




Les outils bio-moléculaires en sélection

Vers l'utilisation d'outils de génotypage haut débit

S. Marhadour - FN3PT/ Inra UMR Igepp



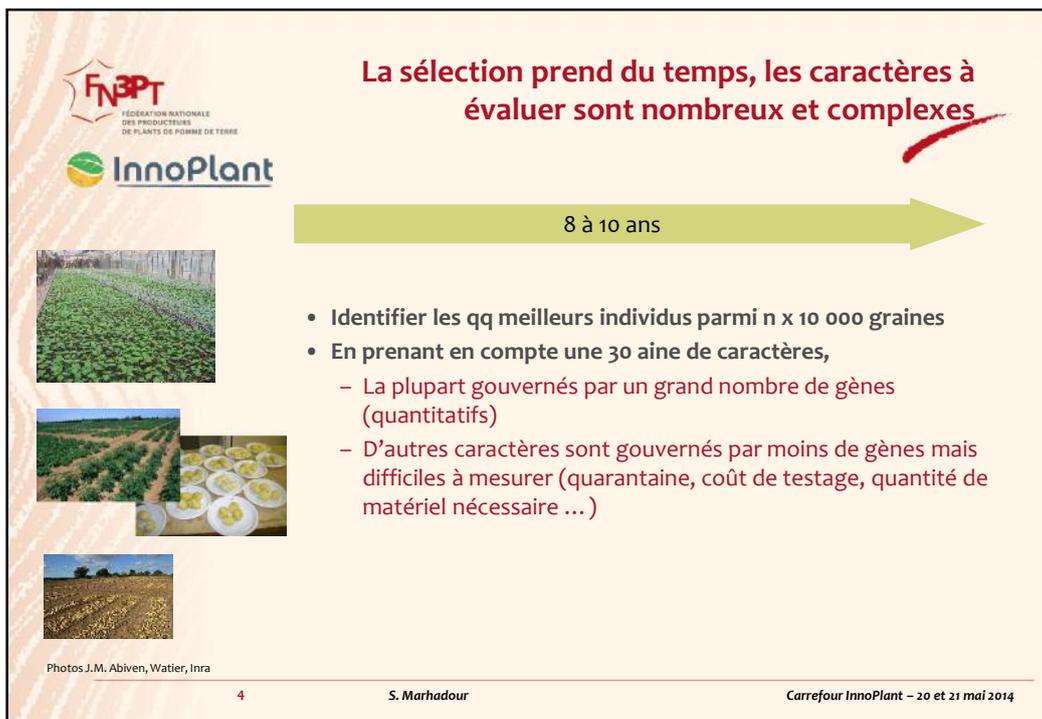
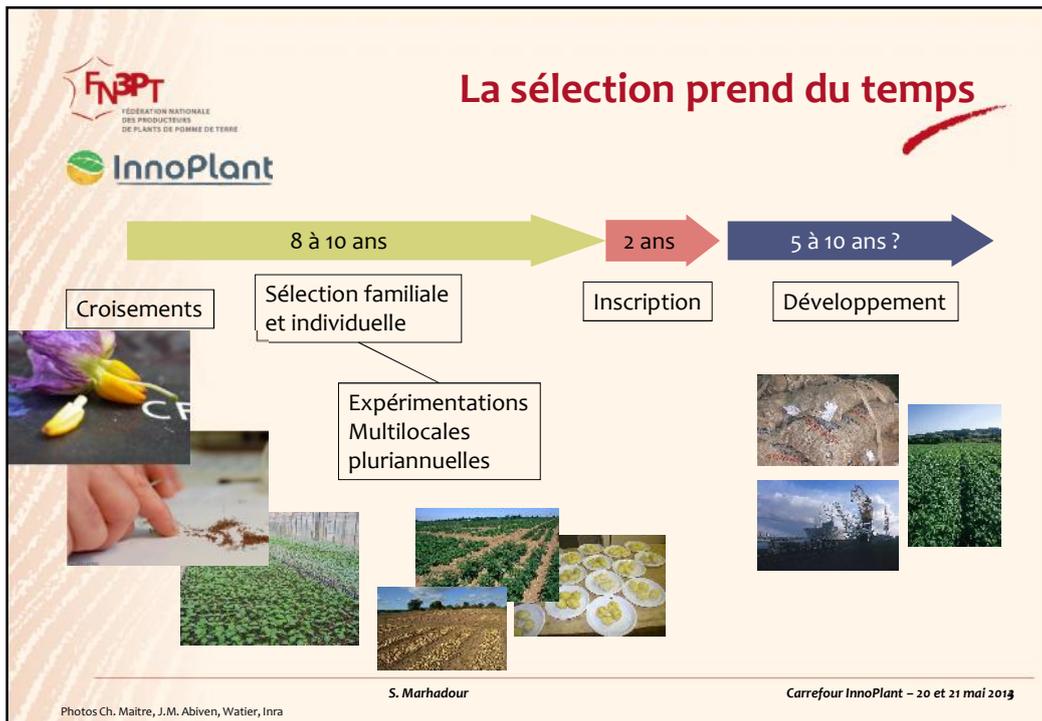
Vers l'utilisation du génotypage haut débit en sélection

