Empreintes génétiques du chou-fleur par RAPD et vérification de la pureté hybride F_1 d'un lot de semences

S Boury, I Lutz, M-C Gavalda, F Guidet, A Schlessier

Groupement d'intérêt public, Prince de Bretagne biotechnologie, Penn Ar Prat, 29250 Saint-Pol-de-Léon, France

(Reçu le 5 mai 1992; accepté le 2 septembre 1992)

Résumé — Les variétés hybrides F_1 de chou-fleur (*Brassica oleracea* var *botrytis*), permettant des récoltes homogènes, sont très appréciées des producteurs. Toutefois, la production de ces semences hybrides est délicate et les lots peuvent être contaminés par des graines issues de l'autofécondation de la lignée parentale femelle. Le taux d'*in-breds* est donc déterminé avant la commercialisation d'un hybride pour éviter tout accident de récolte. Actuellement, ceci est réalisé par un test phénotypique. Pour gagner du temps et obtenir des résultats non ambigus, nous proposons de le remplacer par une technique récente de biologie moléculaire : la RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) qui correspond à des amplifications par PCR (*Polymerase chain reaction*) réalisées chacune avec une seule amorce dont la courte séquence a été formulée au hasard. Le but est d'obtenir un marqueur de la lignée parentale mâle qui ne peut être détecté que chez les seuls hybrides. Pour adapter cette technique à notre matériel végétal, nous avons fait varier certains paramètres de PCR. Nous avons ainsi pu constater que la température de l'étape d'hybridation de l'amorce et la concentration de cette dernière influencent les amplifications. La RAPD s'est avérée fiable et rapide comme outil de contrôle de la pureté hybride F_1 de lots de semences de chou-fleur.

Brassica oleracea var *botrytis* = chou-fleur / hybride F_1 / *Inbred* / RAPD / amorce

Summary — Genetic fingerprinting in cauliflower by the RAPD method and determination of the level of inbreeding in a set of F_1 hybrid seeds. F_1 hybrid varieties of cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*), which produce homogeneous crops, are popular with growers. However, the production of these hybrid seeds is difficult and they may be contaminated by inbreds ie seeds arising from self-fertilization of the maternal line. The level of inbred occurrence is therefore determined before marketing the hybrid to avoid problems with the crop. At the moment this is carried out by a phenotypical test. In order to save time and ensure non-ambiguous results, detection of the level of inbreds is proposed via a new molecular biology technique, the RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) method, which is based on PCR (*polymerase chain reaction*) amplifications each carried out with a single primer, the short sequence of which has been randomly written. The goal is to obtain a marker of the paternal line which can only be detected in hybrids. To adapt this method to our plant material, we tested and modified various PCR parameters. We were thus able to determine that the annealing temperature and the primer concentration act upon amplifications. The RAPD method therefore proved to be a reliable and fast tool for assessing the purity of cauliflower F_1 hybrid seed.

Brassica oleracea var *botrytis* = cauliflower / F_1 hybrid / inbred / RAPD / primer

INTRODUCTION

Afin d'améliorer les espèces végétales cultivées, les sélectionneurs utilisent de plus en plus des techniques de biologie moléculaire. En effet, des marqueurs moléculaires peuvent être associés à certains caractères phénotypiques des plantes, permettant alors l'obtention de véritables empreintes génétiques des variétés étudiées. Ainsi, le sélectionneur dispose d'un outil l'aidant au

choix des plantes à croiser pour la création de nouvelles variétés. Une sélection rapide et efficace est donc possible grâce au suivi, dans la descendance de ces croisements, de caractères agronomiques parentaux intéressants, avant même leur expression phénotypique.

Le premier outil moléculaire du sélectionneur a été l'étude de familles d'iso-enzymes. Une famille est composée de protéines enzymatiques catalysant la même réaction chimique mais différant,

par exemple, par leur composition en acides aminés ou leur longueur (Tanksley and Orton, 1983). Mais le polymorphisme enzymatique ne révèle qu'une faible part du polymorphisme génomique, car moins de 10% de l'ADN végétal code pour des protéines. De nouvelles techniques, étudiant directement la molécule d'ADN, sont ensuite apparues. Elles s'intéressent à la fois aux portions codantes et non codantes du génome. Il s'agit de la technique RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*, pour revue : Tanksley et al, 1989) et de la toute récente technique RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*, Williams et al, 1990). La première résulte d'une distribution différente des sites de restriction des endonucléases, d'un génome à un autre, générant un polymorphisme des longueurs des fragments de restriction. La seconde révèle également des variations de séquence nucléotidique entre génomes. Elle correspond à une répartition différente, d'une plante à une autre, des sites d'hybridation d'une courte amorce oligonucléotidique monocaténaire, dont la séquence a été formulée au hasard. Après amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*, pour revue : Erlich et al, 1989) avec une amorce de ce type, un polymorphisme des profils électrophorétiques des fragments d'ADN amplifiés est souvent observé entre plusieurs génomes.

Chez beaucoup d'espèces cultivées, la production de variétés hybrides F_1 s'est développée depuis quelques années car ces dernières fournissent souvent de meilleurs rendements. Ainsi, après les hybrides de chou-fleur d'automne, les premiers hybrides de chou-fleur d'hiver (*Brassica oleracea* var *botrytis*) apparaissent sur le marché. Leur homogénéité génétique permet à l'agriculteur de réduire considérablement le nombre de passages nécessaires pour la récolte. La castration manuelle des organes mâles de la lignée femelle n'est pas envisageable chez le chou-fleur dont les fleurs, très nombreuses, sont bisexuées et de petite taille. La production de ces hybrides de chou-fleur repose donc sur l'emploi de lignées mâles-stériles ou auto-incompatibles en tant que parents femelles. Ce dernier caractère est le fruit de l'expression d'un locus multiallélique (pour revue : Nasrallah et al, 1991). Cette auto-incompatibilité est rarement stricte et elle peut même être levée lors de conditions climatiques inhabituelles. Des risques de même nature peuvent aussi être encourus par l'utilisation de certaines stérilités mâles, dont l'expression peut ne pas être parfaite. Dans les 2

