



Etude de l'expression allèle spécifique de gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique chez le tournesol hybride :
comparaison de la qPCR-Allèle Spécifique et du PyroMark

Baptiste Mayjonade (IE-CDD SUNRISE)
Génétique et génomique des réponses aux stress biotique et abiotique du tournesol
Laboratoire Interactions Plantes-Microorganismes
LIPM - INRA - TOULOUSE

Journée annuelle plateforme Génomique (GeT-PlaGe) – 30 Septembre 2013

Contexte de l'étude

Le tournesol cultivé sous forme de variétés hybrides

Le tournesol, comme la plupart des plantes allogames, bénéficie d'un effet de vigueur hybride (ou hétérosis) particulièrement marqué.



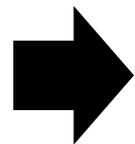
PARENT 1
Lignée XRQ



HYBRIDE F1
INEDI



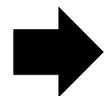
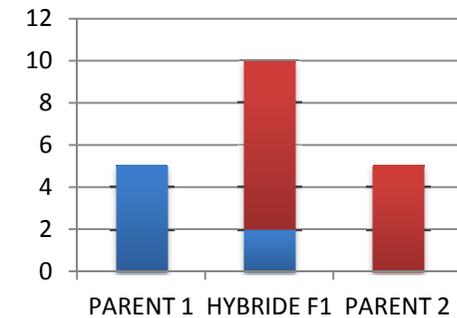
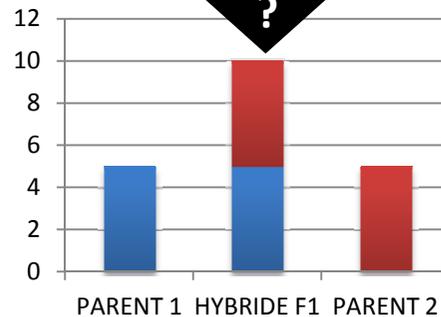
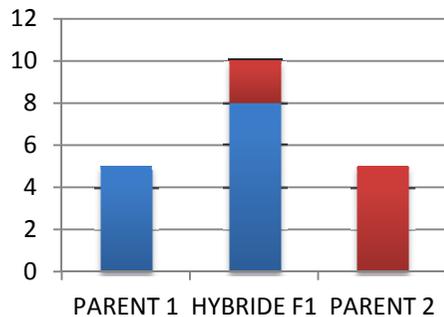
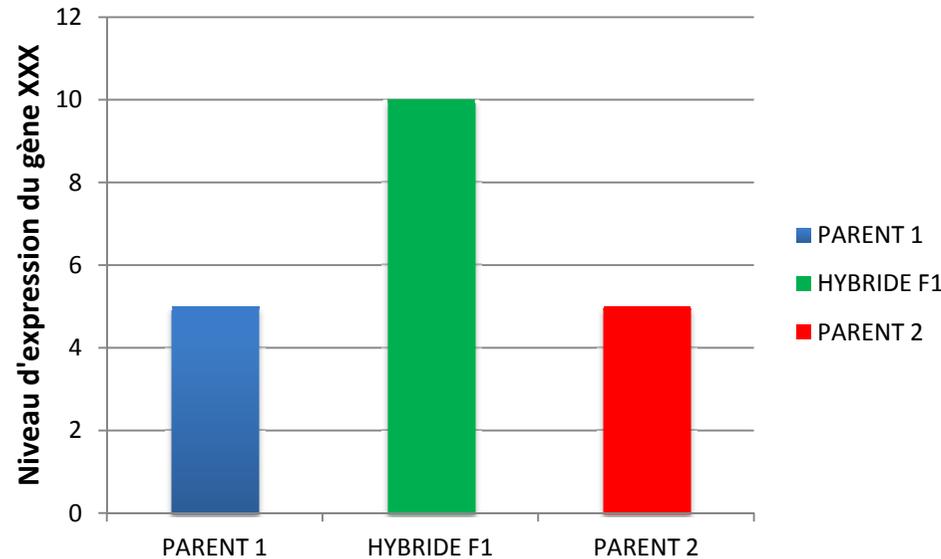
PARENT 2
Lignée PSC8



Les mécanismes sous-jacents de l'hétérosis sont encore mal compris
=> difficile de prédire la valeur hybride d'un croisement en sélection à partir de la valeur des parents

Contexte de l'étude

Hétérosis au niveau transcriptomique



L'étude de l'expression des allèles parentaux chez l'hybride permettrait de mieux comprendre les mécanismes contrôlant l'effet d'hétérosis.

Méthodes utilisées

qPCR Allèle-Spécifique - PyroMark Q24



**qPCR Allèle-Spécifique
SYBR Green (qPCR-AS)**



**PyroMark Q24
(Qiagen)**

**Principe
pyroséquençage**

**1 - Amplification de la région
d'intérêt par PCR**

Primer forward biotinylé en 5'



Primer reverse classique



SNP



A/T



Amplification de la région d'intérêt de 70 à 500 pb



PCR



Amplicons
double brin



**Principe
pyroséquençage**

**2 - préparation des échantillons pour la
réaction de pyroséquençage**

Bille (+ streptavidine)

Amplicons
double brin



Dénaturation (NaOH)

Monobrin
biotinylé



Hybridation du primer de séquençage

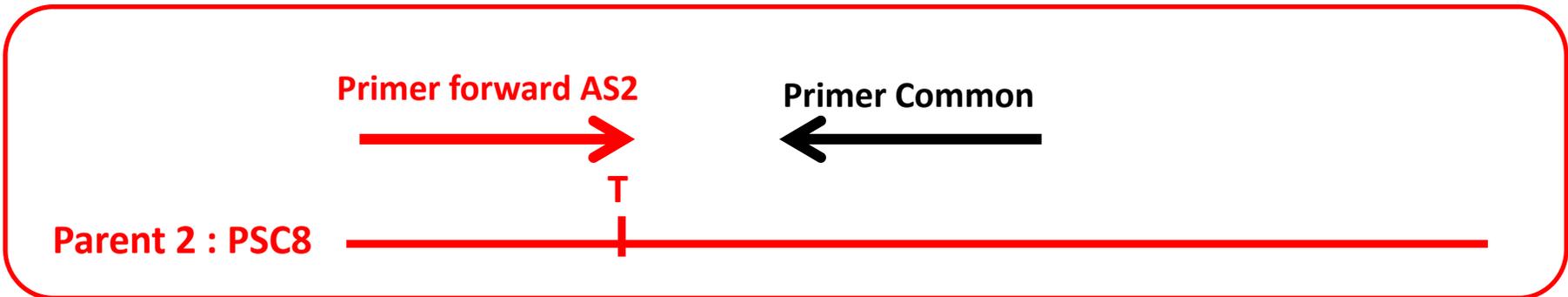
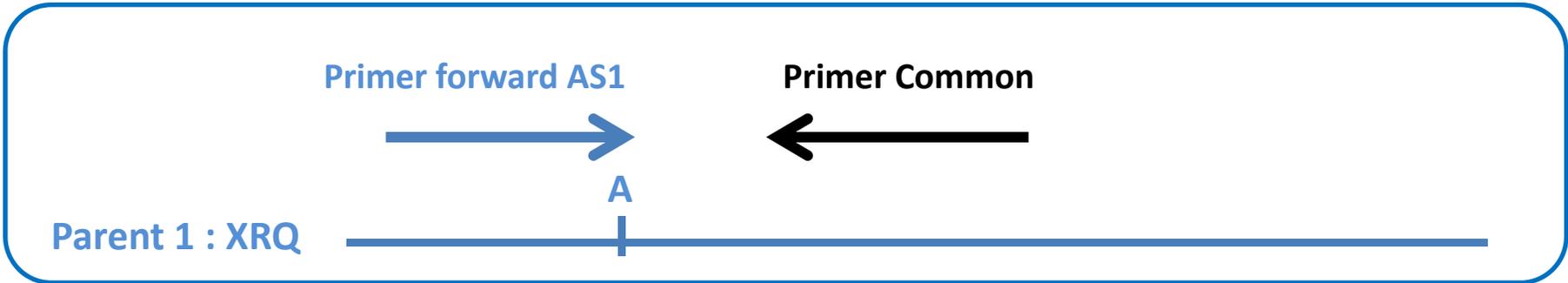
Monobrin
biotinylé