- Sélection assistée par marqueurs (SAM)
 - Contexte
 - Evolution récente
- Apports prévus d'InnoPlant
 - Résultats de tests sur des marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism)
 - De l'importance d'aller vers le génotypage haut débit pour la caractérisation des collections
- Perspectives

2

S. Marhadour

Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014



L'aide de la Sélection Assistée par Marqueurs dans le processus de sélection

FN3PT
FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE

InnoPlant

- Les marqueurs moléculaires sont utiles pour ces caractères difficiles
 - Cibler par une sélection précoce au laboratoire sur l'ADN des génotypes à fort potentiel pour continuer la sélection phénotypique
 - Caractériser la diversité génétique disponible
 - Construire des génotypes (introgression, pyramidage, ...)
 - Prédire la performance des hybrides (sélection génomique)

S. Marhadour

Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

Sélection assistée par marqueurs en pomme de terre: contexte

FN3PT
FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE

InnoPlant

- Un petit nombre de marqueurs est disponible
- En majorité pour la résistance aux bioagresseurs
 - H1 / *G. rostochiensis*,
 - Ry_{sto}, Ry_{adg}, Ny, ... /PVY
 - Plusieurs marqueurs/ Mildiou
 - Plusieurs marqueurs/ *G. pallida*
- Ils sont, pour certains d'entre eux, communément utilisés
 - car les sources de résistance sont assez peu diversifiées
 - Moloney et al 2006, 2010; Schultz et al 2012; Dalton et al 2013; Sliwka et al 2010; Ottoman et al 2009; Sagredo et al 2009; Lopez-Pardo et al 2013; Mori et al 2011; Milczarek et al 2011; Witek et al 2006; Gebhardt et al 2011

6

S. Marhadour

Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




Sélection assistée par marqueurs en pomme de terre: contexte

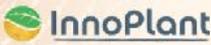
- Outils d' « ancienne génération » mais efficaces et faciles à mettre en œuvre, peu nombreux, caractères mono ou oligogéniques
- Au niveau Français:
 - le contrat de branche SAM avait permis d'avancer (2006-2009, Kerlan et al 2013)
 - Inra: Développement de marqueurs spécifiques pour sélectionner la résistance à *G. pallida* d'origine *S. sparsipilum* (Kerlan et al), géniteurs mis à disposition de l'ACVNPT en 2009
 - Programme FN3PT/EPR: marqueurs supplémentaires pour la résistance au mildiou, à *G. rostrchiensis*, ...




7

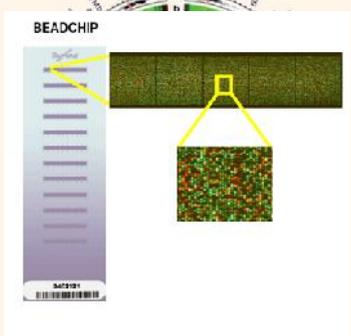
S. Marhadour

Kerlan M.C., Marhadour S., et al (2013) Innovations agronomiques 27:111-122.
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

Évolution du contexte: de nouveaux outils avec un débit augmenté

- Séquence de référence *S. phureja* rendue publique 844 Mpb (2011)
- Outils de génotypage haut débit à la pomme de terre à présent disponibles
 - Puce 8300 SNP SolCap (Hamilton et al 2011), puce 20k néerlandaise (2013)
 - Arrivée du NGS (Next Generation Sequencing) depuis 2012 (Uitdewilligen et al 2012), travail en cours au JHI (Bryan et al 2013)



8

S. Marhadour

Figure 1 | The potato genome. a. Ideograms of the 12 potato chromosomes of PGSC, Nature 475,189




Que permettent ces nouveaux outils haut débit ?

