



HAL
open science

Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants en France

Sylvie Marhadour, C. Dargier, Florence Esnault, N. Laversin, Amandine Mear, M. Perramant, Y. Le Hingrat

► To cite this version:

Sylvie Marhadour, C. Dargier, Florence Esnault, N. Laversin, Amandine Mear, et al.. Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants en France. *Innovations Agronomiques*, 2014, 35, pp.161-172. hal-02635046

HAL Id: hal-02635046

<https://hal.inrae.fr/hal-02635046>

Submitted on 27 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants en France

Marhadour S.^{1,2}, Dargier C.³, Esnault F.², Laversin N.⁴, Méar A.^{1,2}, Perramant M.⁵, Le Hingrat Y.^{1,6}

Avec la collaboration de J. Soyer (CTPS, Geves), N. Ponserrre (Soc), F. Meytraud (Grocep), D. Zhang, V. Leclerc (INH-Agrocampus Ouest), M.L. Lesage (Inra), V. Wambre (SCL), V. Pavy (Comité Nord)

¹ FN3PT/RD3PT, 43-45, rue de Naples, 75008 Paris, France

² INRA UMR 1349 IGEPP, Keraiber, 29260 Ploudaniel, France

³ FN3PT, GNIS 64, rue du Louvre, 75001 Paris, France

⁴ Comité Nord, Rue des Champs Potez, 62217 Achicourt, France

⁵ Bretagne Plants, Roudouhir, 29460 Hanvec, France

⁶ FN3PT/RD3PT, Roudouhir, 29460 Hanvec, France

Correspondance: sylvie.marhadour@fnpppt.fr

Résumé

Un kit de marqueurs SSR est utilisé en routine dans 5 laboratoires français pour identifier les variétés de pomme de terre par leur empreinte génétique. L'information sur les profils moléculaires doit être échangée entre les partenaires de façon interactive. Une plateforme internet (IdeAle) a été construite par le service informatique de la FN3PT. L'accès au site se fait en mode sécurisé (https) par identifiant et mot de passe. Les données sont cryptées et localisées chez un hébergeur professionnel français. La base de données contient les profils de 939 variétés et 342 hybrides. La base contient de l'information pour 30 marqueurs : 7 de la procédure FN3PT/EPR utilisée pour la certification des plants et 23 spécifiques d'un projet Inra d'analyse de diversité génétique. Ces marqueurs représentent 551 allèles. 1483 profils ont été publiés. 10 nouveaux allèles du kit d'identification variétale ont été identifiés grâce au travail réalisé sur une partie de la collection de variétés gérée par l'Inra. La portabilité des marqueurs de ce kit sur plusieurs systèmes de révélation a été évaluée.

Mots-clés: plant de pomme de terre, identification variétale, marqueurs microsatellites, profils moléculaires, base de données

Abstract: Building a multi-users databasis for a better management of genetic fingerprints of potato varieties produced as seeds in France

A set of SSR markers is routinely used in 5 French labs for identification of potato cultivars by their genetic fingerprint. Information on molecular profiles has to be exchanged interactively. An internet platform named IdeAle was designed by FN3PT IT department. Login and password are needed to access the platform (https). Data are encrypted and hosted in a professional French data center. The database is now containing the profiles of 939 varieties and 342 hybrids. Information concerning 30 markers is available: 7 of the kit in use in the seed certification labs and 23 markers used in the molecular description of the Inra collection. 551 alleles are represented and 1483 profiles were published. 10 new alleles were added to the previously known pannel routinely in use thanks to the analyses of the Inra varieties collection. Transferability of the markers to various revelation systems was evaluated.

Keywords: seed potatoes, cultivar identification, Single Sequence Repeat markers (SSR), molecular profiles, database

Utilisation des outils moléculaires pour la caractérisation des ressources génétiques et l'identification variétale

Les marqueurs moléculaires sont utilisés de façon courante pour gérer et caractériser les ressources génétiques et identifier les variétés. Pour la gestion des ressources génétiques de pomme de terre en particulier, l'utilisation des marqueurs moléculaires aide à décrire la diversité génétique présente au sein des collections (Braun et al., 2004/5; Braun and Wenzel, 2004/5; Dehmer, 2010; Esnault et al., 2010; Gavrilenko et al., 2010; Ghislain et al., 2006; Ispuzà et al., 2007; Sukhotu et al., 2005). Cette caractérisation permet aussi de mieux comprendre l'origine des espèces et des variétés cultivées ainsi que les relations taxonomiques (Jacobs et al., 2008; Love, 1999; Spooner et al., 2005a; Spooner et al., 2005b; Van den Berg and Groendijk-Wilders, 2007). L'utilisation de données moléculaires combinée avec la description phénotypique des collections rend possible la construction de collections noyau ou core-collections (Chandra et al., 2002; Esnault et al., 2012; Huaman et al., 2000) et les travaux basés sur la génétique d'association (D'Hoop et al., 2010; D'hoop et al., 2008; Gebhardt et al., 2004).