Primer de séquençage

Principe qPCR-AS

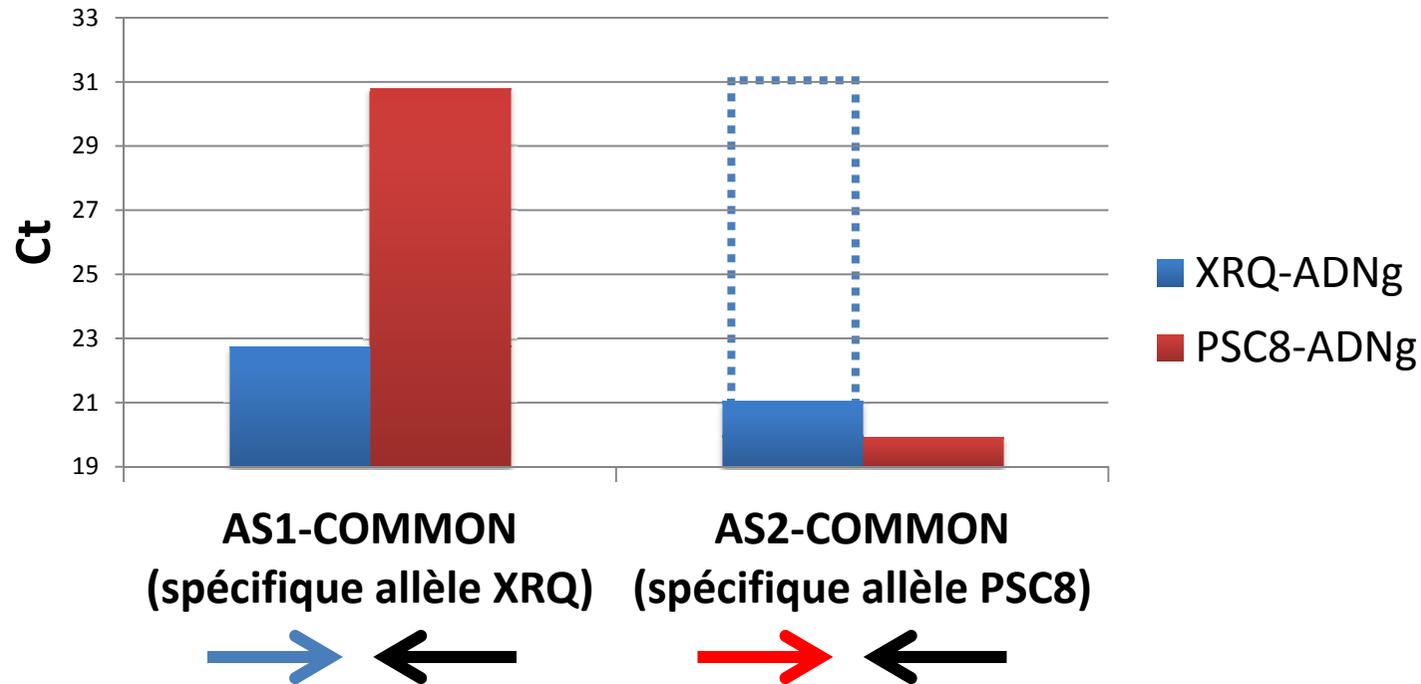
**1 – Stratégie « 2 primers AS + COMMON » :
Desgin de primers allèle spécifique**