cas, ceci est à l'origine d'une contamination plus ou moins importante des lots de semences hybrides par des graines issues de l'autofécondation de la lignée parentale femelle. Or, la variété hybride ne peut être commercialisée qu'avec une très faible contamination. Jusqu'à présent, le taux d'autofécondation résiduel du parent femelle (taux d'*inbreds*) était évalué par un test phénotypique sur un échantillon d'une centaine de plantes. Afin de distinguer les hybrides et les *inbreds*, il est souvent nécessaire qu'ils aient atteint un stade de développement suffisant, ce qui constitue une perte de temps pour la commercialisation. La RAPD peut résoudre ce problème en supplantant le test phénotypique par l'analyse moléculaire de très jeunes plants. En effet, le profil électrophorétique des fragments d'ADN amplifiés à partir de l'ADN de la lignée mâle (profil RAPD) peut présenter une ou plusieurs bandes qui le distinguent de celui de la lignée femelle. Le profil RAPD d'une plante dont les parents sont homozygotes doit théoriquement être constitué de l'ensemble des bandes des profils parentaux. Ainsi, le profil d'un hybride F_1 doit présenter les bandes spécifiques de la lignée parentale mâle contrairement à celui d'un *inbred*.

Pour optimiser l'obtention de profils RAPD à partir d'ADN de chou-fleur, nous avons fait varier certains paramètres de PCR. Dans cet article, nous décrivons l'influence de ces variations sur les profils RAPD. Nous illustrons l'intérêt de cette technique par une application simple : la détermination du taux d'*inbreds* d'un lot de semences de chou-fleur supposées hybrides F_1 .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal : choux-fleurs (*Brassica oleracea* var *botrytis*)

L'ensemble du matériel végétal utilisé provient du programme d'amélioration génétique du chou-fleur conduit par l'INRA en collaboration avec les organisations professionnelles bretonnes.

Les lignées L_1 et L_2 ont été fournies par l'INRA et nous ont servi pour la mise au point de la méthode RAPD avec de l'ADN de chou-fleur.

Nous avons ensuite déterminé le taux d'*inbreds* de 2 lots de semences supposées hybrides :

– l'un nous a été fourni par le Groupement malouin de sélection (GMS):

$$F_{1GMS} : L_3 \times L_4$$

– l'autre par l'Organisation bretonne de sélection (OBS) :

$$F_{1OBS} : L_2 \times \begin{matrix} L_5 \\ \text{et} \\ L_6 \end{matrix}$$

Chacun de ces 2 lots était accompagné par une plante de chaque lignée parentale. Les graines ont été semées en «mini-mottes de terreau» placées en serre. Soulignons que 2 lignées sœurs de chou-fleur L_5 et L_6 ont servi de parents mâles pour l'hybride fourni par l'OBS. Elles présentent, en effet, le même phénotype et ont des génotypes peu distants, car elles sont issues de la 6^e génération d'autofécondation d'une même plante initiale.

Extractions de l'ADN des choux-fleurs

Les ADN des lignées parentales fournies par l'INRA et le GMS (L_1 , L_2 , L_3 et L_4) ont été extraits selon le protocole de Dellaporta *et al* (1983) auquel de petites modifications ont été apportées : l'extraction est effectuée à partir de feuilles lyophilisées et l'ADN subit une unique précipitation à l'isopropanol. Cette dernière précède une purification en gradient de CsCl. La bande d'ADN est prélevée et le bromure d'éthidium (BrEt) est éliminé avec du butanol saturé en TE (10 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, pH = 8,0, et 1 mmol.l⁻¹ CTBA, pH = 8,0) puis l'ADN est précipité par 3 volumes d'éthanol 70% pendant 30 min à -20 °C afin d'éliminer le CsCl. Il est finalement remis en suspension dans du TE et sa concentration est alors évaluée au spectrophotomètre (Sambrook *et al*, 1989). L'ADN des lignées parentales fournies par l'OBS (L_2 , L_5 et L_6) a été extrait selon ce même protocole mais avec 2 précipitations successives à l'isopropanol et sans ultracentrifugation en gradient de CsCl (l'ADN de la lignée L_2 extrait ainsi sera noté par la suite L_2^*).

L'ADN des jeunes plantes hybrides F_1 a été extrait selon la méthode rapide d'Edwards *et al* (1991). Chaque culot d'ADN a été resuspendu dans 400 µl de TE dont seulement 1 µl sert à la réalisation d'une amplification RAPD.

Oligonucléotides

Les oligonucléotides des séries SB et JW (tableau I) ont été synthétisés au laboratoire du Dr Ferrec (Centre de transfusion sanguine de Brest). Les séquences des amorces SB ont été conçues au laboratoire et celles de la série JW sont inspirées de Williams *et al* (1990). Tous ces oligonucléotides, livrés sous forme lyophilisée, ont été remis en suspension dans du TE. Leur concentration a été estimée en considérant qu'une unité de densité optique à 260 nm équivaut à 33 µg d'amorce par ml (Sambrook *et al*, 1989). Leur séquence, supérieure à dix nucléotides et d'au moins 40% de bases G+C (limites minimales pour l'obtention

de fragments amplifiés en RAPD, Williams *et al*, 1990), respecte les contingences imposées à une amorce de PCR, notamment l'absence de séquences palindromiques, de polypurines et de polypyrimidines.

Les amorces des séries C et D (tableau I) proviennent de la société Operon (Alameda, USA). Livrées sous forme lyophilisée, elles ont été remises en suspension selon les spécifications du fournisseur.

