

Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'*artemisia herba-alba*

Haouari M., Ferchichi A.

in

Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.).
Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62

2004
pages 115-119

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=4600142>

To cite this article / Pour citer cet article

Haouari M., Ferchichi A. **Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'*artemisia herba-alba***. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 115-119 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'*Artemisia herba-alba*

M. Haouari et A. Ferchichi

Institut des Régions Arides Médenine, 4119 Médenine, Tunisie

SUMMARY – *"Potential use of ISSR markers in the study of Artemisia herba-alba genetic polymorphism". Artemisia herba-alba is a widely represented plant in Tunisian semi-arid regions. It is potentially usable to restore degraded ecosystems. In this study we investigated the possibility of using ISSR markers to determine the genetic diversity in this plant. To achieve this goal we tried different DNA extraction techniques to obtain a good quality DNA that can be amplified and many PCR reaction parameters were tested to have clear and reproducible amplification patterns.*

Key words: *Artemisia herba-alba, DNA extraction, ISSR.*

Introduction

L'armoise blanche est une espèce à large distribution en Tunisie présaharienne. Son utilisation est préconisée pour la sauvegarde du potentiel pastoral et la restauration des écosystèmes dégradés. Dans ce cadre une étude est menée à l'I.R.A. (Médenine) pour déterminer le polymorphisme phylogénétique de cette espèce en vue de trouver les écotypes les mieux adaptés aux conditions contrastées du milieu. Un volet de cette étude concerne la détermination du polymorphisme génétique d'une collection d'armoise blanche installée au pastoretum de l'I.R.A. en se basant sur les marqueurs génétiques.

La variabilité génétique inter et intra spécifique étudiée concerne surtout les régions non codantes du génome qui se caractérisent par l'abondance de séquences très répétées au sein des quelles les mutations sont assez fréquentes. Cette variabilité a été étudiée par la technique de l'ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Matériel et méthodes

Matériel vegetal

Les feuilles d'armoise blanche ont été collectées à partir de 218 pieds provenant d'une collection maintenue en culture au pastoretum de l'I. R. A. (Médenine).

Extraction de l'ADN vegetal

Trois techniques d'extraction ont été évaluées. La première est celle de Dellaporta *et al.* (1983) ; la deuxième est celle de Doyle et Doyle (1990) et la troisième est celle de Linder *et al.* (2000).

Evaluation de la qualité de l'ADN

La qualité de chaque ADN est évaluée suivant sa digestibilité par une enzyme de restriction (*Sau* 3A) et sa capacité à être amplifié par PCR.

Optimisation de la réaction PCR

Choix des amorces :

Les amorces testées sont composées de répétitions de di, tri, au tétra nucléotides. Elles sont soit ancrées ou pas du côté 5'. Les amorces retenues sont celles donnant des bandes claires.

Détermination des paramètres optimaux de la réaction PCR

Pour optimiser la réaction PCR nous avons fait varier plusieurs paramètres notamment la concentration de Mg^{++} (1 mM à 3 mM, 5 valeurs), la concentration des amorces (10-50 μ M, 5 valeurs), la concentration de l'ADN matrice (dilution au 1/10, 1/100, 1/1000), la concentration des dNTP (100 à 500 μ M chacun, 5 valeurs).

Pour chaque réaction PCR un contrôle négatif (sans ADN) est toujours intégré.

Pour chaque amorce on détermine la température d'hybridation optimale parmi un minimum de 5 valeurs de températures testées.

L'amplification est réalisée dans des tubes de 0,2 ml en utilisant un thermocycleur Genius (Techne). Les conditions d'amplification sont les suivantes: une première dénaturation à 94 °C pendant 2 minutes suivie de 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94 °C (45 s), une hybridation à la température optimale déterminée (45 s) et une élongation à 72 °C (1,5 min). Enfin, une dernière étape d'élongation à 72 °C (5 min) est programmée.

Séparation et visualisation de l'ADN

La séparation des produits est faite sur gel d'agarose (0,8 %) pour l'ADN total et sur gel de polyacrylamide (5%) pour les produits d'amplification de la PCR. Les produits sont visualisés sous lumière U. V. Après coloration au bromure d'éthidium.