Principe qPCR-AS

2 – Stratégie « 2 primers AS + COMMON » : Test sur les ADNg des 2 parents

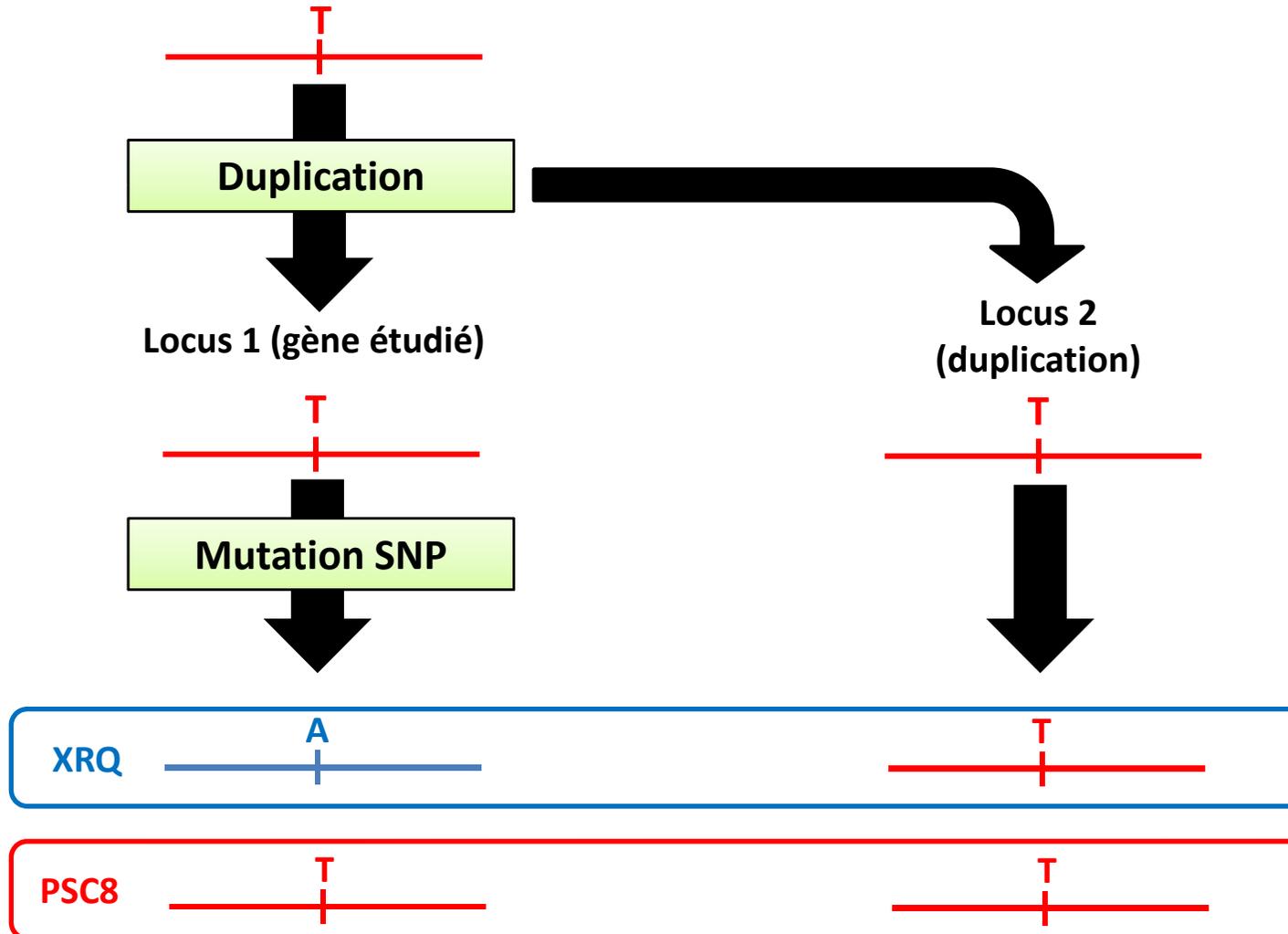
↗Ct = ↘ allèle cible



AS1-COMMON spécifique de XRQ mais AS2-COMMON amplifie les deux parents

Principe qPCR-AS

3 – Stratégie « 2 primers AS + COMMON » : non spécificité du couple AS2-Common ?