- Un grand nombre de marqueurs générés
- Possibilités accrues pour l'analyse et la sélection de caractères quantitatifs : génétique d'association
 - Beaucoup de marqueurs (n*1000) sur beaucoup de génotypes (n*100)
 - Nécessite un phénotypage au niveau
- Mais
 - Coût élevé du « ticket d'entrée »
 - Pour les NGS : compétences particulières requises en analyse de données notamment à cause de la polyploidie de la pomme de terre

9
S. Marhadour
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




Apports prévus du programme d'InnoPlant?

- **Axe 2: Innovation variétale et autres leviers de gestion limitant le recours aux intrants phytosanitaires**
 - **WP3: Exploiter et structurer les ressources génétiques**
 - **Action 3.1 Etude de différentes technologies de génotypage SNP sur pomme de terre**
 - **Action 3.2 Positionnement de la diversité génétique des collections de géniteurs de l'Inra et des obtenteurs d'un point de vue moléculaire et phénotypique (mildiou)**

10
S. Marhadour
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

FN3PT
FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE

InnoPlant

Les SNP SolCAP sont utilisables sur le matériel européen avec plusieurs technologies (action 3.1)

- 48 géotypes de la core collection développée à l'Inra géotypés sur puce Illumina avec les 8303 SNP SolCAP (Esnault et al 2010, 2012)

BEADCHIP

AAAA
AAAB
AABB
BBBB

11 S. Marhadour Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

FN3PT
FÉDÉRATION NATIONALE
DES PRODUCTEURS
DE PLANTS DE POMME DE TERRE

InnoPlant

Les SNP SolCAP sont utilisables sur le matériel européen avec plusieurs technologies (action 3.1)

- 150 individus d'une population de cartographie génétique géotypés avec 13 SNP avec la technologie Kaspar (Marhadour et al, 2011, 2012)

DNA shearing
Ngs-BMP Assay shearing

Sealing for high density PCR plate
Fluorescence detection

Thermocycling : different PCR plate (96, 384, 1536 wells)
SNP calling and sorting (8, 164, 1636 well)

TTTT
CTTT
CCTT
CCCT

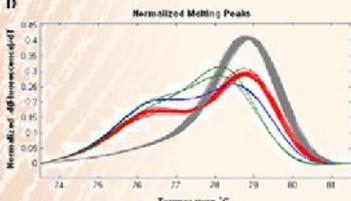
12 S. Marhadour Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

Perspectives: tester le HRM (High Resolution Melting)



| Technologie | Illumina | Kaspar | HRM |
|--------------------------------------|-----------|-----------|------|
| Nombre de marqueurs | +++ | + | + |
| Nombre d'individus | + | +++ | ++ |
| Technicité | +++ | +++ | ++ ? |
| Diversité analysable <i>a priori</i> | ++ | ++ | +++ |
| Analyse de données | maitrisée | maitrisée | nd |

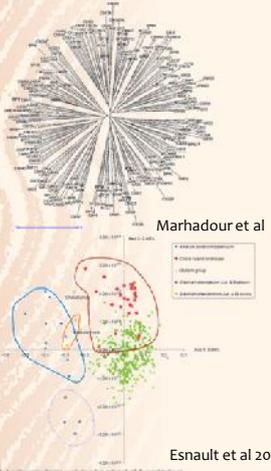
D



- intérêts du HRM:
 - pas *d'a priori* sur le polymorphisme: extension de la diversité
 - petit nombre d'échantillons et de SNP,
 - permet de développer ses propres SNP
 - gérable « à la maison » avec un investissement *a priori* + limité (lightcycler)

De Koeyer et al 2010 13 S. Marhadour Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

Positionnement de la diversité moléculaire et phénotypique des collections obtenteurs et Inra (Action 3.2) ?