Amplification de fragments aléatoires d'ADN

Le protocole d'amplification est une adaptation de celui décrit par Williams *et al* (1990). Chaque réaction de PCR est réalisée dans un volume de 25 µl recouvert de 2 gouttes d'huile minérale. Le milieu d'amplification contient, soit 1 µl d'ADN extrait selon Edwards *et al* (1991) soit 12,5, 25 ou 75 ng d'ADN extrait selon Dellaporta *et al* (1983). Différentes concentrations en oligonucléotide ont été testées : 0,3, 0,8 et 1,6 µmol.l⁻¹ pour les amorces des séries SB et JW, ou 0,2, 0,5 et 1 µmol.l⁻¹ pour celles d'Operon. Chaque échantillon contient également 1 unité de *Taq* polymérase (différentes marques ont été essayées), 100 µM de chaque nucléotide libre (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia), 10 mmol.l⁻¹ de Tris-HCl, pH = 8,0, 50 mmol.l⁻¹ de KCl et 1,5 mmol.l⁻¹ de MgCl₂. Pour les manipulations effectuées avec la *Taq* polymérase Promega, les 25 µl contiennent en plus 0,1% de Triton X-100. Un témoin sans ADN matrice est réalisé lors de chaque manipulation pour révéler d'éventuelles contaminations par de l'ADN exogène.

Les amplifications ont été réalisées dans un appareil DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer Cetus). Les 45 cycles programmés comportent une étape de dénaturation à 94 °C, pendant 1 min (3 min pour le premier cycle), une phase d'hybridation des amorces à 30 °C d'1 min également et une étape de polymérisation à 72 °C, durant 2 min. Les transitions entre chaque palier de température sont les plus brèves possibles.

Tableau I. Caractéristiques des oligonucléotides cités dans cette étude.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique	Nb de nucléotides	Proportion de bases GC
SB1	GTTAGACCATTC	12	41,67%
SB2	GTTAGACCAT	10	40%
JW1	ACCTCGAGCACTGTCT	16	56,25%
JW2	CGGTCACGTGT	10	60%
JW3	TGCTCACTGA	10	50%
C02	GTGAGGCGTC	10	70%
C06	GAACGGACTC	10	60%
D12	CACCGTATCC	10	60%
D20	ACCCGGTCAC	10	70%

Electrophorèse des fragments d'ADN amplifiés

La révélation de la taille des fragments amplifiés se fait par électrophorèse en gel d'agarose (1,4%) dans un tampon TAE 1x (0,04 mol.l⁻¹ Tris-acétate et 0,001 mol.l⁻¹ EDTA, pH = 8,0; Sambrook *et al*, 1989) et est visualisée sous lumière ultraviolette après coloration au bromure d'éthidium.

RÉSULTATS

Influence de certains paramètres d'amplification sur les profils RAPD

Différentes conditions d'amplification ont été testées afin d'optimiser la technique RAPD avec de l'ADN de chou-fleur. Ainsi, nous avons essayé 3 quantités d'ADN matrice (12,5, 25 ou 75 ng) et 3 concentrations en amorce (0,3, 0,8 et 1,6

μmol.l⁻¹ pour les oligonucléotides des séries SB et JW, et 0,2, 0,5 et 1 μmol.l⁻¹ pour ceux d'Opéron, fournis en moins grande quantité).

Le profil RAPD d'une plante, obtenu avec un oligonucléotide donné, est resté le même avec les 3 quantités d'ADN matrice utilisées. Ce résultat a été vérifié pour de multiples couples ADN-amorce (fig 1).

Nous avons souvent observé que les fragments d'ADN amplifiés sont d'autant plus courts que la concentration en amorce du milieu est forte (fig 2). Ainsi, sur la figure 2a les bandes s'échelonnent de 740 pb (bande peu visible) à 2 900 pb pour une concentration de 0,3 μmol.l⁻¹ d'oligonucléotide, et de 560 pb à 1 600 pb pour 1,6 μmol.l⁻¹ d'amorce. La figure 2b illustre de la même manière ce phénomène. Compte tenu de ce résultat, nous avons utilisé ces 2 gammes de concentrations d'amorce pour la recherche de marqueurs RAPD de nos différentes lignées de chou-fleur.

Fig 1. Amplifications avec différentes concentrations d'ADN matrice. Amplifications réalisées avec 1,6 μmol.l⁻¹ d'amorce (a, SB2 et b, JW2). ADN matrice : ADN des lignées L₁ (pistes 2, 4, 6, 8, 10 et 12) et L₂ (pistes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) en quantités variables : 75 ng (pistes 1, 2, 7 et 8), 25 ng (pistes 3, 4, 9 et 10) ou 12,5 ng (pistes 5, 6, 11 et 12). Témoins sans ADN matrice : avec SB2, piste T₁, et avec JW2, piste T₂. Marqueur de masses moléculaires (pistes M; 1 kb DNA ladder; Gibco BRL).

Fig 2. Influence de la concentration en amorce sur un profil RAPD. Amplifications réalisées avec une concentration en amorce de $1,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (SB1: pistes 1 et 2, et JW1: pistes 7 et 8), $0,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (SB1: pistes T₁, 3 et 4, et JW1: pistes 9 et 10) et $0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (SB1: pistes T₁, 5 et 6, et JW1: pistes 11 et 12). PCR à partir de 25 ng d'ADN matrice des lignées L₁ (pistes 2, 4 et 6) et L₂ (pistes 1, 3 et 5), et des lignées L₃ (pistes 8, 10 et 12) et L₄ (pistes 7, 9 et 11). Témoins sans ADN matrice (pistes T₁ et T₂). Marqueur de masses moléculaires (pistes M; 1 kb DNA ladder; Gibco BRL).

Une modification de la température de l'étape d'hybridation de l'amorce peut changer le profil RAPD obtenu avec un couple ADN matrice-amorce. En effet, en passant de 36°C , température utilisée par Williams *et al* (1990), à 30°C , nous avons observé une variation de l'intensité de certaines bandes et l'apparition de nouveaux fragments d'ADN amplifiés (fig 3). Nous avons alors opté pour cette seconde température.

Nous avons également testé différentes *Taq* polymérases disponibles sur le marché. Nous avons retenu celle de la société Promega qui présente, selon nous, un excellent rapport qualité/prix. D'autres polymérases donnent de très bons résultats mais leur prix reste élevé. Avec certaines amorces, l'une des enzymes testées n'a pas permis l'amplification des fragments d'ADN obtenus avec les autres polymérases, à partir d'un même ADN matrice (résultats non présentés).