Pour l'identification des variétés cultivées, les outils moléculaires peuvent être utilisés de façon complémentaire à la description phénotypique. De nombreuses études ont été publiées à ce sujet. On peut citer -de façon non exhaustive-, des travaux sur le *Pelargonium* (Becher et al., 2000), la rose (Esselink et al., 2002; Zhang et al., 2001), la carotte (Briard et al., 2001), la pêche (Aranzana et al., 2001), l'épinard (Khattak et al., 2007), la fraise (Brunings et al., 2010). Pour la pomme de terre, l'identification des clones permet de gérer efficacement les collections en permettant la détection de doublons, de problèmes d'étiquetage, d'inversion (Bamberg et al., 2001; del Rio et al., 2006; Perazzo et al., 2000) ainsi que de vérifier d'éventuelles anomalies relevées lors d'inspection visuelles. Des problèmes de fraudes sont parfois évoqués (Kandemir et al., 2010) voire détectés (Lopez Vizcon et Ortega, 2012). Si l'utilisation des marqueurs moléculaires pour identifier les variétés ne pose pas de problème, l'utilisation de ces outils pour la DHS (Distinction Homogénéité Stabilité) reste encore en discussion. L'utilisation des caractéristiques biochimiques a été approuvée par l'Union pour la Protection des Obtentions Végétales (Camlin, 2001). Un groupe de travail UPOV réfléchit à l'utilisation des marqueurs moléculaires pour la protection des variétés (Working Group on Biochemical and Molecular Techniques, and DNA-Profiling in Particular (BMT)). La pomme de terre est, avec la rose, un des modèles choisis par ce groupe (Marhadour et al., 2007; Marhadour et al., 2004; Reid, 2007). Dans certains cas, il est proposé de combiner l'information moléculaire avec l'information phénotypique pour gérer les collections de références nécessaires à la DHS (Bonhuis, 2011; Lombard et al., 2001). Dans une étude réalisée sur la tomate, les auteurs proposent d'utiliser, pour la DHS, des marqueurs liés à la résistance à certaines maladies (Arens et al., 2010).

Différents types de marqueurs moléculaires ont été utilisés pour l'identification variétale : AFLP (Arnaud et al., 2001; De Riek et al., 2001; Zhang et al., 2001), RAPD (Bernet et al., 2003; Briard et al., 2001), ISSR (Briard et al., 2001; Crespel et al., 2009), RFLP (Görg et al., 1992). Le consensus est désormais plutôt à l'utilisation des marqueurs microsatellites (SSR) essentiellement pour des raisons de reproductibilité (Chakrabarti et al., 2006; Jones et al., 1997; McGregor et al., 2000) et de niveau d'hétérozygotie (Powell et al., 1996). Les qualités nécessaires pour qu'un système de marquage soit efficace pour l'identification variétale sont en effet multiples: stabilité environnementale, fiabilité et reproductibilité expérimentale, coût raisonnable, simplicité et rapidité (Schneider et Douches, 1997; Sosinski et Douches, 1996). Avec l'évolution technologique, on peut maintenant envisager l'utilisation des marqueurs de type SNP (Cordeiro et al., 2006; De Koeijer et al., 2010).

Pour l'identification des variétés de pomme de terre, plusieurs types de marqueurs ont aussi été testés, arrivant rapidement à l'utilisation généralisée des marqueurs microsatellites. Un grand nombre de kits de marqueurs ont été publiés, dont la composition en marqueurs varie (Tableau 1). Les systèmes de révélation utilisés sont aussi variés : acrylamide suivie d'une coloration au nitrate d'argent, agarose et coloration au Bromure d'Ethidium, séquenceur capillaire.

L'Office Communautaire des Variétés Végétales a financé un projet de construction de base de données moléculaire microsatellites et phénotypique des variétés de pomme de terre impliquant les Pays-Bas, l'Ecosse, la Pologne ainsi que l'Allemagne. Ce projet s'est déroulé entre 2006 et 2008, le document final ayant été rendu public en 2010 (Anonymous, 2008). Le kit utilisé est composé des 9 marqueurs (Reid et Kerr, 2007) dont 3 sont communs avec le kit français.

Tableau 1. Récapitulatif des différentes études destinées à identifier les variétés de pomme de terre à l'aide de marqueurs microsatellites.

Nombre de marqueurs	Nombre de variétés	Référence
1	18	(Provan et al., 1996)
3	73	(Kawchuk et al., 1996)
7	24	(Schneider et Douches, 1997)
18	90 clones	(Ghislain et al., 2000)
2	12	(Ashkenazi et al., 2001)
3	50	(Corbett et al., 2001)
4	37	(Norero et al., 2002)
4	17	(Coombs et al., 2004)
5	207	(Moisan-Thiéry et al., 2005)
9	780	(Anonymous, 2008; Reid et al., 2011)
24	741 variétés et races locales	(Ghislain et al., 2004)
3	71	(Mathias et al., 2007)
2	24	(Rosa et al., 2010)
5	15	(Kandemir et al., 2010)
9	217	(Côté et al., 2013)

Le système utilisé en France : caractéristiques et applications

Pour la France, un kit de marqueurs issu d'un travail réalisé en collaboration entre la filière plants et l'Inra (appel d'offre CTPS terminé en 2004) a été publié en 2005 (Moisan-Thiéry et al., 2005). Au moment de sa publication, le kit était constitué de 5 marqueurs et permettait d'identifier 207 variétés. Au début du présent projet, 562 variétés étaient référencées avec ce même kit et deux nouveaux marqueurs étaient en cours d'ajout (Tableau 2).

