

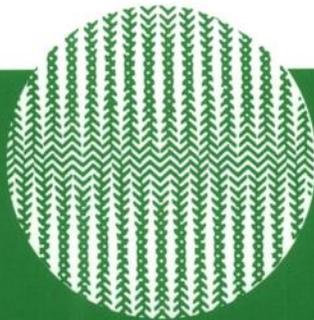
72

Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires

Montpellier (France)
29-31 mars 1994

A. BERVILLE, M. TERSAC
Editeurs

LES COLLOQUES



INRA
EDITIONS

Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires

Montpellier (France), 29-31 mars 1994

Ce colloque a été organisé par l'INRA, l'Université de Perpignan, le CNRS, le CIRAD, l'ORSTOM, l'ENSAM, AGROPOLIS et l'Université de Montpellier II

avec la participation financière

du Conseil Régional Languedoc-Roussillon,
du District de Montpellier
et des sociétés

RHONE POULENC AGROCHIMIE,
AMERSHAM LIFE SCIENCE,
AMILABO,
APPLIED BIOSYSTEMS
BALCO,
BECKMAN,
GENSET
LABIMAP,
MOLECULAR DYNAMICS,
PERKIN ELMER,
PHARMACIA BIOTECH,
PROLABO,
SCHLEICHER ET SCHUELL,
SIGMA ALDRICH

Editeurs / Editors

A. BERVILLE - M. TERSAC
INRA - Station d'Amélioration des Plantes
2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

En vente / For sale

INRA Editions
Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

© INRA, Paris, 1995
ISBN : 2-7380-0614-0

© Le code de la propriété intellectuelle du 1er juillet 1992 interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique. Toute reproduction, partielle ou totale, du présent ouvrage est interdite sans autorisation de l'éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 3, rue Hautefeuille, Paris 6ème.

CONTENTS

SOMMAIRE

Foreward - Préambule.....	7
Preface - Préface	9

SECTION I

Méthodes et nouveaux outils

A high throughput DNA extraction method to quickly prepare plant extracts for PCR analyses. Catherine GUERNALLEC and François GUIDET.....	13
La DGGE, principe et utilisation. Exemple de l'analyse de la D-Loop de l'ADN mitochondrial. Eric DESMARAIS et Gérard ROIZES	17
Use of non-radioactive digoxigenin-labelled DNA probes for RFLP analysis in coffee. P. LASHERMES, M.C. COMBES and J. CROS.....	21
Empreintes génétiques dans les séquences centromériques d'ADN satellite révélées par électrophorèse en champ pulsé. Bertrand MARÇAIS et Gérard ROIZES	27
Expressed sequence tags (EST) in <i>Arabidopsis thaliana</i>. M. DELSENY, M. RAYNAL, M. LAUDIE , R. COOKE, and F. GRELLET.....	35
Marker-assisted backcrossing: a practical example. M. RAGOT, M. BIASIOLLI, M.F. DELBUT, A. DELL'ORCO, L. MALGARINI, P. THEVENIN, J. VERNOY, J. VIVANT, R. ZIMMERMANN, and G. GAY.....	45

SECTION II

Cartographie

Isolation, cloning and localisation of pig polymorphic marker in a genomic region conserved among species. Y. LAHBIB-MANSAIS, C. MELLINK, M. YERLE and J. GELLIN.	59
--	----

RFLP mapping of cauliflower (<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i>) using cold labelled probes.	
Daniel LE CORRE, Gisèle BARBEYRON and François GUIDET	63
Cartographie du génome des agrumes à l'aide des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation.	
F. LURO, M. LORIEUX, F. LAIGRET, J.M. BOVE et P. OLLITRAULT.....	69
Cartographie des introgressions réciproques entre les sous-espèces <i>indica</i> et <i>japonica</i> de riz cultivé (<i>Oryza sativa</i> L.).	
Gérard SECOND et Alain GHESQUIERE.....	83
Cartographie comparée du génome chez les Graminées; La canne à sucre au sein de la tribu des Andropogonées.	
L. GRIVET, A. D'HONT, P. DUFOUR, P. HAMON et J.C. GLASZMANN.....	95
Genetic mapping of resistance to <i>Pseudomonas solanacearum</i> in tomato.	
P.THOQUET, J.OLIVIER, C.SPERISEN, P. ROGOWSKY, J.-L. PARIENTE, and N. GRIMSLEY	101