Application agronomique de la technique RAPD chez le chou-fleur : détermination du taux d'inbreds dans un lot de semences supposées hybrides F₁

Lors de la détermination d'un taux d'*inbreds*, nous avons recherché, dans un premier temps, une amorce générant un marqueur RAPD de la lignée parentale mâle, puis nous avons analysé le génome des jeunes plants supposés hybrides.

Pour l'hybride F₁GMS, nous avons testé 14 amorces sur les ADN des lignées parentales L₃ et L₄. Quatre d'entre elles (JW2, JW3, C02 et C06) ont permis de caractériser la lignée parentale mâle L₄, chacune avec un marqueur RAPD. Seules C02 et C06 en ont généré un de forte intensité, donc facilement reproductible. Ces 2 marqueurs nous ont permis de déterminer un taux d'*inbreds* de 54% sur un lot de 100 plants

Fig 3. Influence sur un profil RAPD de la température de l'étape d'hybridation de l'amorce. Amplifications réalisées avec une concentration de $1,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ en amorce JW3 et à partir de 75 ng d'ADN matrice des lignées L_1 (pistes 2 et 4) et L_2 (pistes 1 et 3). Les flèches indiquent la position du marqueur RAPD qui a disparu lorsque la température de l'étape d'hybridation de l'amorce est passée de 30 °C (fig 3a) à 36 °C (fig 3b). Marqueur de masses moléculaires (pistes M; 1kb DNA ladder; Gibco BRL).

supposés hybrides. Nous avons bien vérifié que l'ADN de chacune de ces jeunes plantes présentait le même génotype avec ces 2 marqueurs (fig 4). Ce taux est conforme aux 49% trouvés préalablement par test phénotypique. La différence entre ces 2 taux n'est pas significative car elle est inférieure aux limites de confiance dues aux variations d'échantillonnage prévues par la loi binomiale. La fiabilité de la technique a alors été vérifiée en recherchant le phénotype de 47 plants reconnus de l'un ou l'autre type par l'analyse moléculaire, après les avoir plantées en champ. Quelques mois plus tard, les 23 et 24 plantes présentant respectivement les phénotypes hybride et *inbred* confirmaient leur résultat moléculaire.

Fig 4. Distinction entre individus hybrides et *inbreds* d'un lot de semences supposées hybrides F_1 à l'aide de 2 marqueurs RAPD de la lignée parentale mâle. Amplifications réalisées avec des concentrations en amorce de $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour C02 (fig 4a) et de $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour C06 (fig 4b), et à partir de 25 ng d'ADN matrice pour les lignées L_3 (pistes ♀) et L_4 (pistes ♂) ou à partir de $1 \mu\text{l}$ d'ADN extrait par la méthode d'Edwards *et al* (1991) pour les individus supposés hybrides (pistes 1 à 13). Marqueur de masses moléculaires (pistes M; 1 kb DNA ladder; Gibco BRL). Les positions des marqueurs RAPD de la lignée parentale mâle sont indiquées par les flèches. Les individus 1, 2, 3, 8, 11, 12 et 13 sont des hybrides contrairement aux numéros 4, 5, 6, 7, 9 et 10 (figs 4a, b).

En vue de généraliser la pratique de la technique RAPD pour déterminer le taux d'*inbreds* d'un lot de semences hybrides, un second croisement a été étudié (F_{1OBS}). De nouveau, 14 amorces ont été employées afin de trouver des marqueurs des 2 lignées mâles L_5 et L_6 . L'amorce D_{12} a fourni un marqueur spécifique de ces 2 lignées, tandis que D_{20} a généré un marqueur caractérisant seulement la lignée mâle L_5 . Nous avons vérifié la fiabilité de nos 2 marqueurs à l'aide de 10 plantes phénotypiquement déterminées : 5 hybrides et 5 *inbreds* (fig 5). Avec l'amorce D_{12} , tous les hybrides et tous les *inbreds* ont été correctement caractérisés (fig 5a). Nous avons alors déterminé un taux d'*inbreds* de 14% pour ce croisement, dans un lot de 100 jeunes plants supposés hybrides. Avec D_{20} , le marqueur du parent mâle L_5 n'a pas été détecté avec l'ADN des *inbreds* mais est présent pour 2 hybrides sur 5 (fig 5b).

DISCUSSION

Notions de profil RAPD et de marqueur RAPD

Nous définissons un profil RAPD comme l'ensemble des fragments d'ADN amplifiés à partir d'un ADN matrice, par PCR avec une amorce (éventuellement plusieurs) de séquence aléatoire, et visualisés après une électrophorèse en gel d'agarose. Certains de ces fragments peuvent distinguer les ADN de différentes plantes et ainsi révéler le polymorphisme de l'ADN au sein de l'espèce étudiée. Nous qualifions ces bandes de marqueurs RAPD.

Au cours de ces travaux, nous avons observé que les bandes peu intenses d'un profil RAPD, correspondant donc aux fragments les moins

Fig 5. a: Vérification de la valeur d'un marqueur RAPD sur des plantes adultes reconnues phénotypiquement hybrides et inbreds en plein champ. **b:** distinction entre les 2 lignées paternelles avec un marqueur RAPD permettant de distinguer 2 catégories d'hybrides. Amplifications réalisées avec une concentration en amorce de $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (D_{12} , fig 5a, et D_{20} , fig 5b) et à partir de 25 ng d'ADN matrice pour les lignées L_2^* (piste ♀), L_5 (piste ♂ 2) et L_6 (piste ♂ 1), ou à partir de 1 μl d'ADN extrait par la méthode d'Edwards *et al* (1991) pour les individus reconnus phénotypiquement hybrides et *inbreds* (pistes 1–10). Les positions des marqueurs RAPD des lignées parentales mâles sont indiquées par des flèches. Marqueur de masses moléculaires (pistes M; 1 kb DNA ladder; Gibco BRL). Les individus 1–5 sont hybrides et ceux de 6–10 sont inbreds aussi bien par le test en plein champ que par l'analyse RAPD (fig 5a). Les individus 2 et 4 sont les « fils » du ♂ 2 contrairement aux numéros 1, 3 et 5 qui sont « fils » du ♂ 1 (fig 5b).

amplifiés, sont parfois difficilement reproductibles. Nous préférons donc utiliser des marqueurs RAPD de forte intensité. D'autre part, nous pensons qu'il est préférable de ne s'intéresser qu'à des marqueurs situés au milieu des profils RAPD, car nous avons parfois observé des fluctuations concernant les bandes des extrémités de ces profils. Ainsi, en l'absence du marqueur dans un profil, la présence des fragments amplifiés l'encadrant ne laisse subsister aucun doute quant au génotype de la plante étudiée (fig 4 et 5a).