Résultats et discussion

D'après Sboui (2002), l'armoise blanche est une espèce très riche en métabolites secondaires (polyphénols et polysaccharides) pouvant se lier à l'ADN le rendant inaccessible aux enzymes. C'est pour cette raison que nos premiers efforts ont porté sur la mise au point d'une technique d'extraction capable de donner un ADN pouvant être utilisé comme support pour les réactions enzymatiques. Pour ce faire, trois techniques de base ont été utilisées. La technique de Dellaporta *et al.* (1983) se caractérise par un bon rendement mais l'ADN obtenu est de couleur jaune et non clivable par restriction enzymatique et non amplifiable par PCR (Fig. 1). Par contre le protocole de Doyle et Doyle (1990) a un rendement moyen et permet d'avoir un ADN de couleur blanche. Cet ADN peut être digéré partiellement par *Sau* 3A mais reste non amplifiable par PCR (Fig. 1).

1-ADN total obtenu par la technique de Dellaporta *et al.* (1983) ; 2= Même ADN que 1 après traitement par *Sau* 3A ; 4-ADN total obtenu par la technique de Doyle *et al.* (1983) ; 3-Même ADN que dans 4 après traitement par *Sau* 3A ; 6- ADN total obtenu par la technique de Linder *et al.* (2000) ; 5- Même ADN que dans 6 après traitement par *Sau* 3A

Les deux premiers protocoles ne donnant pas un ADN amplifiable nous avons testé un troisième protocole d'extraction où le tampon TRIS a été remplacé par l'acide borique. Ce protocole nous a permis d'avoir un ADN d'une très bonne qualité (Fig. 2), clivable par l'enzyme de restriction *Sau* 3A et amplifiable par PCR (Fig. 2)

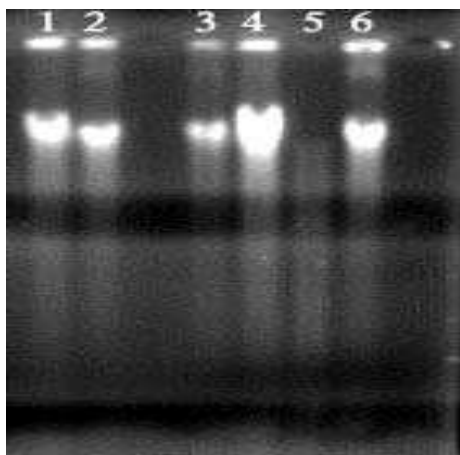


Fig. 1. Effet d'une enzyme de restriction (*Sau 3A*) sur l'ADN obtenu par trois différentes techniques d'extraction.

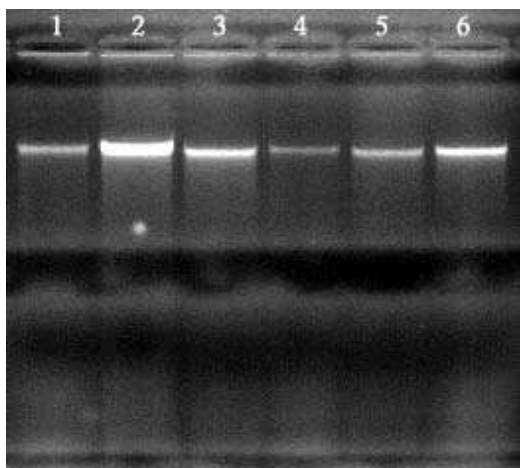


Fig. 2. ADN total de différents pieds d'armoise blanche après extraction par la technique de Linder *et al.* (2000).

Optimisation de la réaction PCR

Nous avons testé différents paramètres pouvant influencer sur la qualité et la reproductibilité de l'amplification des ISSR. Nous avons, en premier lieu, analysé l'effet de la température d'hybridation (Fig. 3). C'est ainsi que plus de 5 valeurs de températures ont été testées pour chaque amorce. Une température d'hybridation est considérée comme optimale lorsqu'on obtient des bandes claires et reproductibles.