SECTION III Cytogénétique moléculaire

Molecular cytogenetics and the organization of plant chromosomes.	
J.S. (Pat) HESLOP-HARRISON	107
Utilisation de la cytogénétique pour la cartographie des animaux domestiques.	
M. YERLE, Y. LAHBIB-MANSAIS, P. PINTON, A GOUREAU, J. RIQUET, D. MILAN, J. GELLIN	117

SECTION IV Microsatellites

Genetic fingerprints in sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) using microsatellite sequences.	
Jean-Luc JUNG, François CHARRIÈRE, Hélène LAPARRA and Günther HAHNE.....	127
Search for genetic markers of a fecundity gene (FecB) in sheep.	
I. LANNELUC, P. MULSANT, J-M. ELSÉN et J. GELLIN	135

SECTION V Gènes candidats

Le gène "Hal" porcin.	
Maurice DALENS	143
Positional cloning of genes in <i>Arabidopsis thaliana</i>.	
Vincent ARONDEL.....	151

SECTION VI

Polymorphisme et phylogénie

Ribosomal DNA genes in <i>Fraxinus</i>: organisation and detection of hybridization between <i>F. excelsior</i> L and <i>F. oxyphylla</i> Bieb with rDNA spacer probes.	163
Sylvain JEANDROZ, Alain PUGIN and André BERVILLÉ	
Coévolution et transferts chez les Schistosomes, d'après plusieurs marqueurs moléculaires.	177
Véronique BARRAL et Claude COMBES	
Utilisation des RAPD pour la construction de phénogrammes et de phylogrammes chez <i>Petunia</i>.	187
Didier PELTIER, Hernando CHACON, Michel TERSAC, Gilles CARAUX, Hubert DULIEU et André BERVILLÉ.	
Relations phylogénétiques dans la tribu des Triticées établies à partir de marqueurs protéiques.	203
Saïd EL MADIDI, Michel ZIVY, Hervé THIELLEMENT	
Liste des membres du comité scientifique et du comité de lecture des publications	209
Liste des Participants	211

Foreword Préambule

Ce recueil contient les communications présentées à Montpellier du 29 au 31 mars 1994. Tous les articles ont été soumis à une double correction de façon anonyme. Je tiens donc à remercier d'abord les auteurs puis les arbitres anonymes qui ont bien voulu amender les textes.

Le Comité Scientifique du colloque a effectué un choix de contributions dans des domaines très variés: ce fut riche et générateur de débats. Le Comité Technique a assuré une organisation des plus satisfaisante. Je les en remercie.

Les marqueurs moléculaires ont des utilisations croissantes. Les techniques qui permettent d'en révéler sont de plus en plus nombreuses comme les applications qui répondent aux préoccupations des chercheurs de domaines très variés, que ce soit pour les analyses de diversité, de recherche d'une structure de géotypes ou la construction de cartes génétiques aux applications à peine entrevue, sans oublier les méthodes pour stocker et assurer la disponibilité des informations considérables pour la communauté. Il est clair que les scientifiques sont mal informés pour choisir les marqueurs les mieux adaptés à leur stratégie scientifique. Des problèmes techniques, scientifiques et financiers se posent pour ce choix: les participants à ce colloque ont tenté de s'éclairer et ce volume devrait aider à éclairer les collègues.

André Bervillé

Preface

Préface

Lorsque l'idée d'organiser un colloque international de l'INRA sur les marqueurs moléculaires à MONTPELLIER a commencé à voir le jour, notre réflexe immédiat a été de le faire dans le cadre des activités du secteur Biologie Moléculaire Végétale d'AGROPOLIS. Cet organisme regroupe les Universités du Languedoc-Roussillon, les grandes Ecoles de la région ayant une activité dans le domaine de l'agriculture et de l'agronomie ainsi que les grands Instituts de recherche.