Tableau 2. Description du nombre d'allèles déterminés par les marqueurs du kit d'identification au début du projet (*marqueurs en cours d'ajout)

Marqueur	Nombres d'allèles	Chromosome	Poids moléculaire approché (pb)
STM2005	7	XI	150-200
SSR1	14	VIII	200-230
STM1097	9	VII	230-280
Lemalx	5	V	120-140
STM2020	10	I	140-160
STGBSS*	10	VIII	Environ 120
STM5136*	12	I	210-250

Le kit est utilisé sur plusieurs sites : 2 laboratoires du Comité Nord (station de testage d'Achicourt (62) et station de création variétale de Bretteville du Grand Caux (76)), le laboratoire de Bretagne Plants à Hanvec (29), le laboratoire de l'Inra de Ploudaniel (29) où du personnel de la FN3PT est détaché, le Service Commun des Laboratoires SCL à Lille (62). Les profils sont obtenus en utilisant une procédure commune dans laquelle la numérotation des allèles est précisée et les profils des variétés témoins

décrits. Un laboratoire suisse réalise également des analyses avec le même kit (Agroscope Changins, Marhadour et al., 2011).

Un peu plus de 1500 tests sont réalisés chaque année.

La méthode est utilisée pour :

- tester les départs de multiplication et les premières générations de la production de plants de pomme de terre en France dans les Etablissements Producteurs Régionaux (EPR)
- contrôler les collections *in vitro* des EPR ainsi que la CNVS (Collection Nationale Variétale et Sanitaire) gérée par la FN3PT
- réaliser des tests ponctuels (certification, litiges, ...)
- réaliser des tests en points de vente (SCL)¹.

Dans le schéma de production de plants, les empreintes génétiques sont utilisées en appui aux inspections visuelles, notamment en cas de doute ainsi que pour les collections et les premières générations (Le Hingrat, 2012). La méthode est intégrée dans les procédures du Service Officiel de Contrôle². Comme l'identification par marqueurs microsatellites ne permet pas de distinguer un mutant éventuel de son clone d'origine, un contrôle visuel des plants en végétation dans un champ de conformité des souches est mené chaque année sur le matériel de sélection.

Depuis 2003, la méthode et les laboratoires sont régulièrement évalués par un essai interlaboratoire organisé par le Gnis/Soc. Des échantillons sont prélevés sous numéro par un inspecteur et envoyés aux participants qui doivent identifier les variétés.

Nécessité de disposer d'un outil informatique adapté pour gérer les données et les analyses

Avec l'appropriation de la procédure par les différents laboratoires partenaires, l'augmentation du nombre de variétés identifiées (207 en 2005, 562 en 2008, 939 en 2013) et le nombre croissant de tests réalisés chaque année, des limites au système avaient été identifiées. Ces limites concernaient principalement la mise à jour du fichier commun contenant les profils génétiques.

D'autre part, le transfert de connaissances entre l'identification variétale et la caractérisation des ressources génétiques est intéressant dans les deux sens : connaître les marqueurs montrant le maximum de diversité lors des analyses de ressources génétiques, aider à la gestion des collections lorsqu'elles contiennent des variétés cultivées. Ce transfert de connaissances n'avait pas encore eu lieu.

Objectifs du projet

L'objectif du projet était de construire un outil informatique pour :

- améliorer la coordination et la réactivité des partenaires habituels de l'identification variétale pomme de terre,
- améliorer la traçabilité des analyses et échantillons,
- faciliter les échanges d'informations sur les empreintes génétiques de pomme de terre entre les analyses de diversité (ressources génétiques) et d'identité.

¹ La méthode de référence dans le cadre de ces tests étant l'électrophorèse des protéines, les marqueurs microsatellites sont utilisés en cas de doute ou de non-conformité détectée.

² Protocole relatif au contrôle de l'identité variétale pour le matériel de départ des plants de pomme de terre

Cet outil informatique a été nommé IdeAle (Acronyme d'Identification et Variétale) au cours du projet.

Présentation de l'outil IdeAle et des données

Solution technique retenue

Après l'étude des besoins et des fonctionnalités attendues (partage, temps réel, sécurisation), trois architectures générales avaient été envisagées : plateforme internet, plateforme client/ serveur (C/S), architecture hybride avec un serveur web sans site internet et une plateforme C/S. La solution finalement retenue a été de construire le système autour d'une plateforme internet. L'accès au site https se fait à l'aide d'un login et d'un mot de passe. Le site est localisé chez un hébergeur français. Les données sont cryptées. Différents niveaux d'habilitation sont prévus. La base de données est articulée autour de plus de 60 tables et permet de faire des recherches sur les profils.

Spécificités de l'outil

Le système permet de gérer simultanément des données confidentielles (hybrides) et des données communes (variétés). C'est un système où l'utilisateur décide des données qu'il va mettre à disposition des autres selon des critères tels que la confidentialité mais aussi de leur fiabilité.

Les données mises à disposition de tous sont vérifiées avant publication par un super-administrateur en fonction de la cohérence, du contenu et de la reproductibilité des données d'un laboratoire à l'autre. Cette phase de publication peut induire des reprises éventuelles d'essai.

Le système permet également de prendre en compte les correspondances entre différents systèmes de révélation (Nitrate d'Argent, séquenceur à gel, séquenceur capillaire), sous réserve que les correspondances aient été validées auparavant et renseignées (cf infra).

