4 heures à la température optimum de l'enzyme utilisée.

- Vérification de la présence de bande avant digestion chez toutes les plantes sensibles et résistantes et de 2 bandes de taille inférieure après digestion soit chez les plantes sensibles, soit chez les plantes résistantes.

1.3 Marqueur SSCP (single strand conformation polymorphism)

1.3.a. Objectif : Mise en évidence d'un polymorphisme de conformation de l'ADN dû à une ou quelques bases mutées. Après définition d'amorces spécifiques d'un fragment d'ADN polymorphe entre des plantes résistantes et sensibles, amplification par PCR : une bande de même taille est visible chez les plantes résistantes et sensibles sur gel d'agarose. Dénaturation de l'ADN pour obtenir des simples brins, observation du polymorphisme sur gel d'acrylamide ou de MDE après électrophorèse en condition de température froide et constante. Le MDE (« Mutation Detection Enhancement ») est un gel dont la matrice est voisine de celle du polyacrylamide. Il permet d'obtenir des résultats supérieurs (par rapport aux gels standards de polyacrylamide) car il est plus sensible aux différences de conformation de l'ADN.

1.3.b. Matériels et réactifs : Préparer un bain thermostaté (cryostat) à 4°C, 15 à 30 minutes avant le début de la migration afin de refroidir l'appareil.

Composition du gel MDE (BMA):

MDE 0.5X
TBE 0.5X
Temed 0.08%
Ammonium peroxodisulfate (APS) 0.16%
H₂O qsp 12 ml.

NB: Si les fragments n'apparaissent pas nettement en MDE 1X ou 0,5X, il est également possible d'ajouter au gel du glycérol (10% final) afin d'améliorer la résolution.

Révélation à l'argent: préparer les solutions fraîches de révélations pendant la migration.

éthanol 10%
acide nitrique 1%
nitrate d'argent 0.01 M (se conserve à + 4°C, à l'obscurité)
carbonate de sodium 0.28 M. Réaliser extemporanément le mélange suivant : 200 ml de carbonate de sodium + 100 µl de formaldéhyde
acide acétique 10%
solution d'éthanol 10% + acide acétique 7.5% + glycérol 1%

Tampon de charge:

Formamide 95% (Invitrogen)
Bleu de bromophénol 0.05%(Fluka)
Xylène cyanol 0.05%
NaOH (Prolabo) 1 mM
H₂O qsp 5 ml.

1.3.c. Hygiène et Sécurité

- Port de gants et récupération des déchets de MDE ou acrylamide (cancérogènes).
- Attention lors de la pesée du nitrate d'argent car il est corrosif et toxique par ingestion et par contact avec la peau.
- Formaldéhyde à manipuler sous sorbonne car toxique par inhalation et par contact avec la peau.
- Attention au Temed et APS inflammables et irritants pour la peau et le système respiratoire.
- Récupération de tous ces déchets.

1.3.d. Méthode

Préparation du gel

- Nettoyage des plaques à l'alcool afin d'éliminer toutes traces de gel sec ou de résidus de savons. Traitement d'une des plaques avec du RainX (solution siliconée) afin que le gel n'adhère pas sur cette plaque.
- Installation des espaceurs (CBS Scientific 0.35 mm) entre les deux plaques et assemblage des plaques avec du scotch ou un boudin de coulage (CBS Scientific).
- Coulage du gel à la seringue ou à la P5000 du peigne: dents dirigées vers le haut pour tracer le front du gel.
- Polymérisation à température ambiante (30 minutes minimum).

Electrophorèse

- Enlèvement et retournement du peigne (20 puits CBS Scientific 1,5 mm) en prenant soin de ne pas trop l'enfoncer afin que les puits ne communiquent pas entre eux et installation du gel dans l'appareil à SSCP (CBS Scientific).
- Préparation du tampon TBE 0,5X à partir du tampon TBE 10X (Invitrogen).
- (Les produits PCR ont préalablement été déposés sur agarose 2% afin de vérifier la présence d'une bande unique à la taille attendue)
- Ajout de 1 volume de tampon de charge aux 10 µl de produits PCR.
- Dénaturation à 95°C pendant 4 à 5 min, puis refroidissement immédiat sur glace.
- Dépôt de 6 µl de chaque échantillon.
- Migration à 5W, 3000V, 40 mA à 4° C pendant au moins 2h.

Révélation par coloration au nitrate d'argent

- Se placer sous une sorbonne et utiliser une plaque agitante
- Décollement de la petite plaque, le gel restant collé sur la grande plaque
- Avec les doigts gantés et humidifiés, disposition du gel dans un bac pour les différents bains.
- **Fixation** : éthanol 10% pendant 5 minutes minimum.
- **Oxydation**: acide nitrique 1% pendant 3 minutes.
- **Rinçage** : dans de l'eau osmosée, 2 fois quelques secondes.
- **Coloration à l'argent** : nitrate d'argent 0.01 M pendant 20 minutes, sous agitation et en recouvrant le bac de papier aluminium.
- **Rinçage** dans de l'eau osmosée, 2 fois quelques secondes.
- **Révélation** : mettre une première fois du révélateur (= mélange carbonate de sodium / formaldéhyde) ; le vider dès la formation d'un précipité argent et remettre du mélange, surveiller cette étape jusqu'à l'obtention de la révélation souhaitée.
- **Stopper** la réaction en versant de l'acide acétique 10%, une première fois pendant quelques secondes, vider puis en remettre pendant au moins 15 minutes (le faire en 2 fois évite la formation de trop de bulles dans le gel)
- **Incubation** du gel au moins 15 minutes dans un bain: d'éthanol 10% + acide acétique 7.5% et glycérol 1%.
- Scan du gel et enregistrement sur support informatique pour analyse.
- Conservation du gel par transfert sur papier Whatman. Dépôt d'un film de protection type « saran » et séchage sous vide à 80°C pendant 1 heure.