Principe qPCR-AS

1 – Stratégie « 2 x 2 primers AS » : Design de primers allèle spécifique

XRQ

Primer forward AS1



A

Primer reverse AS1



C



PSC8

Primer forward AS2



T

Primer reverse AS2



G

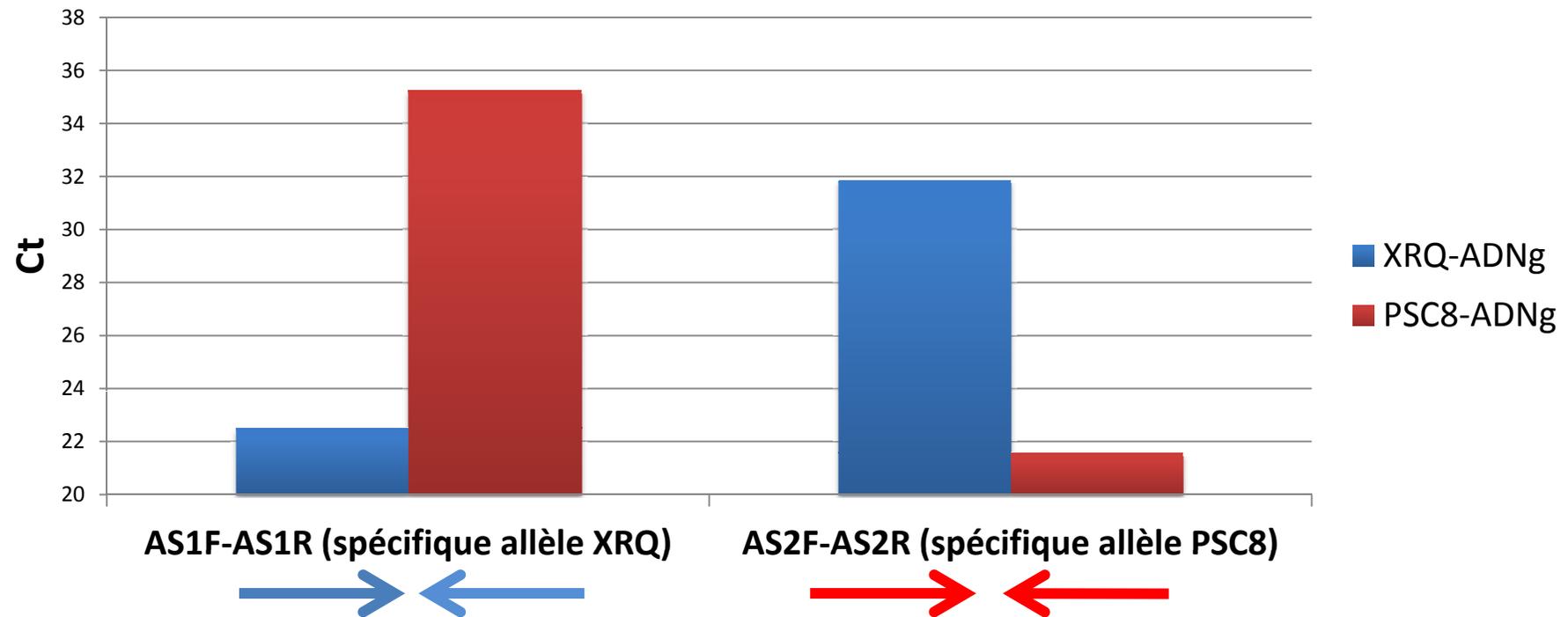


Nécessité d'avoir deux polymorphismes à proximité

Principe qPCR-AS

2 – Stratégie « 2 x 2 primers AS » : Test sur les ADNg des 2 parents

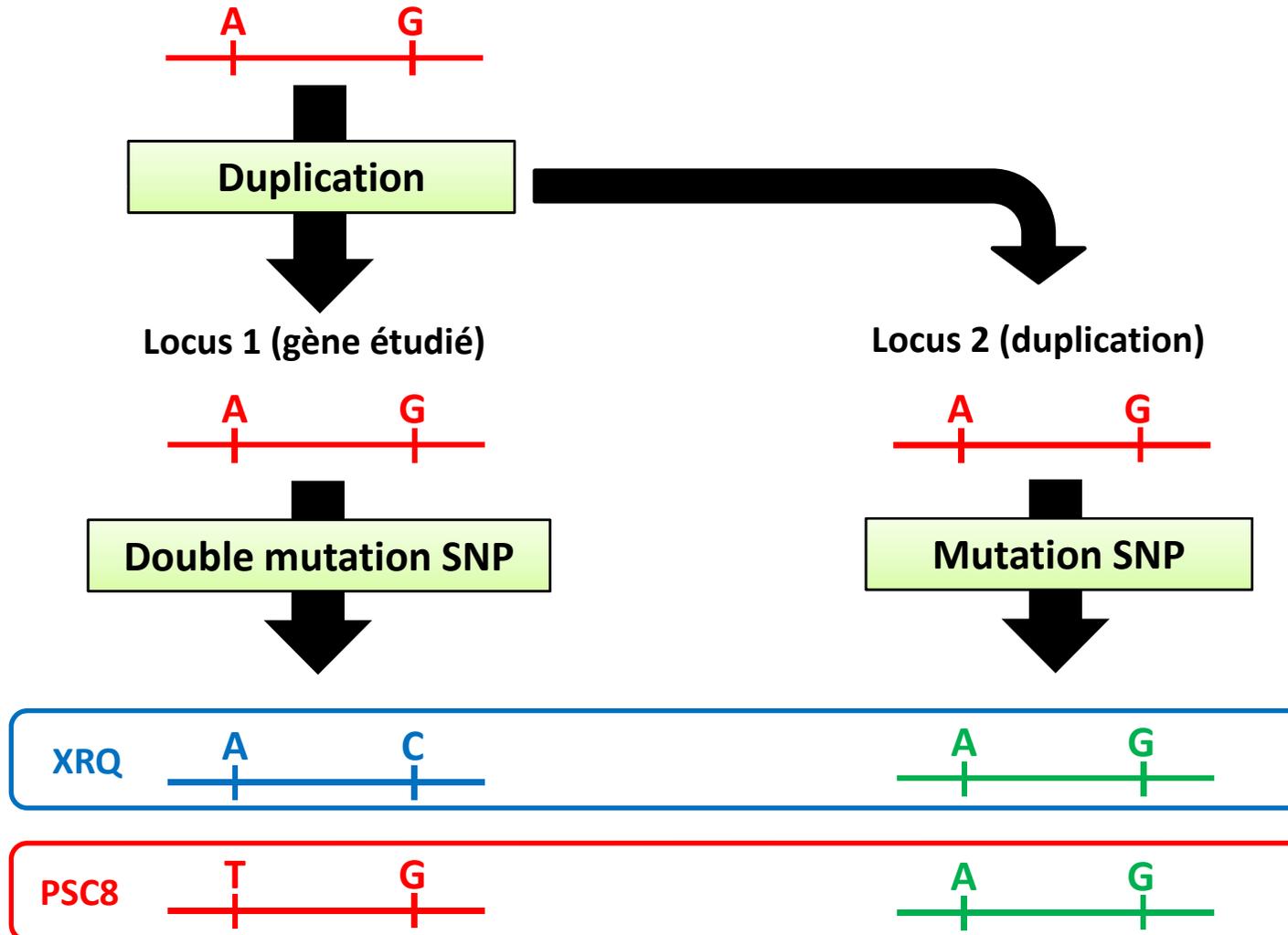
↗Ct = ↘ allèle cible



Les deux couples de primers sont spécifique de chaque allèle

Principe qPCR-AS

3 – Stratégie « 2 x 2 primers AS » : spécificité des couples de primers



Principe qPCR-AS

Calcul des ratios alléliques
à partir des Ct de chaque allèle

$$\text{Ratio de l'allèle A} = \frac{\text{Quantité d'allèle A}}{\text{Quantité d'allèle A} + \text{d'allèle B}}$$

$$= \frac{1}{\frac{\text{Qté d'allèle A} + \text{Qté d'allèle B}}{\text{Qté d'allèle A}}}$$

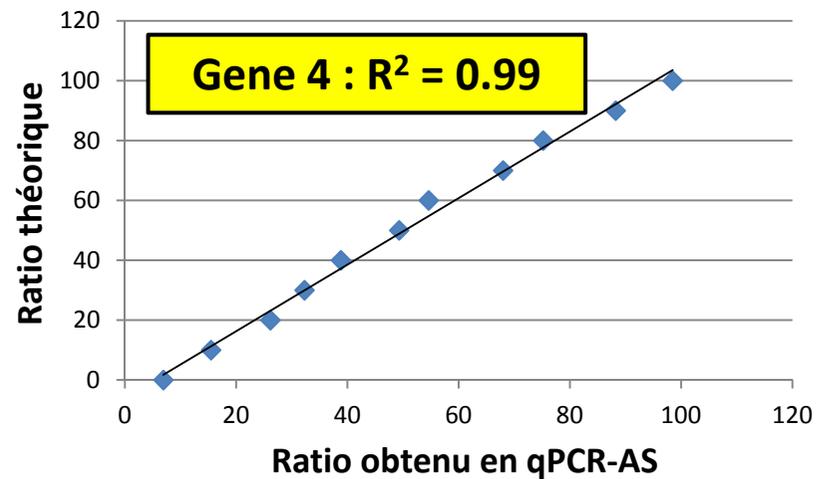
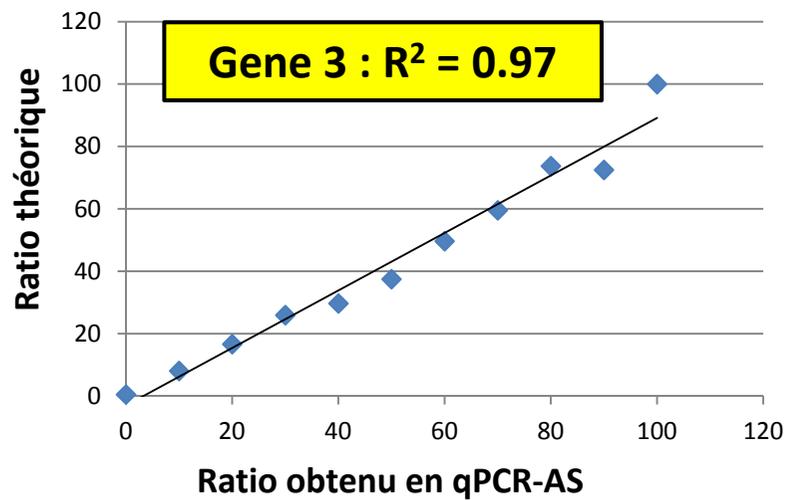
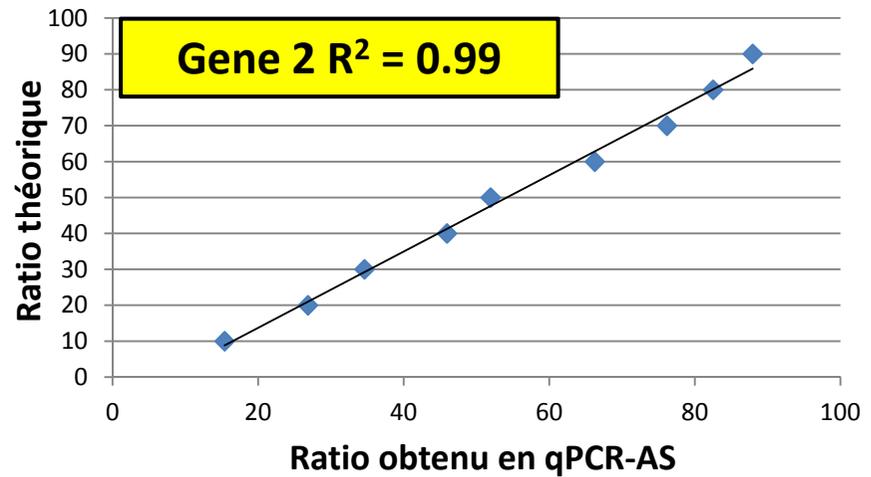
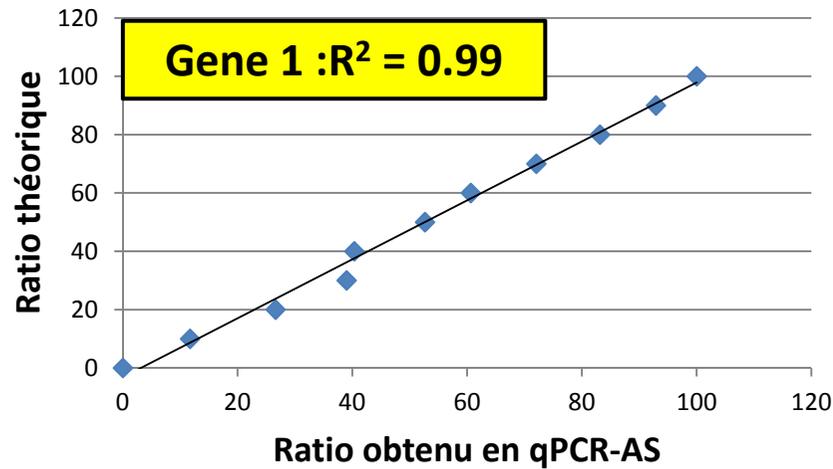
$$= \frac{1}{1 + \frac{\text{Qté d'allèle B}}{\text{Qté d'allèle A}}}$$