Contenu de la BDD

Les données actuellement en ligne représentent 1281 génotypes dans la base commune dont 939 variétés et 342 hybrides ou génotypes sous numéro. 1483 profils sont publiés et ont été obtenus à partir de 30 marqueurs : 7 de la procédure FN3PT/EPR et 23 spécifiques d'un projet Inra d'analyse de diversité génétique (projet Corpotato, (Esnault et al., 2010)). Ces marqueurs représentent 551 allèles révélés par 3 systèmes différents (voir infra).

Analyse de la portabilité des marqueurs du kit entre les différents systèmes et identification de nouveaux allèles

Justification

Dans les laboratoires des Etablissements Producteurs Régionaux et au laboratoire du SCL de Lille, la révélation des marqueurs est réalisée par une coloration au nitrate d'argent (Moisan-Thiéry et al., 2005). Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement coûteux. Elle est cependant assez sensible aux variations de l'environnement (qualité de l'eau, température, ...) et n'est plus adaptée lorsque le nombre d'échantillons à analyser devient trop important. D'autre part, les substances chimiques utilisées sont nocives (formaldéhyde, ...) sans que des produits de substitution soient disponibles.

Pour révéler les marqueurs microsatellites, il est également possible d'utiliser un séquenceur à gel (type LI-COR®) ou un séquenceur capillaire (type ABI). Ces modes de révélation sont adaptés à de grands effectifs, permettent un multiplexage plus important des marqueurs mais nécessitent un investissement plus coûteux.

Avec l'augmentation du nombre d'échantillons à tester, il est important de prévoir l'évolution de la technique actuelle vers l'un ou l'autre des systèmes. Pour cela, il est nécessaire de connaître la portabilité des marqueurs d'un système à l'autre afin de pouvoir tirer parti des données acquises par les

laboratoires professionnels. Par portabilité, on entend l'identification possible des mêmes allèles d'un système à l'autre pour un marqueur donné. Cette portabilité doit être évaluée car les conditions de séparation (gel d'acrylamide, polymère dans les capillaires) ainsi que les conditions de révélation (coloration chimique, excitation laser, détection de fluorescence) sont différentes. Par ailleurs, l'étape d'amplification par PCR pourrait également induire des changements par rapport à la méthode d'origine, les amorces utilisées étant marquées (Infra Red Dye ou fluorochrome).

Des analyses préliminaires réalisées sur le site Inra de Ploudaniel par la FN3PT montrent que la portabilité semble bonne entre le nitrate d'argent et le séquenceur à gel de type *LI-COR*®. Ces analyses ont cependant porté sur un nombre réduit d'échantillons. Une autre analyse comparative avait pu être réalisée en 2007 entre les données FN3PT/EPR et des données provenant de la SASA (Service & Advice for Scottish Agriculture). La comparaison avait porté sur 102 variétés et deux marqueurs (SSR1 et STM2005) révélés au séquenceur capillaire. Par ailleurs, les données FN3PT/EPR ont pu être comparées avec des données suisses (Agroscope Changins, E. Droz communication personnelle). La comparaison a porté sur les profils de 30 variétés obtenus avec 4 marqueurs sur séquenceur de type *LI-COR*®. Les comparaisons ont été à chaque fois globalement satisfaisantes, laissant penser que les marqueurs semblent portables d'un système à l'autre. Ceci nécessitait cependant d'être confirmé en étendant la gamme variétale et en analysant le kit complet sur les 3 systèmes de révélation possibles.

Dans le cadre du projet, la portabilité des marqueurs a été testée sur une gamme étendue de génotypes grâce à l'implication de l'équipe Inra. Pour cela, les profils des variétés communes au projet Inra Corpotato (Esnault et al., 2010) et à la base de données FN3PT/EPR ont été comparés. La comparaison a porté sur 7 marqueurs microsatellites incluant les marqueurs de la procédure actuelle et 3 systèmes de révélation (nitrate d'argent, séquenceur *LI-COR*® et séquenceur capillaire). La collection représentant une gamme variétale étendue au delà du matériel européen, le travail devait également permettre de révéler de nouveaux allèles.

Matériel et méthode

Un génotypage complet des 350 variétés du projet Corpotato (Centre de Ressources Biologiques BrACySol) a été réalisé pour 7 marqueurs (Tableau 2) sur séquenceur capillaire à la plateforme de génotypage GENTYANE (Inra Clermont Ferrand) et sur séquenceur *LI-COR*® sur le site Inra de Ploudaniel. Le génotypage a été réalisé dans les deux cas en marquage direct des amorces forward.

L'étude des correspondances entre allèles a porté sur les 184 variétés communes entre le projet Corpotato et la base de données préexistante FN3PT/EPR.

Les données de génotypage acquises *de novo* ont été comparées aux données acquises par les laboratoires professionnels. La comparaison a porté sur chaque allèle de chaque marqueur et a consisté à identifier les correspondances possibles entre allèles d'un système à l'autre.

Résultats

Concernant la portabilité des marqueurs entre le système acrylamide/nitrate d'argent et le séquenceur capillaire, seuls 2 marqueurs (STM1097 et SSR1) sont complètement transférables c'est-à-dire que tous les allèles sont révélés de la même façon dans les deux systèmes (Tableau 3). Trois autres marqueurs présentent une bonne portabilité globale à l'exception de quelques allèles (STM2005, 1 allèle ; lemalx, 2 allèles et STM5136, 2 allèles). Les allèles des deux marqueurs restants (STM2020, STGBSS) ne sont que peu ou pas portables.