Hérédité des profils RAPD

Nous avons constaté que, d'une façon générale, toutes les bandes des profils RAPD des 2 lignées parentales homozygotes se retrouvent dans celui de l'hybride F_1 (fig 4 et 5). Cette transmission héréditaire des bandes est une condition indispensable à l'utilisation des marqueurs RAPD en sélection.

Nous avons parfois observé que des jeunes plants présentaient un profil RAPD se distinguant de celui des autres plants supposés hybrides et comportant une ou plusieurs bandes absentes des profils parentaux. Ces individus étaient très probablement issus de graines, soit étrangères au lot étudié, soit résultant d'une fécondation par du pollen contaminant. Ces 2 événements ont une probabilité non nulle, car les graines de chou-fleur sont très petites, donc s'éparpillent facilement, et la pollinisation est réalisée par les abeilles dont les mouvements sont difficilement maîtrisables.

Influence de la concentration en oligonucléotide sur un profil RAPD

Nos travaux ont montré que plus la concentration en oligonucléotide est forte, plus de courts fragments d'ADN sont amplifiés au détriment des grands qui disparaissent (fig 2). Ce résultat peut s'interpréter en supposant que les hybridations de l'amorce sur l'ADN matrice sont plus nombreuses lorsqu'elle est en forte concentration, générant ainsi des fragments amplifiés plus petits. Ces sites d'hybridation supplémentaires sont très vraisemblablement moins homologues de l'oligonucléotide que ceux obtenus lorsque sa concentration est faible. Si l'explication la plus simple de la disparition d'un grand fragment est

l'hybridation d'une amorce sur un nouveau site se situant au cœur de ce fragment, il est alors surprenant que tous les grands fragments disparaissent. Il serait donc intéressant d'isoler et de marquer radio-activement ou chimiquement quelques-uns de ces grands fragments. Ainsi, en les utilisant comme sonde, nous pourrions savoir si leur disparition, lorsque la concentration en amorce est forte, résulte de leur non amplification ou de leur amplification en de plus petits fragments.

En faisant varier la concentration en amorce, de grandes différences de tailles entre fragments amplifiés ont pu être obtenues pour un même couple ADN matrice-oligonucléotide : notre plus petit fragment a été de 210 pb (fig 5a) et notre plus grand a été de 3 400 pb (fig 1a). Toutefois, des tailles très différentes de fragments amplifiés ont été également observées dans un même profil RAPD (fig 1a : de 525 pb, bande peu visible, à 3 400 pb, avec l'ADN de la lignée L1). La recherche d'un polymorphisme entre des ADN différents peut donc être réalisée à la fois sur des grands et sur des petits fragments amplifiés, à l'aide de différentes concentrations en oligonucléotide.

Cette influence de la concentration en amorce pourrait expliquer que les techniques d'AP-PCR (*Arbitrarily primed PCR*) et de DAF (*DNA amplification fingerprinting*) utilisent de fortes concentrations d'amorce ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour l'AP-PCR, Welsh and McClelland, 1990, 1991; Welsh *et al*, 1991a, b; ou environ $3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pour la DAF, Caetano-Anollés *et al*, 1991). En effet, ces 2 méthodes révèlent souvent des amplifications de très courts fragments. Toutefois, ceci est également lié à la sensibilité des méthodes de révélation (gel d'acrylamide et coloration au nitrate d'argent pour la DAF et autoradiographie après incorporation d'un nucléotide radio-actif pour l'AP-PCR) bien meilleure qu'en RAPD (gel d'agarose coloré au BrEt).

Importance de la température de l'étape d'hybridation de l'amorce

En abaissant la température de l'étape d'hybridation de l'amorce au cours des cycles de PCR, nous avons constaté que de nouvelles bandes pouvaient apparaître au sein d'un profil RAPD (fig 3). Ce phénomène s'expliquerait par l'hybridation de l'oligonucléotide en de nouveaux sites moins homologues, car la non spécificité est fa-

vorisée dans ces nouvelles conditions. Selon nous, le même type d'observation doit pouvoir être réalisé entre des profils RAPD obtenus avec des appareils de PCR différents, toute chose égale par ailleurs. En effet, le résultat d'une amplification ne dépend pas que des paliers de température constituant chaque cycle, mais aussi de la durée des transitions entre ces paliers. Or, d'un appareil à un autre, selon les performances des groupes chauffant et réfrigérant, ce sont les durées de ces transitions qui varient le plus, et non la température des paliers. Ainsi, certains ont augmenté le temps pour atteindre 72 °C, en vue d'optimiser leurs amplifications (Klein-Lankhorst *et al*, 1991).

Quantité d'ADN matrice

Comme nous avons fait varier la concentration en ADN matrice d'un facteur 6 (12,5–75 ng) sans observer de modifications des profils RAPD, il semble que ce facteur n'influence pas sérieusement ces derniers. Ainsi, le protocole d'amplification de Quiros *et al* (1991) emploie des quantités d'ADN qui varient de 25 à 60 ng. Toutefois, en augmentant cette échelle de variation, des fluctuations des profils seraient vraisemblablement observables avec des ADN de choux-fleur, comme l'ont montré Carlson *et al* (1991) avec des ADN de conifères, ainsi que Welsh et McClelland (1990) avec de l'ADN de *Staphylococcus aureus*. Cette faible sensibilité des profils RAPD à de petites variations de la quantité d'ADN matrice est un avantage. En effet, cela nous a permis de travailler avec des ADN extraits selon la méthode d'Edwards *et al* (1991) sans même connaître leur concentration. Ceci représente un sérieux gain de temps lors de l'analyse en série de plantes.