$$= \frac{1}{1 + 2^{(\text{Ct allèle A} - \text{Ct allèle B})_{\text{échantillon}} - (\text{Ct allèle A} - \text{Ct allèle B})_{\text{ADNg hybride}}}}$$

= quantifie allèle B par rapport à l'allèle A chez l'échantillon *= corrige la différence d'amplification entre les primers des 2 allèles*

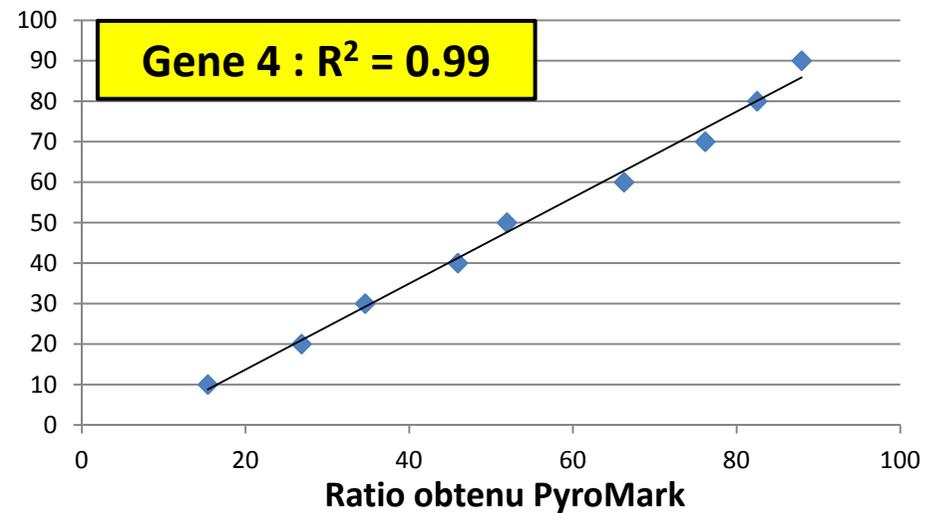
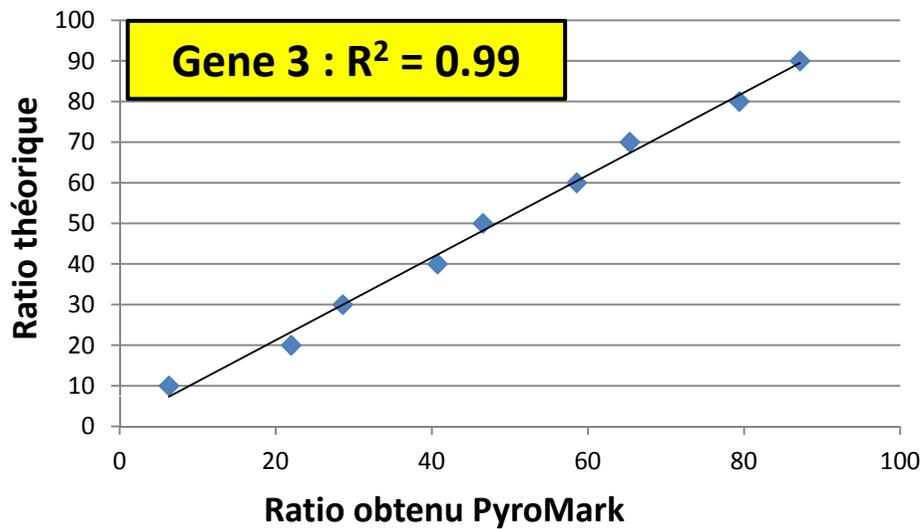
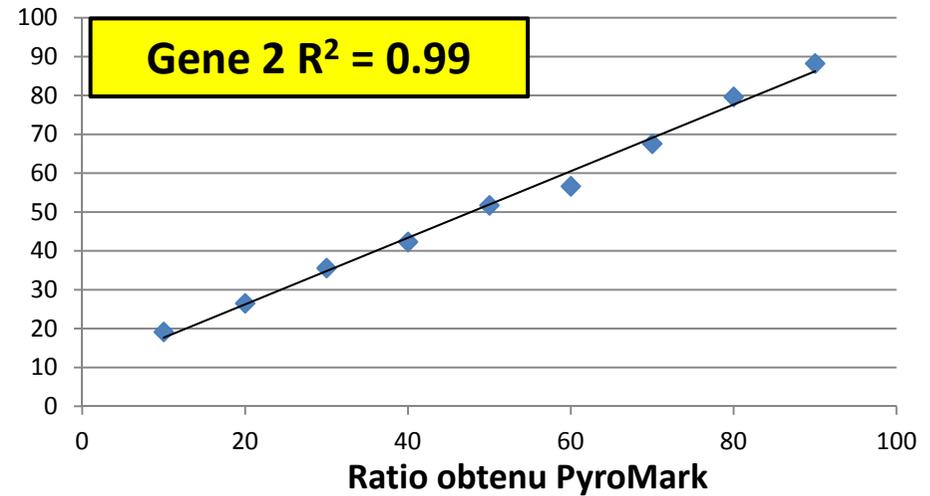
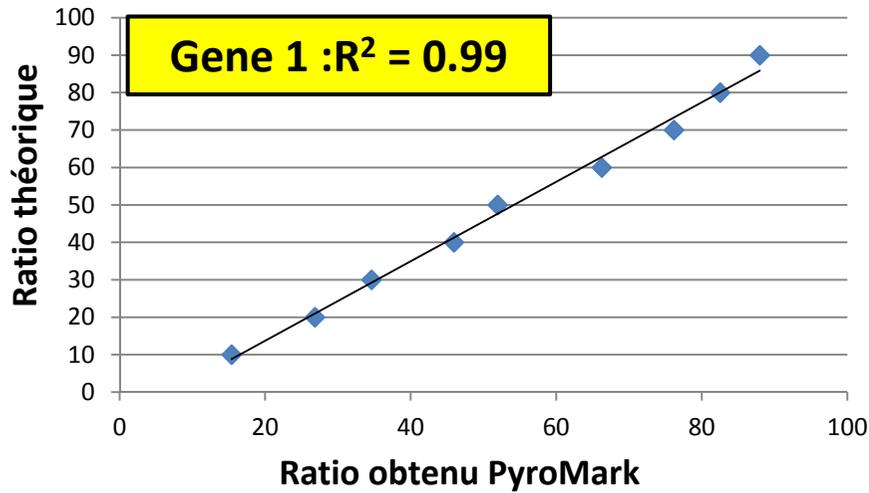
Test « gamme ratio » qPCR-AS