Concernant la portabilité des marqueurs entre le système acrylamide/nitrate d'argent et le séquenceur *LI-COR*®, la portabilité est bonne pour tous les marqueurs à l'exception d'un allèle du marqueur lemalx et d'un allèle du marqueur STM2020 (allèle 7, Figure 1).

Le génotypage des 350 variétés avec les 7 marqueurs du kit a permis d'identifier 10 nouveaux allèles (résultats de séquenceur *LI-COR*®, Tableau 3 et Figure 2). Deux d'entre eux ont pour le moment été

reproduits dans la procédure habituelle. Ils avaient également été observés en utilisant le séquenceur capillaire.

Tableau 3. Résultats de la comparaison des différentes méthodes de révélation pour chaque marqueur du kit d'identification, en terme de nombres d'allèle portables d'un système à l'autre. Le nombre de nouveaux allèles identifiés sur la totalité du test de 350 variétés de la collection Inra est aussi indiqué (séquenceur *LI-COR*®).

Marqueurs	Comparaison AgNO3/Séquenceur capillaire		Comparaison AgNO3/Séquenceur <i>LI-COR</i> ®		Nouveaux allèles identifiés
	Allèles portables	Allèles non portables	Allèles portables	Allèles non portables	
STM2005	6	1	7	0	1
SSR1	11	0	11	0	3
STM1097	9	0	9	0	0
Lemalx	3	2	3	1	0
STM2020	2	6	9	1	2
STGBSS	7	3	9	0	2 (+1à confirmer)
STM5136	10	1	9	0	1

Figure 1. Diversité allélique pour le marqueur STM2020 révélé sur séquenceur *LI-COR*®. Les chiffres indiqués correspondent au codage des allèles (Illustration Inra).

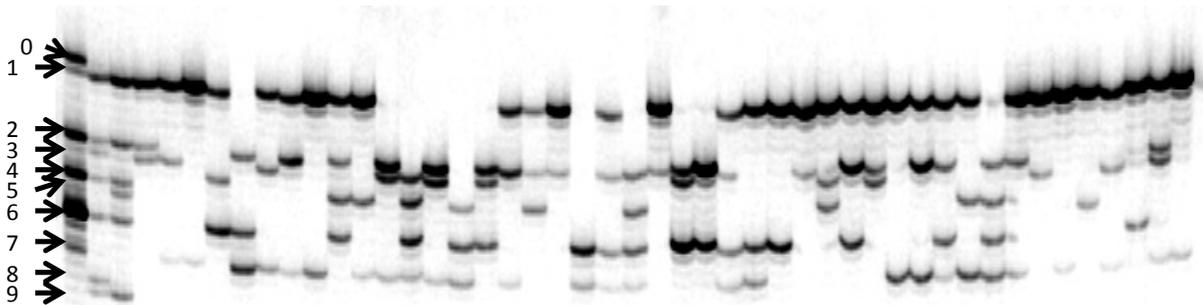
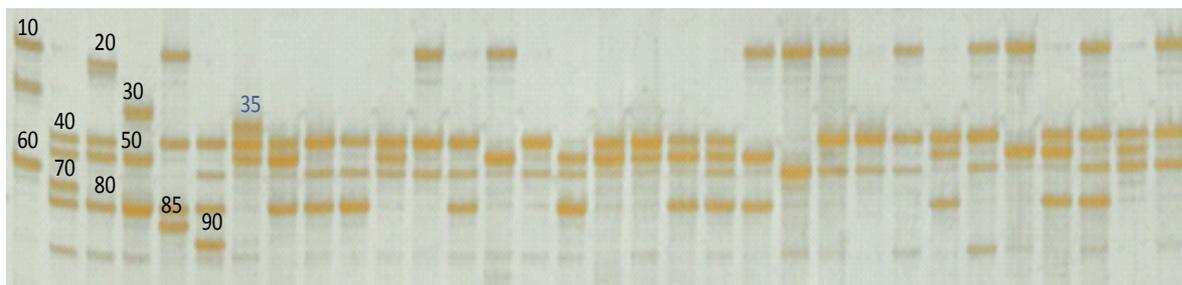


Figure 2. Diversité allélique pour le marqueur STM5136 révélé au nitrate d'argent. Les chiffres indiqués correspondent au codage des allèles. L'allèle codé 35 correspond à un nouvel allèle identifié dans le cadre du projet (Illustration Comité Nord).



Conclusion

Cette analyse montre que la portabilité des marqueurs de la procédure habituelle ne semble pas évidente vers le séquenceur capillaire sauf pour deux marqueurs SSR1 et STM1097. Le marqueur SSR1 faisait partie de la comparaison avec les données de la SASA. Par contre, le marqueur STM2005 faisait aussi partie de la comparaison alors que dans notre étude, un des allèles n'est pas portable. Les analyses sur séquenceur capillaire devraient donc être au moins en partie répétées pour confirmer nos conclusions.

La portabilité des marqueurs de la procédure habituelle sur le séquenceur à gel est plus évidente : seuls deux 2 allèles présentent des différences de révélation entre les deux systèmes. Ces allèles posaient déjà quelques difficultés dans la procédure habituelle.