Importance de la purification de l'ADN matrice

Nos travaux ont permis de constater qu'une purification de l'ADN, même succincte, suffit pour l'amplification de fragments d'ADN. Afin de mettre au point la technique RAPD chez le chou-fleur, nous avons d'abord utilisé des ADN purifiés par ultracentrifugation en gradient de CsCl. Puis nous avons vérifié que le profil RAPD était conservé avec ces mêmes ADN, mais extraits sans gradient de CsCl ni phénol (Edwards *et al*,

1991). Nous envisageons à l'avenir d'appliquer la technique de Berthomieu et Meyer (1991) qui réalisent une amplification par PCR directement à partir d'un fragment de feuille. Ce dernier point s'inscrit dans une approche visant à réduire la durée de la manipulation pour en augmenter l'efficacité et en diminuer le coût.

Problème des contaminations par de l'ADN étranger et précautions expérimentales

Lors de chaque manipulation, un échantillon rassemblant tous les constituants de la RAPD, en dehors de l'ADN matrice, a servi de témoin vis-à-vis d'éventuelles contaminations. Les résultats obtenus avec ces témoins sont de 2 types : soit aucune bande n'est apparue sur le gel (fig 1a et 2a), soit quelques bandes ont été visibles (fig 1b; Williams *et al*, 1990; Klein-Lankhorst *et al*, 1991). Même dans ce second cas, il a été conclu que les autres échantillons contenant de l'ADN de chou-fleur n'avaient pas subi de contamination, car leur profil RAPD n'a jamais présenté les bandes du témoin. S'agit-il de contaminations internes des oligonucléotides qui ne pourraient plus se manifester en présence de l'ADN de chou-fleur, celui-ci étant en excès dans l'échantillon de PCR ?

Tout problème lié à des contaminations a donc été évité malgré nos faibles précautions : manipulation sans gants et préparation des échantillons hors de toute hotte. Toutefois, nous avons utilisé du matériel de laboratoire autoclavé et 2 jeux de micropipettes : un pour les extractions d'ADN et la préparation des échantillons RAPD, et l'autre pour leur dépôt sur gel après l'amplification par PCR.

Efficacité de la RAPD chez le chou-fleur

Nos travaux et ceux réalisés dans le même temps par Hu et Quiros (1991) ont montré que le polymorphisme de l'ADN du chou-fleur est facilement accessible par la technique RAPD. En effet, sur les 2 groupes de 14 amorces testées, 7 ont permis de distinguer les lignées parentales de l'hybride F₁GMS, et 5 dans le cas de celles de l'hybride F₁OBS. Ceci correspond, respectivement, à des taux de 50% et de 36% de réussite pour la découverte de marqueurs RAPD caractérisant les lignées parentales de ces 2 croisements. Avec les lignées L₁ et L₂, sur les 8

amorces testées, 6 ont fourni au moins un marqueur RAPD de l'une des lignées, soit un taux de réussite de 75%. Ce résultat est nettement supérieur aux 2 précédents, car ces 2 lignées sont très distantes génétiquement.

L'efficacité de la RAPD pour détecter un polymorphisme de l'ADN est démontrée par l'hybride F₁OBS, dont les 2 lignées parentales mâles, bien que sœurs et issues de 6 autofécondations successives, ont été distinguées par un marqueur.

Étant donné les contingences imposées à une amorce RAPD (une dizaine de nucléotides, environ 50% de bases G-C et pas de séquence palindromique), le nombre d'oligonucléotides utilisables est quasiment infini. De plus, l'utilisation des amorces en couple (Welsh and McClelland, 1991; Klein-Lankhorst *et al*, 1991) et en gamme de concentrations multiplie les possibilités. La RAPD semble donc très prometteuse en amélioration du chou-fleur.

RAPD et analyse iso-enzymatique pour la détermination du taux d'inbreds d'un lot de semences hybrides

Pour l'espèce *Brassica oleracea*, 9 systèmes iso-enzymatiques sont utilisés (Arus *et al*, 1982; Arus and Orton, 1983; Boucault, 1990) et ont été proposés afin d'évaluer la pureté hybride d'un lot de semences (Tanksley and Orton, 1983). Chacun de ces systèmes présente 1–3 loci polymorphes avec 2–4 allèles par locus (Boucault, 1990). Ce nombre d'allèles disponibles n'est vraisemblablement pas suffisant pour caractériser chaque lignée de chou-fleur, existante ou en cours d'obtention. Ainsi, dans le cas de certains hybrides, on peut envisager que les isozymes soient inefficaces pour caractériser leur lignée parentale mâle, ne permettant alors pas la détermination du taux d'inbreds. Ce cas ne doit pas pouvoir se présenter avec la technique RAPD pour laquelle le nombre d'amorces utilisables est quasiment infini et permet, en théorie, de couvrir tout le génome de l'espèce étudiée.

Grâce à la rapidité du protocole d'extraction d'ADN décrit par Edwards *et al* (1991), la technique RAPD rivalise avec l'analyse iso-enzymatique dont le protocole d'extraction est très simple. De plus, le contenu en protéines d'une cellule dépend généralement du tissu et de l'organe auxquels elle appartient. Ainsi, d'une plante à une autre, les protéines doivent être extraites d'un même organe au même stade

physiologique et dont le contenu protéique est peu sensible aux variations du milieu. Ce problème ne se pose pas avec la RAPD car toutes les cellules d'une plante, quel que soit son stade de développement, possèdent théoriquement le même génome.

