

---

---

**Analyse moléculaire de  
biomarqueurs — Méthode d'analyse  
SSR sur le tournesol**

*Molecular biomarker analysis — SSR analysis of sunflower*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO/TR 17622:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015>



**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/TR 17622:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2015, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

# Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Consommables et équipements</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>1</b>
4.1    Préparation de l'échantillon.....	1
4.2    Extraction et quantification de l'ADN.....	1
4.3    Amplification par PCR.....	2
<b>5</b> <b>Liste établie de marqueurs SSR pour le contrôle de la conformité des variétés hybrides de tournesol</b> .....	<b>3</b>
5.1    Caractéristiques des marqueurs SSR.....	3
5.2    Séquence des amorces des marqueurs SSR.....	4
5.3    Profils SSR observés sur les lignées de tournesol.....	5
<b>Bibliographie</b> .....	<b>6</b>

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TR 17622:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015>

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-95e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, Sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

## Introduction

Les essais d'identification variétale nécessitent l'utilisation de marqueurs de haute qualité qui permettent d'obtenir des données reproductibles à l'aide de différents équipements, produits chimiques et réactifs. Par conséquent, le présent Rapport technique ne traite que de méthodes d'amplification spécifiques du tournesol.

Le présent Rapport technique vise à fournir une liste de marqueurs SSR («simple sequence repeat» en anglais, répétition de séquences simples) et des méthodes d'analyse applicables au tournesol. Le jeu de marqueurs SSR a été établi sur la base de recommandations formulées par des biologistes moléculaires à l'aide de listes de marqueurs accessibles au public (pour les marqueurs ORS: Tang et al., 2002: TAG 105:1124-1136 et pour les marqueurs SSL: GIE Cartisol – Paris – France); ce jeu a ensuite été validé au moyen d'une étude intralaboratoire menée par le GEVES (Laboratoire BioGEVES, Domaine du Magneraud, CS40052, 17700 SURGERES). La méthode est utilisée lors des contrôles officiels de la conformité des hybrides, dans le cadre du processus d'inscription des variétés de tournesol au catalogue français des variétés.

Le présent document est lié à l'ISO 13495, dans laquelle les différentes étapes de la validation de la méthode sont décrites, et dans laquelle les critères d'acceptation sont définis.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TR 17622:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/TR 17622:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015>

# Analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthode d'analyse SSR sur le tournesol

## 1 Domaine d'application

Les méthodes et les marqueurs SSR décrits dans le présent Rapport technique peuvent être utilisés pour réaliser des contrôles de la conformité des hybrides et pour d'autres applications telles que la caractérisation moléculaire des variétés ou le contrôle d'identité variétale.

## 2 Principe

L'analyse SSR repose sur l'amplification d'une séquence et sur la visualisation de son polymorphisme, lequel a pour origine le nombre de répétitions d'un motif d'une longueur de deux à cinq bases (dit «microsatellite»). Le mode opératoire d'analyse SSR se compose des étapes suivantes: préparation de l'échantillon, extraction d'ADN, amplification par PCR, séparation et révélation des produits de PCR.

## 3 Consommables et équipements

- microplaque présentant 96 ou 384 puits;
- réactifs pour PCR (ADN polymérase, tampon, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, amorces, etc.);
- Réactifs pour électrophorèse capillaire;
- Broyeur; <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015>
- Centrifugeuse pour microplaques;
- Micropipettes à volume variable;
- Microcentrifugeuse pour microtubes;
- Système d'électrophorèse capillaire avec détection de fluorescence;
- Thermocycleur.

## 4 Mode opératoire

### 4.1 Préparation de l'échantillon

Pour chaque échantillon, des semences, prises individuellement ou en mélange, selon le contexte, sont broyées à l'aide d'un broyeur approprié (par exemple, IKA A10 ou Retsch MM301<sup>1)</sup>).