Gamme de 8 mélanges d'ADNg XRQ/PSC8



Test « gamme ratio » PyroMark

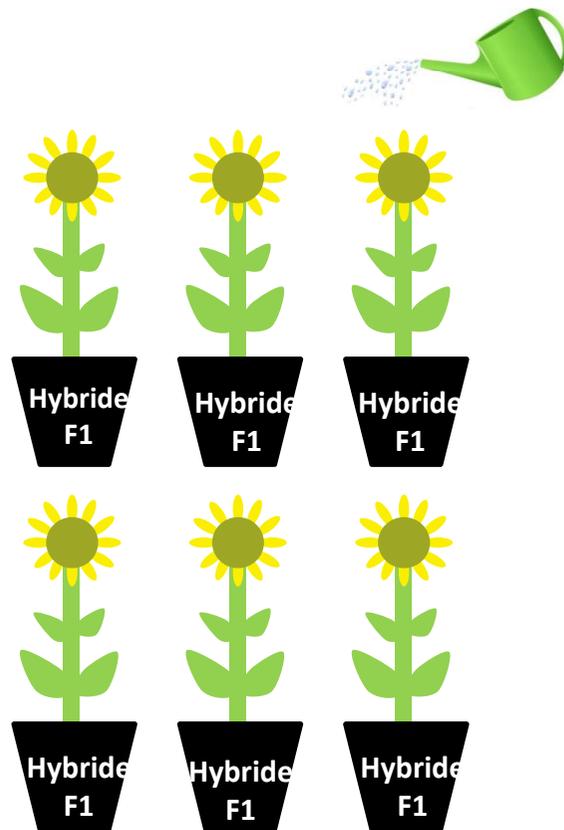
Gamme de 8 mélanges d'ADNg XRQ/PSC8



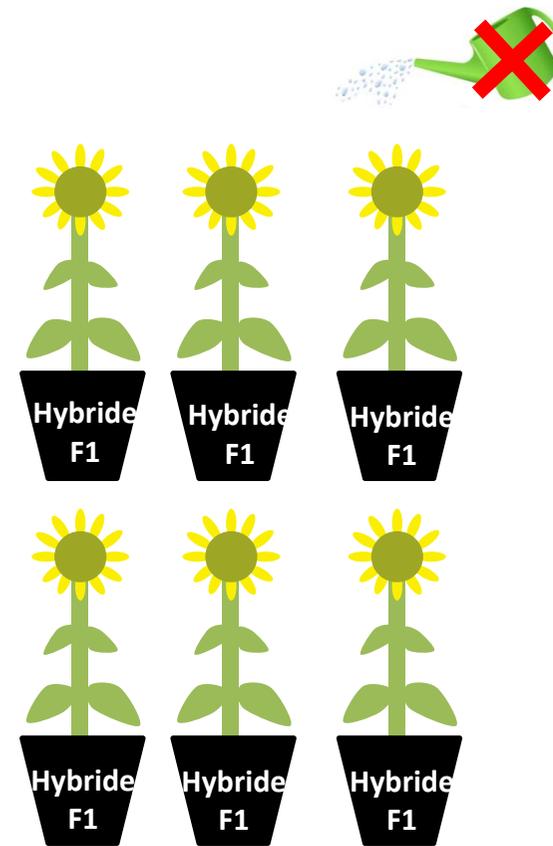
Expérience stress hydrique n°1 (09S02)