Pour révéler une activité enzymatique, il est nécessaire que la protéine dont elle résulte soit active. L'électrophorèse iso-enzymatique doit donc respecter cette activité par une migration dite «en conditions natives» (respect des différents niveaux de structure des enzymes). Ainsi, tous les systèmes iso-enzymatiques ne requièrent pas le même pH d'électrophorèse. Les gels d'électrophorèse employés pour distinguer les différents allèles des loci iso-enzymatiques étudiés sont soit en amidon soit en acrylamide selon le pouvoir résolutif nécessaire. Chaque système iso-enzymatique possède son propre système de révélation. Malgré ces 3 dernières contingences, il est toutefois possible de révéler différentes activités enzymatiques à partir d'un même gel de protéines, si ces enzymes supportent le même pH d'électrophorèse et si leurs différentes formes se distinguent dans un gel d'amidon. Il faut alors couper délicatement ce gel dans son épaisseur en plusieurs tranches dont le nombre correspond à celui des systèmes iso-enzymatiques testés et chaque tranche doit subir son propre protocole de révélation. La RAPD semble donc plus facile d'emploi pour la recherche en routine d'un polymorphisme entre 2 lignées car, quel que soit l'oligonucléotide employé, l'électrophorèse est réalisée en gel d'agarose et la révélation consiste en une simple coloration au BrEt des fragments d'ADN amplifiés. Ceci permet d'analyser avec un même gel des amplifications obtenues avec des amorces différentes.

La présence d'un appareil de PCR semble de plus en plus indispensable au sein d'un laboratoire de sélection. En effet, les applications de cette technique ne cessent d'augmenter dans le domaine de l'amélioration des plantes, la sélection assistée par marqueurs moléculaires devenant une pratique courante. De plus, des kits d'amorces pour la détection et la reconnaissance d'agents phytopathogènes apparaîtront prochainement sur le marché (Schesser *et al*, 1991).

Quelques éléments de comparaison entre les techniques RAPD et RFLP

Au niveau moléculaire, la méthode RAPD se distingue de la RFLP par une technologie plus

simple et plus rapide, car elle ne fait pas intervenir de digestion enzymatique, de transfert sur membrane, d'hybridation avec une sonde marquée et de révélation. D'autre part, cette nouvelle technique nécessite très peu d'ADN matrice : 0,025 µg/échantillon, contre 10 µg/échantillon en RFLP. De plus, la très faible purification de l'ADN constitue un autre avantage de la RAPD sur la RFLP, pour laquelle la digestibilité de l'ADN par des enzymes de restriction est une condition indispensable. Il faut également souligner que les taux de réussite que nous avons obtenus pour distinguer les lignées parentales de nos différents croisements (voir plus haut) sont rarement atteints avec des sondes RFLP. En effet, afin de caractériser rapidement la lignée parentale mâle d'un hybride F_1 , il est préférable d'obtenir des empreintes génétiques comportant plusieurs bandes au sein d'un même profil. C'est le cas général avec les amorces RAPD alors que seules quelques types de sondes RFLP génèrent de telles empreintes (sondes du phage M13, Rogstad *et al*, 1988, sondes minisatellites, Dallas, 1988, sondes synthétiques de répétitions en tandem, Mariat and Vergnaud, 1992, sondes d'ADN ribosomiques, etc).

Les objectifs de la technique RAPD sont les mêmes que ceux de la RFLP. Il s'agit d'associer, chez les plantes cultivées, des marqueurs moléculaires à des caractères agronomiques favorables, ainsi facilement repérables dans la descendance des croisements intéressants. Cette démarche accélère considérablement le travail du sélectionneur. La généralisation de ces marqueurs chez une plante débouche sur la cartographie de son génome. Ces 2 techniques permettent alors l'obtention de véritables cartes d'identité génétique des plantes cultivées.

Les marqueurs RAPD présentent l'inconvénient majeur d'être dominants, contrairement à ceux issus de la RFLP. En effet, dans le second cas, une bande caractérisant une lignée sur l'autoradiogramme correspond à une autre bande spécifique d'une deuxième lignée révélant ainsi 2 allèles d'un même locus. Ceci résulte du fait qu'il est très peu probable, au sein d'une espèce, qu'une séquence complémentaire de la sonde ait totalement disparu d'un chromosome au cours de l'évolution. La dominance des marqueurs RAPD est liée à la technique elle-même. En effet, le polymorphisme est généralement dû à une recombinaison ayant affecté l'ADN d'une lignée, empêchant ainsi l'amplification d'un fragment d'ADN qui est réalisée avec l'ADN d'une autre lignée. C'est le cas si l'un des sites de fixa-

tion de l'oligonucléotide disparaît par mutation (mutation ponctuelle, crossing-over, insertion, délétion, etc); si une insertion, n'affectant pas les 2 sites d'hybridation, éloigne ces derniers d'une distance ne permettant plus l'amplification d'un fragment; si une délétion rapproche les 2 sites de fixation de l'amorce, à l'origine d'un très petit fragment amplifié n'apparaissant pas sur le gel d'agarose. Il est alors impossible de distinguer les individus hétérozygotes de ceux homozygotes pour le locus du marqueur RAPD. Toutefois, la codominance de marqueurs RAPD a été parfois observée (Williams *et al*, 1990). C'est le cas si un fragment amplifié chez une lignée correspond à un locus qui a subi, chez une lignée voisine, une courte insertion ou délétion (n'affectant pas les sites de l'amorce). Ceci est à l'origine d'un fragment amplifié de taille différente du premier et qui est visible sur le gel d'agarose.

Afin de contourner le problème de la dominance des marqueurs RAPD, il est préférable, pour les cartographier, d'utiliser les plantes issues du rétrocroisement de la F_1 avec l'une de ses lignées parentales ou issues de culture *in vitro* de cellules de la F_1 ayant subi la méiose. Toutefois, il est tout de même possible de travailler avec une F_2 mais cela requiert alors, pour une même précision, l'analyse d'un plus grand nombre d'individus.

