RAPPORT TECHNIQUE

ISO/TR 17622

Première édition
2015-11-01

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

Molecular biomarker analysis — SSR analysis of sunflower

Numéro de référence
ISO/TR 17622:2015(F)

© ISO 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**

1 Domaine d'application **1**

2 Principe **1**

3 Consommables et équipements **1**

4 Mode opératoire **1**
4.1 Préparation de l'échantillon 1
4.2 Extraction et quantification de l'ADN 1
4.3 Amplification par PCR 2

5 Liste établie de marqueurs SSR pour le contrôle de la conformité des variétés hybrides de tournesol **3**
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

Bibliographie **6**

© ISO 2015 – Tous droits réservés

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).

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).

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.

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*.

© ISO 2015 – Tous droits réservés

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.

© ISO 2015 – Tous droits réservés

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, $MgCl_2$, dNTP, amorces, etc.);

— Réactifs pour électrophorèse capillaire;

— Broyeur;

— 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[1)]).

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.

© ISO 2015 – Tous droits réservés