**Description de l'expérience :
présence/absence de stress hydrique**

**6 PLANTES HYBRIDE « INEDI »
NON STRESSEES (FTSW=1)**

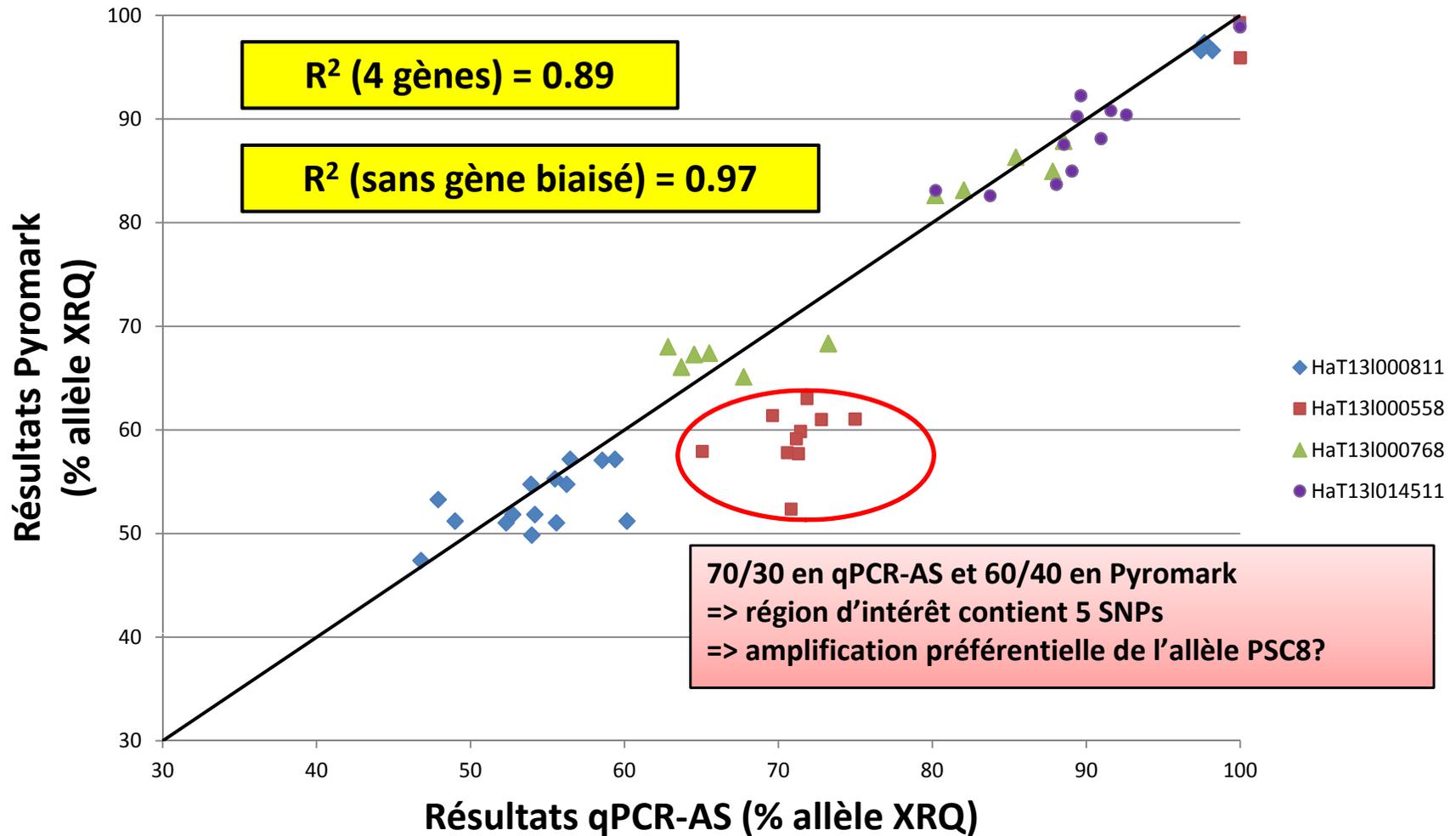


**6 PLANTES HYBRIDE « INEDI »
TRES STRESSEES (FTSW=0.1)**



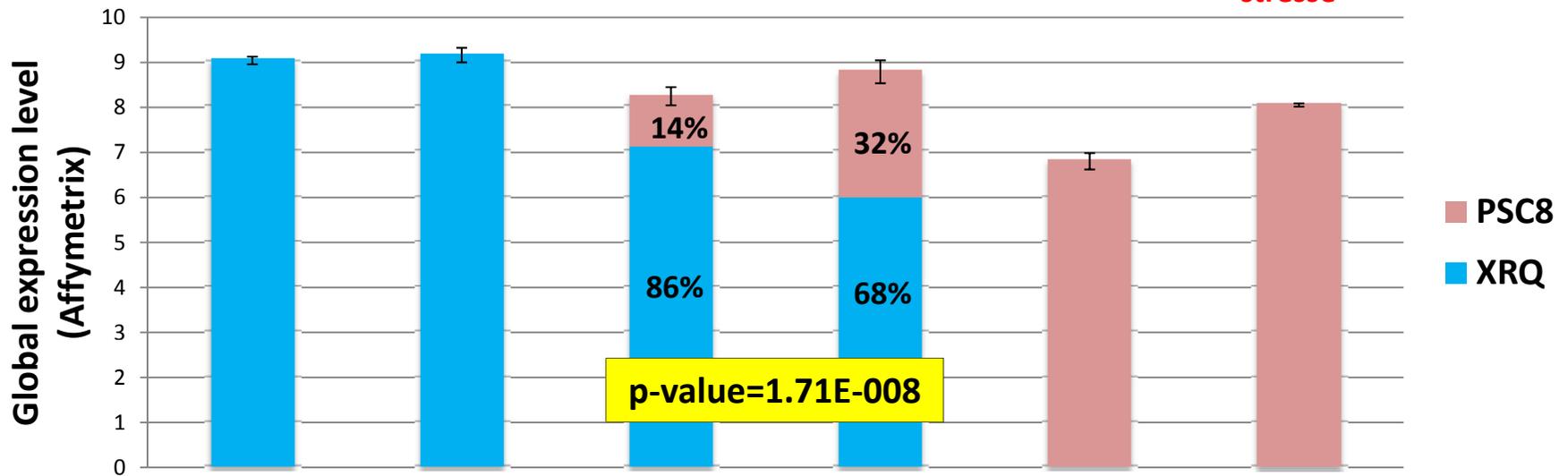
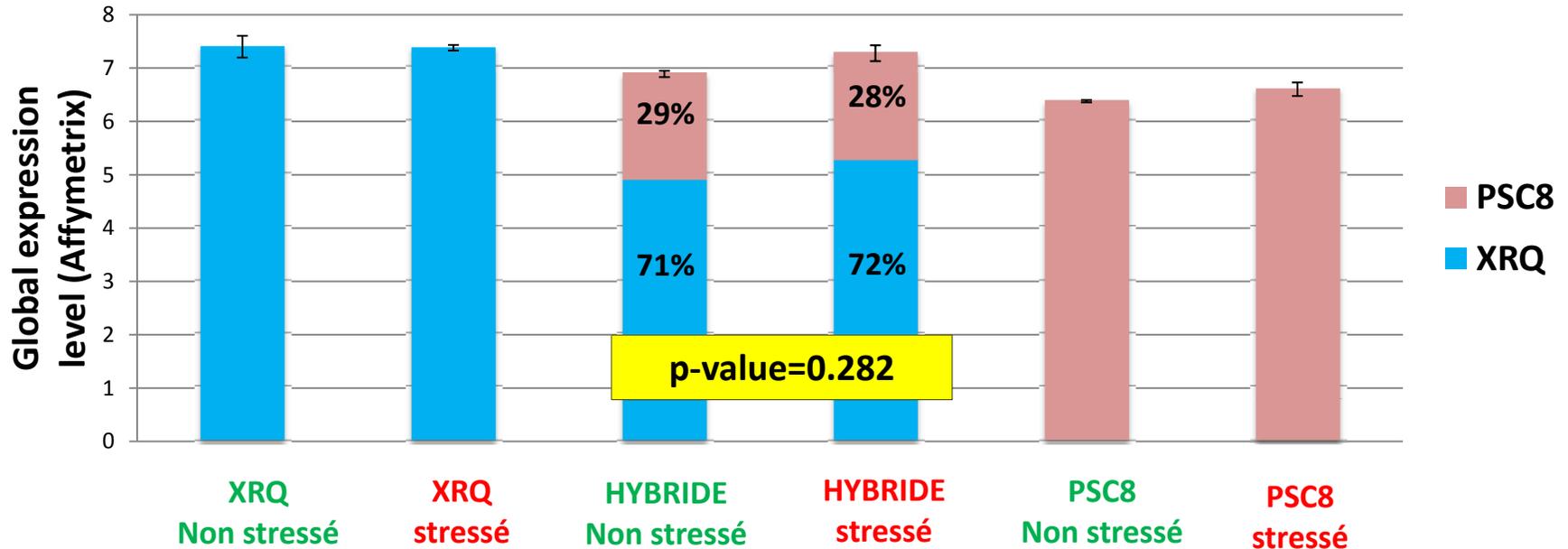
Expérience stress hydrique n°1

Comparaison des résultats obtenus en qPCR-AS et PyroMark pour 4 gènes



Expérience stress hydrique n°1 (09S02)