Perspectives

Le projet a permis de concevoir et construire l'architecture générale de l'outil tel qu'imaginé lors de l'étude des besoins. Il reste cependant des modules à perfectionner et certaines fonctionnalités à construire (gestion des échantillons ADN, données de référence).

Le travail réalisé sur la portabilité des marqueurs d'un système à l'autre permet de privilégier l'évolution de la technique vers l'utilisation d'un séquenceur de type *LI-COR*®. Les raisons tiennent à : 1) la possibilité de continuer à travailler avec le même panel de marqueurs avec quelques aménagements, 2) la possibilité de gérer plus facilement des nombres plus importants d'analyses grâce au multiplexage et 3) à la suppression de l'étape de coloration.

Depuis plusieurs années, le réseau français construit autour de la méthode d'identification travaille à sa reconnaissance : communications sur la méthode, essais inter-laboratoire, ... La procédure commune a été récemment remise à jour avec l'ajout de deux marqueurs supplémentaires et transmise au Gnis/Soc. L'utilisation « habituelle » de la procédure est le contrôle des départs de multiplication de plants de pomme de terre. Les collections sont contrôlées et des tests ponctuels sont réalisés chaque année en cas de doute ou de mélange. La méthode est également utilisée depuis quelques années pour le contrôle de certains lots VATE lors de l'inscription des variétés en France. La FN3PT a participé à la rédaction de la norme AFNOR NF V 03-045 « Principes de sélection et critères de validation des méthodes d'identification variétale par analyses d'acides nucléiques » étendue au niveau international (Iso 13495 novembre 2013) .

Comme indiqué dans la partie introductive, il existe différents kits de marqueurs microsatellites utilisés avec différents objectifs et selon différentes méthodes de révélation. Notre kit se caractérise par son efficacité (petit nombre de marqueurs, grand nombre de variétés identifiées). Il est adapté à l'utilisation principale que nous en faisons : identification des variétés pour sécuriser le schéma de production de plants de pomme de terre en France. Des kits comportant un plus grand nombre de marqueurs sont utilisés pour décrire des collections, comme le kit issu du projet financé par l'OCVV (Anonymous, 2008). Par ailleurs, le projet OCVV se poursuit afin de mettre à jour la base de données avec les nouvelles variétés passant à l'inscription en Europe. Enfin, un projet européen est en cours pour identifier 500 vieilles variétés de pomme de terre ayant des identifiants non fiables (homonymies, synonymie, mêmes noms utilisés de façon répétée...) avec 12 marqueurs microsatellites. Ceci entre dans le cadre de la construction d'une collection AEGIS (Banque de gènes virtuelle européenne <http://aegis.cgiar.org/>) de variétés de pomme de terre. La France a pu intégrer le projet grâce au versement d'une liste nationale de variétés au Traité International sur les Ressources Phytogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture (TIRPAA, FAO). Ceci devrait permettre d'améliorer la concertation entre les équipes européennes impliquées dans l'identification moléculaire des variétés de pomme de terre.

Remerciements

Ces travaux ont reçu le soutien financier du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (C2008-21-Pommes de terre).

Références bibliographiques

Anonymous, 2008. CPV.6608 Final Report Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties in the EU common catalogue. pp. 35.

- Aranzana M.J., Arus P., Carbo J., King G.J., 2001. AFLP and SSR markers for genetic diversity analysis and cultivar identification in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Acta Horticulturae* 546, 367-370.
- Arens P., Mansilla C., Deinum D., Cavellini L., Moretti A., Rolland S., Van der Schoot H., Calvache D., Ponz F., Collonnier C., Mathis R., Smilde D., Caranta C., Vosman B., 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical and Applied Genetics* 120, 655-664.
- Arnaud G., Lallemand J., Bourgoin M., 2001. Are AFLP the best alternative for cultivar identification ? *Acta Horticulturae* 546, 301-306.
- Ashkenazi V., Chani E., Lavi U., Levy D., Hillel J., Veilleux R.E., 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44, 50-62.
- Bamberg J.B., Kiru S.D., Del Rio A.H., 2001. Comparison of reputed duplicate populations in the Russian and US potato genebanks using RAPD. *American Journal of Potato Research* 78, 365-369.
- Becher S.A., Steinmetz K., Weising K., Boury S., Peltier D., Renou J.P., Kahl G., Wolff K., 2000. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 643-651.
- Bernet G.P., Bramardi S., Calvache D., Carbonell E.A., Asins M.J., 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122, 146-152.
- Bonthuis H., 2011. Combining morphological and molecular distance in the management of the reference collection of potato, UPOV Working group in biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular.
- Braun A., Schullehner K., Wenzel G., 2004/5. Molecular analysis of genetic variation in potato (*Solanum tuberosum* L.) II. International cultivar spectrum. *Potato Research* 47, 93-99.
- Braun A., Wenzel G., 2004/5. Molecular analysis of the genetic variation in potato (*Solanum tuberosum* L.) I. German cultivars and advanced clones. *Potato Research* 47, 81-92.
- Briard M., Le Clerc V., Mausset A.E., Veret A., 2001. A comparative study of ISSR, microsatellites and RAPD markers for varietal identification of carrot genotypes. *Acta Horticulturae* 546, 377-385.
- Brunings A.M., Moyer C., Peres N., Folta K.M., 2010. Implementation of simple sequence repeat markers to genotype Florida strawberry varieties. *Euphytica* 173, 63-75.
- Camlin M.S., 2001. Possible future roles for molecular techniques in the identification and registration of new plant cultivars. *Acta Horticulturae* 546, 289-296.
- Chakrabarti S.K., Pattanayak D., Sarkar D., Chimote V.P., Naik P.S., 2006. Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biologia Plantarum* 50, 531-536.
- Chandra S., Huaman Z., Hari Krishna S., Ortiz R., 2002. Optimal sampling strategy and core collection size of Andean tetraploid potato based on isozyme data - a simulation study. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1325-1334.
- Coombs J.J., Frank L.M., Douches D.S., 2004. An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. *American Journal of Potato Research* 81, 143-150.
- Corbett G., Lee D., Donini P., Cooke R.J., 2001. Identification of potato varieties by DNA profiling. *Acta Horticulturae* 546, 387-390.
- Cordeiro G., Elliott F., McIntyre C.L., Casu R.E., Henry R.J., 2006. Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 113, 331-343.
- Côté M.-J., Leduc L., Reid A., 2013. Evaluation of simple sequence repeat (SSR) markers established in Europe as a method for the identification of potato varieties grown in Canada. *American Journal of Potato Research* 90, 340-350.
- Crespel L., Pernet A., Le Bris M., Gudin S., Hibrand Saint Hoyant L., 2009. Application of ISSRs for cultivar identification and assessment of genetic relationships in rose. *Plant Breeding* 128, 501-506.
- D'Hoop B., Fernandez A.L.A., Paulo M.J., van Eeuwijk F.A., Voorrips R.E., Maliepaard C., van Eck H., 2010. SNP markers and their associations in tetraploid potato, Potato breeding after the completion of the DNA sequence of the potato genome, Wageningen, The Netherlands.