Notation des bandes polymorphes entre les plantes sensibles et résistantes

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1 Exemple de marqueur SCAR lié à un gène conférant la résistance à 3 espèces majeures de *Meloidogyne* chez le piment

Extraction d'ADN selon la méthode de Bernatzky and Tanksley (1986).

Couple d'amorces spécifique du gène *Me1* chez le piment selon Djian-Caporalino et al. (non publié):

Amorce Scar CD (for) : 5'- GAA GCT TAT GTG GTA(A ou C)CC- 3'

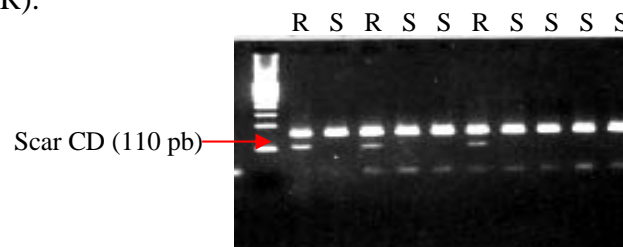
Amorce Scar CD (rev) : 5'- GCA AAG TAA TTA TAT GCA AGA GT- 3'

Températures d'hybridation : ⊗ = 49°C

Témoins : ADN piment *Capsicum annuum* cv. DLL (sensible), ADN piment *C. annuum* lignée PM217 (gène *Me1*)

Dépôts sur agarose Small Fragments (le polymorphisme n'apparaît pas sur agarose normal).

Deux bandes observées, l'une non polymorphe à 160 pb, l'autre à 110 pb présente chez les plantes résistantes (R).



2.2. Exemple de marqueur CAPS lié à un gène conférant la résistance à 3 espèces majeures de *Meloidogyne* chez la tomate

Extraction d'ADN selon la méthode de Edwards *et al.* (1991).

Couple d'amorces spécifique du gène *Mi* chez la tomate selon Williamson *et al.* (1994) :

Amorce Rex-F1 (forward) : 5'-TCG GAG CCT TGG TCT GAA TT-3'

Amorce Rex-R2 (reverse) : 5'-GCC AGA GAT GAT TCG TGA GA-3'

Températures d'hybridation : ⊗ = 55°C

Témoins : ADN tomate *Lycopersicon esculentum* var. Saint-Pierre (sensible), ADN tomate *L. esculentum* var. Piersol (gène *Mi*)

Dépôts sur agarose à 1,5%.

Une bande observée à 750 pb avant digestion chez les plantes sensibles et résistantes ; après digestion par la *TaqI*, deux bandes observées à 570 pb et 160 pb chez les plantes résistantes seulement.

2.3. Exemple de marqueur SSCP lié à un gène conférant la résistance à 3 espèces majeures de *Meloidogyne* chez la tomate

Extraction d'ADN selon la méthode de Bernatzky and Tanksley (1986).

Couple d'amorces spécifique du gène *Me3* chez le piment selon Djian-Caporalino *et al.* (non publié):

Amorce SSCP HM58 (for) : 5'- GCA TGT CTT TCT TTA CC - 3'

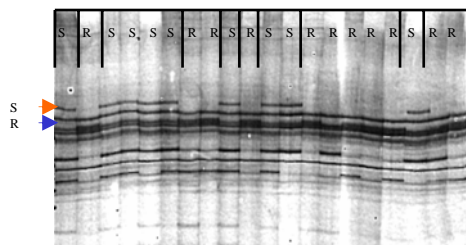
Amorce SSCP HM58 (rev) : 5'- CGG TGG CTG TTA CGC TC - 3'

Températures d'hybridation : ⊗ = 48°C

Témoins : ADN piment *Capsicum annuum* cv. DLL (sensible), ADN piment *C. annuum* lignée PM687(gène *Me3*)

Dépôts sur acrylamide ou MDE

Deux bandes observées (marqueur codominant), l'une liée à l'allèle sensible (S), l'autre liée à l'allèle résistant (R).



3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces marqueurs fiables et reproductibles, utilisés au laboratoire de l'INRA de Sophia Antipolis, ont pour objectifs la caractérisation de gènes de résistance aux nématodes à galles chez le piment, leur cartographie sur les cartes génétiques, l'étude des homologies avec d'autres gènes de résistance aux nématodes chez d'autres *Solanaceae*, leur utilisation dans des programmes de sélection assistée. Ces marqueurs sont utiles pour les sélectionneurs de semences pour suivre l'introgession des gènes dans des variétés cultivées et sélectionner les plants résistants après chaque back-cross.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bernatzky R, Tanksley SD (1986) Genetics of actin related sequences in tomato. *Theor Appl Genet* 72: 314-321
- Edwards K, Johstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic acids Res* 19: 1349
- Williamson VM, Ho JY, Wu FF, Miller N, Kaloshian I (1994) A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor Appl Genet* 87(7): 757-763