Problème de la dominance des marqueurs RAPD pour la vérification de la pureté hybride F_1 d'un lot de semences

La dominance des marqueurs RAPD peut présenter un risque d'erreur lors du contrôle de la pureté d'un lot de semences supposées hybrides F_1 . En effet, il reste généralement une petite proportion d'hétérozygotie au sein du génome des lignées parentales des hybrides. Ainsi, il est théoriquement possible de caractériser la lignée parentale mâle par un marqueur RAPD amplifié au niveau d'un locus hétérozygote. Dans un tel cas et en l'absence d'une quelconque autofécondation résiduelle de la lignée parentale femelle (taux d'*inbreeds* nul), seulement la moitié des hybrides F_1 présenteront ce marqueur ! Nous avons pu exclure cette interprétation pour notre hybride F_{1GMS} , bien que le taux d'*inbreeds* déterminé par RAPD fût proche de 50%, car ce taux a été confirmé par un test phénotypique portant à la fois sur un autre lot de plantes de ce même hybride et sur les plantes

soumises préalablement au test moléculaire. Afin d'éviter ce risque d'erreur, nous préconisons la pollinisation manuelle de quelques fleurs de la lignée femelle par du pollen de la lignée mâle pour une obtention non ambiguë de quelques semences hybrides F_1 . Il s'agit alors d'observer à l'aide de ces quelques plantes la ségrégation du marqueur RAPD de la lignée parentale mâle. Elle doit être de type 1:0 s'il y a homozygotie au niveau du locus d'amplification dans le génome de la lignée mâle ou de type 1:1 s'il y a hétérozygotie (dans ce dernier cas, 11 hybrides suffisent pour avoir 99% de chance d'observer au moins une plante homozygote ne présentant pas le marqueur).

Les résultats obtenus avec l'amorce D20 sur les hybrides F_{1OBS} (fig 5b) peuvent s'interpréter de 2 façons. Si la lignée L_5 est homozygote en ce qui concerne le locus de son marqueur RAPD, les 2 hybrides présentant ce marqueur sont les descendants de L_5 et les 3 autres sont ceux de L_6 . Si L_5 est hétérozygote pour ce locus, les 2 hybrides marqués sont issus de L_5 et les autres peuvent aussi bien être les descendants de L_5 que de L_6 . Nous n'avons pas pu trancher entre ces deux interprétations car nous n'avons pas à notre disposition de descendants fiables de L_5 .

CONCLUSION

Les travaux présentés ici ont montré l'intérêt de la technique RAPD pour le contrôle de la production de variétés hybrides F_1 de chou-fleur. En effet, après avoir adapté le protocole de Williams *et al* (1990) à ce matériel végétal, nous avons pu utiliser cette technique pour analyser la pureté hybride de 2 lots de semences. Pour le sélectionneur, l'avantage de cette analyse moléculaire est non seulement un gain de temps par rapport au test phénotypique classique par préculture d'un échantillon, mais également l'obtention de résultats sans ambiguïté. Il serait possible de réduire encore un peu la durée des analyses en extrayant l'ADN à partir de graines et non plus de jeunes plants (E Margalé, comm pers).

Au-delà de cette simple application, la RAPD semble pouvoir devenir un outil très efficace pour l'obtention d'empreintes génétiques des variétés de chou-fleur. En effet, un ensemble de profils RAPD très distincts entre 2 lignées laisse supposer un éloignement génétique important entre ces dernières. Il est alors envisageable de

croiser des lignées présentant des empreintes très différentes afin de vérifier si l'on peut bénéficier d'un fort effet d'hétérosis.

Cette nouvelle technique permet, comme la RFLP, de cartographier le génome de l'espèce étudiée et d'en étiqueter des gènes gouvernant des caractères agronomiques intéressants. Ce type de démarche devrait permettre une sélection assistée par des marqueurs moléculaires. Le travail du sélectionneur serait alors facilité et accéléré grâce à un diagnostic possible à un stade très précoce de développement de la plante, avant même l'expression du caractère étudié.

La méthode RAPD est donc destinée à devenir un outil de sélection végétale fiable et efficace. Mais elle peut également s'avérer très utile dans une démarche beaucoup plus fondamentale visant une approche phylogénique, grâce aux empreintes génétiques qu'elle fournit.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Mlle L Boucault, M E Margalé et les Drs R Dumas de Vaulx et Y Hervé pour leur lecture critique de ce manuscrit. Ces travaux ont été financés avec l'aide du Conseil régional de Bretagne (programme *Britta*) et du Conseil général du Finistère. Ils ont bénéficié en outre d'un financement du ministère de la Recherche et de la Technologie dans le cadre du programme Eureka «RFLP *Brassica* EU324/F250».

RÉFÉRENCES

- Arus P, Orton TJ (1983) Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in *Brassica oleracea*. *J Hered* 74, 405-412
- Arus P, Tanksley SD, Orton TJ, Jones RA (1982) Electrophoretic variation as tool for determining seed purity and breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 31, 417-428
- Berthomieu P, Meyer C (1991) Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol Biol* 17, 555-557
- Boucault L (1990) Étude des caractères de plantes issues d'androgénèse chez le chou-fleur d'automne (*Brassica oleracea* var *botrytis*). DEA de sci technol prod vég et agro-alim, Univ de Rennes I
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9, 553-557
- Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991) Segregation of ran-

- dom amplified DNA markers in F_1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83, 194-200
- Dallas JF (1988) Detection of DNA "fingerprints" of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6831-6835
- Dellaporta SL, Woods J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19, 1349
- Erich HA, Saiki RK, Gelfand DH, Oste C, Higuchi R (1989) Part one : basic methodology. In: *PCR technology, principle and applications for DNA amplification* (Erich HA, ed) M Stockton Press, 1-38
- Hu J, Quiros CF (1991) Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10, 505-511
- Klein-Lankhorst RM, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991) Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet* 83, 108-114
- Mariat D, Vergnaud G (1992) Detection of polymorphic loci in complex genomes with synthetic tandem repeats. *Genomics* 12, 454-458
- Nasrallah JB, Nishio T, Nasrallah ME (1991) The self-incompatibility genes of *Brassica*: expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 393-422
- Quiros CF, Hu J, This P, Chevre AM, Delseny M (1991) Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theor Appl Genet* 82, 627-632
- Rogstad SH, Patton II JC, Schaal BA (1988) M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9176-9178
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edn
- Schesser K, Luder A, Henson JM (1991) Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, in infected wheat plants. *Appl Environ Microbiol* 57, 553-556
- Tanksley SD, Orton TJ (1983) *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, Amsterdam
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science. *Biotechnology* 7, 257-264
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18, 7213-7218
- Welsh J, McClelland M (1991) Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Res* 19, 5275-5279
- Welsh J, Petersen C, McClelland M (1991a) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse : application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res* 19, 303-306
- Welsh J, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS (1991b) Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet* 82, 473-476
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531-6535