- D'hoop B., Paulo M.J., Mank R.A., Van Eck H., van Eeuwijk F.A., 2008. Association mapping of quality traits in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Euphytica* 161, 47-60.
- De Koeyer D., Douglass K., Murphy A., Whitney S., Nolan L., Song Y., De Jong W., 2010. Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato. *Molecular Breeding* 25, 67-90.
- De Riek J., Calsyn E., Everaert I., van Bockstaele E., de Loose M., 2001. AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103, 1254-1265.
- Dehmer K.J., 2010. Assessing genetic diversity in potato wild species via SSR markers, Potato breeding after the completion of the DNA sequence of the potato genome, Wageningen, The Netherlands.
- del Rio A.H., Bamberg J.B., Huaman Z., 2006. Genetic equivalence of putative duplicate germplasm collections held at CIP and US potato genebanks. *American Journal of Potato Research* 83, 279-285.
- Esnault F., Chauveau A., Berard A., Boland A., Le Paslier M.C., Brunel D., Chauvin J.E., 2012. Diversity analysis of a potato (*Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*) core collection using the SolCAP chip, SOL2012, 9th Solanaceae Conference, Neuchatel, Suisse. pp. 126.
- Esnault F., Perretant M.R., Label A., Boutet G., Chauvin J.E., 2010. Analysis of genetic diversity in a potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) collection using microsatellite markers, 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, Bologna, Italy. pp. 127.
- Esselink G.D., Smulders M.J.M., Vosman B., 2002. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 277-286.
- Gavrilenko T., Antonova O., Ovchinnikova A., Novikova L., Krylova E., Mironenko N., Pendinen G., Islamshina A., Shvachko N., Kiru S., Kostina L., Afanasenko O., Spooner D., 2010. A microsatellite and morphological assessment of the Russian national cultivated potato collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57, 1151-1164.
- Gebhardt C., Ballvora A., Walkemeier B., Oberhagemann P., Schöler K., 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding* 13, 93-102.
- Ghislain M., Andrade D., Rodriguez F., Hijmans R.J., Spooner D.M., 2006. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 113, 1515-1527.
- Ghislain M., Rodriguez F., Villamon F., Nunez J., Waugh R., Bonierbale M.W., 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification, CIP program report, CIP. pp. 167-174.
- Ghislain M., Spooner D.M., Rodriguez F., Villamon F., Nunez J., Vasquez C., Waugh R., Bonierbale M.W., 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 881-890.
- Görg R., Schachtschabel U., Ritter E., Salamini F., Gebhardt C., 1992. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Science* 32, 815-819.
- Huaman Z., Ortiz R., Zhang D., Rodriguez F., 2000. Isozyme analysis of entire and core collections of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* potato cultivars. *Crop Science* 40, 273-276.
- Ispuzúa V.N., Guma I.R., Feingold S., Clausen A.M., 2007. Genetic diversity of potato landraces from the northwestern Argentina assessed with simple sequence repeats (SSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 1833-1848.
- Jacobs M.M.J., Van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G.A., Visser M., Mank R., Sengers M., Hoekstra R., Vosman B., 2008. AFLP analysis reveals lack of phylogenetic structure within *Solanum* section *Petota*. *BMC Evolutionary Biology* 8, 145.
- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevschi A., Marmiroli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A., 1997. Reproducibility

- testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3, 381-390.
- Kandemir N., Yilmaz G., Bedrettin Karan Y., Borazan D., 2010. Development of a simple sequence repeat (SSR) marker set to fingerprint local and modern potato varieties grown in central anatolian plateau in Turkey. *African Journal of Biotechnology* 9, 5516-5522.
- Kawchuk L.M., Lynch D.R., Thomas J., Penner B., Sillito D., Kulscar F., 1996. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *American Journal of Potato Research* 73, 325-335.
- Khattak J.Z.K., Christiansen J.L., Torp A.M., Andersen S.B., 2007. Genic microsatellite markers for discrimination of spinach cultivars. *Plant Breeding* 126, 454-456.
- Le Hingrat Y., 2012. Sécuriser le schéma de production de plant. *La Pomme de Terre Française* 581, 46-47.
- Lombard V., Dubreuil P., Dillmann C., Baril C., 2001. Genetic distance estimators based on molecular data for plant registration and protection: a review. *Acta Horticulturae* 546, 55-63.
- Lopez Vizcon C.C., Ortega F.F., 2012. Detection of mislabelling in the fresh potato retail market employing microsatellite markers. *Food Control* 26, 575-579.
- Love S.L., 1999. Founding clones, major contributing ancestors and exotic progenitors of prominent north american potato cultivars. *American Journal of Potato Research* 76, 263-272.
- Marhadour S., Kerlan M.C., Dessenne N., Perramant M., Le Hingrat Y., 2007. Use of SSR markers for variety identification and certification of seed potatoes in France, Ad Hoc crop subgroup on molecular techniques for potato, Second Session, UPOV, Quimper, France.
- Marhadour S., Le Hingrat Y., Kerlan M.C., Bozec M., 2004. Overview of experience gained in France on the use of molecular markers for seed potato certification and respective interest of SSR markers and visual inspection, Ad Hoc Subgroup on Molecular Techniques for Potato, First Session, UPOV, Poznan, Poland.
- Marhadour S., Droz E., Laversin N., Méar A., Pavy V., Perramant M., Wambre V., Cloatre E., Ponserrre N., Le Hingrat Y., 2011. Potato variety identification using SSR in France and Switzerland, in: J. Santala and J. P. T. Valkonen (Eds.), EAPR 2011, the 18th Triennial Conference of the European Association For Potato Research, Oulu, Finland. pp. 205.
- Mathias M.R., Sagredo B.D., Kazalich J.B., 2007. Use of SSR markers to identify potato germplasm in the INIA Chile breeding program. *Agricultura Técnica (Chile)* 67, 3-15.
- McGregor C.E., Lambert C.A., Greyling M.M., Louw J.H., Warnich L., 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113, 135-144.
- Moisan-Thiéry M., Marhadour S., Kerlan M.C., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T., Le Hingrat Y., 2005. Potato cultivar identification using simple sequence repeat markers (SSR). *Potato Research* 48, 191-200.
- Norero N., Malleville J., Huarte M., Feingold S., 2002. Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification. *Potato Research* 45, 131-138.
- Perazzo G., Panta A., Rodriguez F., Gomez R., Toledo J., Huaman Z., Ghislain M., Golmirzaie A.M., Roca W., 2000. Clonal true-to-type verification of potato accessions retrieved from in vitro conservation and cryopreservation, CIP Program Report 1999-2000, CIP. pp. 175-183.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2, 225-238.
- Provan J., Powell W., Waugh R., 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics* 92, 1078-1084.
- Reid A., 2007. Identification of potato cultivars on the european union common catalogue using simple sequence repeat (SSR) markers, Ad Hoc crop subgroup on molecular techniques for potato, Second Session, UPOV, Quimper, France.

- Reid A., Hof F., Felix G., Rücker B., Tams S., Milczynska E., Esselink D., Uenk G., Vosman B., Wietz A., 2011. Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU common catalogue. *Euphytica* 182, 239-249.
- Reid A., Kerr E.M., 2007. A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genetic Resources : Characterization and Utilization* 5, 13.
- Rosa P.M., Campos T.d., Sousa A.C.B.d., Sforca D.A., Torres G.A.M., Souza A.P.d., 2010. Potato cultivar identification using molecular markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 45, 110-113.
- Schneider K., Douches D.S., 1997. Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint north American potato cultivars. *American Potato Journal* 74, 149-160.
- Sosinski B., Douches D.S., 1996. Using polymerase chain reaction-based DNA amplification to fingerprint north american potato cultivars. *HortScience* 31, 130-133.
- Spooner D.M., McLean K., Ramsay L., Waugh R., Bryan G., 2005a. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *PNAS* 102, 14694-14699.
- Spooner D.M., Nunez J., Rodriguez F., Naik P.S., Ghislain M., 2005b. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 1020-1026.
- Sukhotu T., Kamijima O., Hosaka K., 2005. Genetic diversity of the andean tetraploid cultivated potato (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes) evaluated by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome* 48, 55-64.
- Van den Berg R.G., Groendijk-Wilders N., 2007. AFLP data support the recognition of a new tuber-bearing *Solanum* species but are uninformative about its taxonomic relationships. *Plant Systematic Evolution* 269, 133-143.
- Zhang D., Besse C., Cao M.Q., Gandelin M.H., 2001. Evaluation of AFLPs for variety identification in modern rose (*Rosa hybrida* L.). *Acta Horticulturae* 546, 351-357.