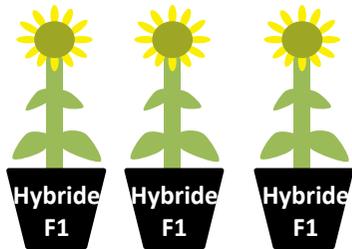
Focus sur les résultats de 2 gènes



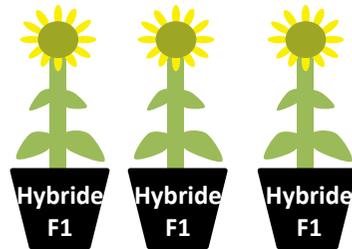
Expérience stress hydrique n°2 (12S01)

**Description de l'expérience :
5 intensités de stress hydrique**

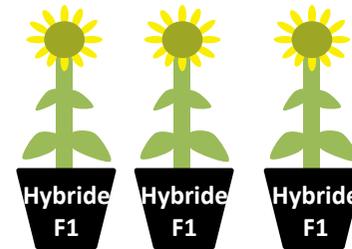
3 PLANTES HYBRIDES
Stress hydrique +



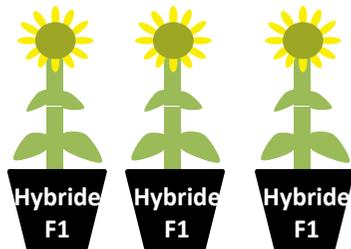
3 PLANTES HYBRIDES
Stress hydrique ++



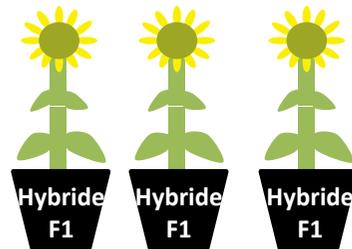
3 PLANTES HYBRIDES
Stress hydrique +++



3 PLANTES HYBRIDES
Stress hydrique ++++

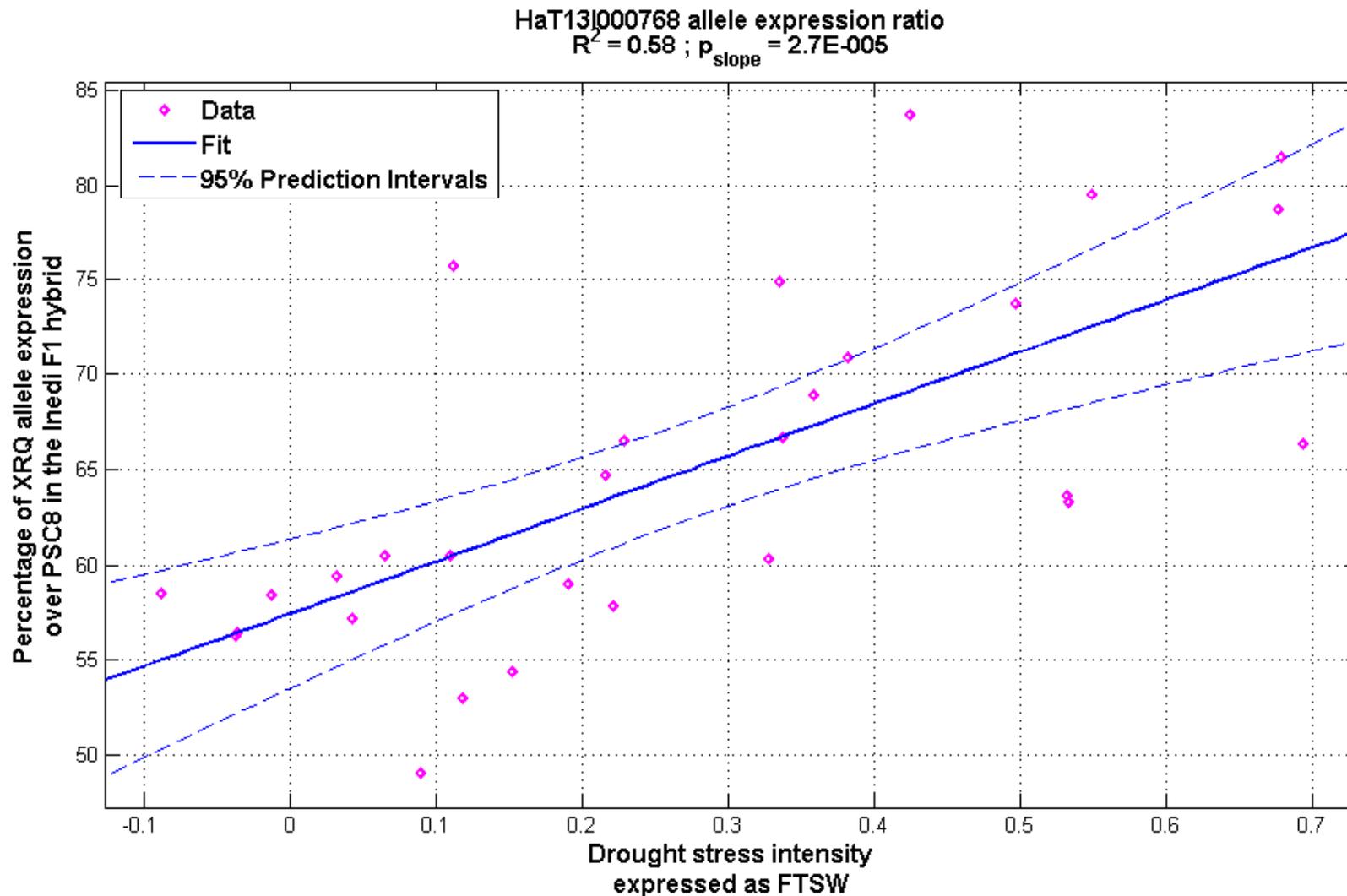


3 PLANTES HYBRIDES
Stress hydrique +++++



Expérience stress hydrique n°2

Résultats qPCR-AS 12S01 : 5 intensités de stress hydrique



Méthodes utilisées

qPCR-Allèle Spécifique vs PyroMark Q24



qPCR-AS



PyroMark Q24

Coût (1 gène 1 échantillon)	Plaquette (10 μ l final) : 0.79 € (Fluidigm GE 96.96 : 0.26 €)	4.89 € (+primer biotinylé \approx 28 €) Possibilité de réduire (volume PCR, volume enzymes pyroséquençage)
Débit	Plaquette 384 soit 192 échantillons/2 heures	24 échantillons/15-60min (dépend de la taille de la séquence)
Précision/Fiabilité	++	+++
Facilité d'utilisation	++	+++

Remerciements

Equipe « Tournesol »

Stéphane Muñoz
Nicolas Langlade
Patrick Vincourt

Plateforme Génomique

Marie Vidal
Cécile Donnadiou

Laboratoire Génétique Cellulaire (LGC)

Sophie Leroux
Frédérique Pitel



MERCI DE VOTRE ATTENTION