### 4.2 Extraction et quantification de l'ADN

- a) Prélever une aliquote sur chaque broyat homogène. La quantité nécessaire dépend du protocole d'extraction mis en œuvre;
- b) Extraire l'ADN à l'aide du protocole interne ou d'un protocole équivalent;

1) IKA A10 et Retsch MM301 sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

NOTE Une étude interlaboratoires a été menée à l'aide du kit dénommé QIAGEN DNeasy® 96 Plant Kit<sup>2)</sup>.

c) Le laboratoire vérifie que la quantité d'ADN extraite convient pour obtenir un résultat fiable.

### 4.3 Amplification par PCR

Les conditions sont optimisées pour le thermocycleur ABI 9700.

a) Préparation du mélange (voir [Tableau 1](#)).

**Tableau 1 — Préparation du mélange**

	Concentration	Volume pour 1X
H <sub>2</sub> O		3,125 µl
Tampon 10X	1X	1 µl
dNTP (10 mmol/l)	125 µmol/l	0,125 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/l)	3 mmol/l	1,2 µl
Taq ADN polymérase (5 U/µl)	0,25 U	0,05 µl
Amorce sens («forward») (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,25 µl
Amorce antisens («reverse») (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,25 µl
<b>Volume du mélange 1x</b>		<b>6 µl</b>
ADN (2,5 ng/µl)		4 µl
<b>Volume final pour PCR</b>		<b>10 µl</b>

b) Conditions d'amplification (voir [Tableau 2](#)). ISO/TR 17622:2015  
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02b91d59-dbed-4fed-93e0-1e41e89b4cf2/iso-tr-17622-2015

Un programme de PCR de type «touchdown» est utilisé: la température d'hybridation est abaissée de 64 °C à 55 °C par paliers de 1 °C à chaque cycle.

**Tableau 2 — Conditions d'amplification**

		10 cycles		30 cycles				
94 °C	94 °C	PCR «touchdown»		94 °C				
10:00	0:30	*	72 °C	0:30	72 °C	72 °C		
		64 °C	0:30		55 °C	0:30	10:00	10 °C
		0:30			0:30			∞

NOTE Les valeurs de temps données dans le [Tableau 2](#) sont présentées sous la forme suivante: "minutes:secondes".

2) QIAGEN DNeasy® 96 Plant Kit est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.



## 5 Liste établie de marqueurs SSR pour le contrôle de la conformité des variétés hybrides de tournesol

### 5.1 Caractéristiques des marqueurs SSR

Les données ci-dessous ont été obtenues avec un séquenceur 3130 Genetic Analyser<sup>3)</sup> (Applied Biosystems).

Voir [Tableau 3](#).

**Tableau 3 — Caractéristiques des marqueurs SSR**

N°	Marqueur SSR	Groupe de liaison	Nombre d'allèles observés	Plage des tailles d'allèles estimées (bp)	Indice de diversité de Nei <sup>a</sup>
1	ORS309	4	2	121 - 131	0,48
2	SSL003	14	6	118 - 142	0,70
3	ORS342	2	5	307 - 345	0,42
4	ORS547	5	7	178 - 191	0,68
5	ORS613	10	8	201 - 230	0,62
6	SSL171	—	6	129 - 162	0,62
7	ORS432	3	3	160 - 164	0,52
8	ORS510	9	3	248 - 259	0,37
9	ORS605	1	8	174 - 203	0,66
10	ORS329	8	2	231 - 236	0,41
11	ORS621	11	7	232 - 250	0,63
12	SSL283	—	4	130 - 141	0,76
13	ORS307	14	4	109 - 137	0,53
14	ORS811	17	3	106 - 155	0,62
15	ORS502	12	5	92 - 165	0,38
16	ORS407	16	4	426 - 447	0,43

<sup>a</sup> Les valeurs de l'indice de diversité de Nei ont été calculées à partir de 124 lignées mâles et femelles.

NOTE Source: Zhang et al., 2005[2].

3) 3130 Genetic Analyser est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.