L'étude de l'effet des autres paramètres sur la réaction PCR montre que la meilleure concentration de Mg^{++} utilisable est de 3mM (Fig. 4), qu'une dilution de l'ADN génomique au 1/10 est nécessaire pour avoir des bandes nettes, que la quantité optimale de l'amorce est de 20 μ M et que la concentration optimale des dNTP est de 200 μ M chacun.

Conclusion

Cette étude nous a permis de mettre au point une technique d'extraction d'un ADN de très bonne qualité à partir des feuilles d'armoise blanche malgré la très grande richesse de cette plante aromatique en composés secondaires.

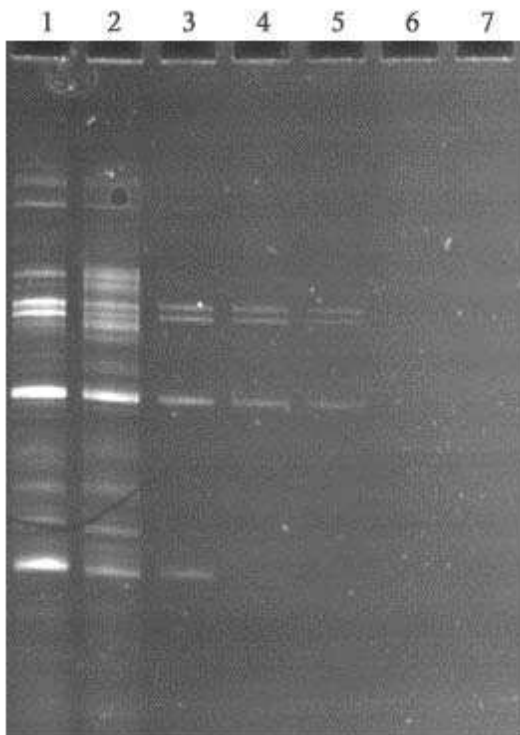


Fig. 3. Effet de la variation de la température d'hybridation sur la réaction PCR (amorce utilisée ACTGACTGACTGACTGACTG).
 1 = 50 °C ; 2 = 52 °C ; 3 = 54 °C ; 4 = 56 °C ; 5 = 58 °C ; 6 = 60 °C ; 7 = 62 °C

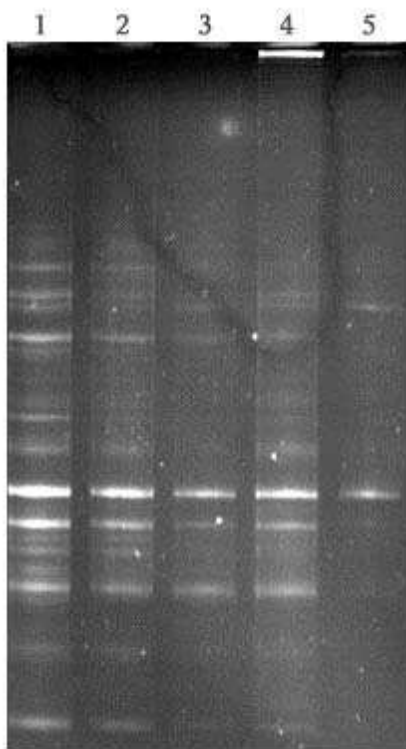


Fig. 4. Effet de la concentration de $MgCl_2$ sur la réaction d'amplification PCR.
 1 = 3 mM ; 2 = 2.5 mM ; 3 = 2 mM ; 4 = 1.5 mM ; 5 = 1 mM

L'optimisation des conditions de la réaction PCR pour l'amplification des ISSR nous a permis d'avoir des profils clairs et reproductibles.

Les amorces utilisées ce sont révélées très polymorphes donc l'utilisation des ISSR pour déterminer le polymorphisme génétique de l'armoise blanche paraît être un très bon choix.

Références

- Dellaporta SL, Wood J et Hicks JB, 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1 : 19-21.
- Doyle JJ et Doyle JL, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13-15.
- Linder CR, Moore LA et Jackson RB, 2000. A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology*. 9 : 1549-1559.