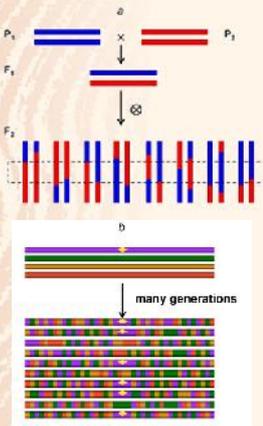



- Analyser la répartition de la diversité génétique entre les collections Inra et obtenteurs
 - Orienter ou améliorer l'exploitation de la diversité/ croisements
 - Premier pas vers la génétique d'association qui offre la possibilité d'analyser sur un panel commun des caractères différents et quantitatifs
- Nécessite:
 - Génotypage haute densité
 - Phénotypage « au niveau »

Marhadour et al Esnault et al 2013 Esnault F., et al (2013) Plant Genetic Resources : Characterization and Utilization 16:15. 14 S. Marhadour Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




L'intérêt de l'approche génétique d'association pour l'espèce pomme de terre



- Analyse de collections de génotypes/populations biparentales
- La pomme de terre est un bon modèle pour cette approche issue de la génétique humaine
 - Allogamie
 - Hétérozygotie des parents
 - Variations phénotypique et génotypique importantes
 - Populations "related by descent"

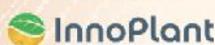
Gebhardt, C., K. et al. (2007). Crop Science.

Zhu, C., M. et al. (2008). The Plant Genome.

15

S. Marhadour

Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014

De nombreux travaux en cours

- en Europe et ailleurs
- Depuis les premiers papiers de Gebhardt et al, Simko et al du début des années 2000
- Une quinzaine de papiers sur *S. tuberosum*
 - Résistance aux bioagresseurs: mildiou, nématodes, verticilliose
 - Noircissement après cuisson, sucrage à basse température,
 - Sur des collections de variétés et/ou d'hybrides
 - Par les principales équipes de recherche en génétique (D, NL, Ecosse, ...)
- Identification de marqueurs utilisables en sélection pour des caractères polygéniques
 - Cf Li L., et al . (2013). TAG 126:1039-1052.
 - Validation en sélection de 11 marqueurs: meilleur comportement pour sucrage à basse température et teneur en amidon

16

S. Marhadour

Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




À la recherche de financements spécifiques

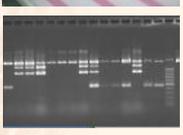
- Dans le cadre du programme de travail d'InnoPlant
- Plusieurs projets ont été construits: diversité des collections, analyse de la résistance au mildiou, au virus Y et sensibilité à la PTNRD
 - Partenaires: Inra/FN3PT/ACVNPT
 - Génotypage SNP 8303 SolCAP
 - Phénotypage par les partenaires
 - En attente ...

17
S. Marhadour
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




Conclusions et Perspectives






- Depuis la fin du dernier projet regroupant l'ensemble des partenaires français, les outils disponibles ont été pris en main dans les établissements de sélection
 - Réflexions sur les niveaux d'intégration,
 - les avantages et les risques,
 - les modalités de réalisation des tests (internes/externes),
 - la formation des personnels ...

S. Marhadour
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




Conclusions et Perspectives

- **Des possibilités accrues offertes par les technologies haut débit, pour**
 - Avancer sur les caractères à déterminisme complexe
 - et la sélection une fois les marqueurs cibles identifiés
 - Mais pour le moment les coûts restent un obstacle, alors que le virage est pris chez nos concurrents

19
S. Marhadour
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014




Conclusions et Perspectives

- **Une marche supplémentaire reste à franchir pour**
 - Donner aux sélectionneurs des outils pour construire des génotypes répondant aux attentes en particulier environnementales (mildiou, ...)
 - ... A long terme sélection génomique ? partir de l'information génétique pour prédire le phénotype

20
S. Marhadour
Carrefour InnoPlant – 20 et 21 mai 2014



MERCI DE VOTRE ATTENTION