Le secteur de la Biologie Moléculaire Végétale regroupe près de 200 chercheurs, techniciens et étudiants appartenant à une dizaine de laboratoires de l'INRA, de l'ENSAM, de l'Université de MONTPELLIER 2, du CNRS, du CIRAD, de l'ORSTOM et de l'Université de PERPIGNAN. Ce secteur connaît un essor grandissant avec l'arrivée de nouvelles équipes sur le site de MONTPELLIER et avec la création par le CNRS, le CSIC et l'Université de PERPIGNAN d'un Laboratoire Européen Associé PERPIGNAN-BARCELONE en Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale. Le secteur a pour fonction d'animer la vie scientifique et d'aider à la structuration des équipes autour de grands thèmes ou projets scientifiques: les axes principaux sont l'analyse des génomes, l'étude de l'adaptation aux stress abiotiques, la caractérisation des gènes exprimés dans les graines et l'étude de leur régulation et enfin l'utilisation des méthodes de transgénèse en vue de l'analyse physiologique et de la protection des cultures. L'organisation de ce colloque a donc été l'occasion pour nous de travailler ensemble, d'attirer un large auditoire et des conférenciers qui ont pu couvrir un large spectre de méthodologies de marquage et présenter des résultats relatifs à l'utilisation des marqueurs; enfin il fut aussi pour les équipes du secteur l'occasion de présenter leur travail de façon groupée à la communauté nationale et internationale.

MONTPELLIER est aussi une ville où existent plusieurs laboratoires de biologie et de génétique moléculaire animale de renom et, dès le départ, nous avons pensé que ce colloque devait également être largement ouvert à des conférenciers et des auditeurs venant de ce domaine. Sur ce plan également le colloque fut une réussite. C'est là une interaction malheureusement trop rare de nos jours pour ne pas la souligner. Au total plus de 200 personnes ont participé à cette réunion au cours de laquelle les discussions à la suite des exposés et devant les nombreux posters ont été animées et conviviales. De nombreux thésards de nos laboratoires ont pu y participer.

Enfin AGROPOLIS, par ses conseils et son soutien, a largement facilité la réalisation matérielle de ce colloque. Nous avons également reçu des aides de pratiquement chacun de nos organismes de tutelles et de plusieurs entreprises privées. Au nom de tous les participants, que tous en soient chaleureusement remerciés.

Michel DELSENY
Responsable du secteur BMV

Section I

Méthodes et nouveaux outils

A high throughput DNA extraction method to quickly prepare plant extracts for PCR analyses

Catherine GUERNALLEC and François GUIDET*

*Prince de Bretagne Biotechnologie, Penn-ar-Prat,
29250 Saint Pol de Léon*

(* corresponding author)

Introduction

While remaining a fundamental research science, plant molecular biology has also become a real applied discipline. In the space of a few years PCR technology has furthered the range of possibilities that scientists can offer to professionals. However, in order to become effective tools allowing high throughput analyses, many methods have to be simplified to lower costs while maintaining the highest efficiency. To that effect various DNA extraction protocols have recently been published (1, 2, 3, 4, 5). At Prince de Bretagne Biotechnologie (Saint Pol de Léon, France) we have developed a novel method (6) based on the use of proteinase K. It is extremely rapid, can generate enough material for more than 6000 PCR reactions per sample, does not require any centrifugation step and is therefore easily amenable to automation.

Plant material

Plant material can be in various forms : fresh, frozen or lyophilised. For practical considerations and in order to speed up the crushing process, lyophilised material is preferred. The protocol described here has been designed to extract DNA from young cauliflower leaves. Although it might be necessary to slightly adapt the protocol, this extraction buffer has already been shown to work very efficiently on different plant species (7).

Method

- 1 - Harvesting of the plant material (1 cm² pieces of young leaves) in the wells of microtitration plates.
- 2 - Lyophilisation (overnight).

- 3 - Crushing using a home-made device comprised of 96 metallic screws assembled on a microtiter plate.
- 4 - Addition of 100 μ l of extraction buffer : Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 0.45 M, Proteinase K 1 mg/ml, lauroyl sarkosyl 1%.
- 5 - Incubation at 50° C for 1 hour.
- 6 - Dilution of the mixture with 150 μ l of water
- 7 - 20 μ l of the extracts are transferred into another microtiter plate and diluted with 80 μ l of water containing 10 μ g of RNase A
- 8 - The samples are boiled for 5 min (*e.g.* in the thermocycler)
- 9 - After a few minutes at room temperature , 10 μ l of the samples are further diluted with 240 μ l of water.
- 10 - 5 μ l of each sample are mixed with 15 μ l of the PCR reaction solution (final concentration : 0.1 mM of each dNTP, 3.7 mM MgCl₂, 0.5 μ M of random primer, 1 unit of *Taq* polymerase (Promega) and 1 X *Taq* pol buffer).

Discussion

The method described above is related to the earlier observation (7) that incubating ground plant tissue in the presence of proteinase K, EDTA and sarkosyl allows for the preparation of megabase plant DNA. For PCR or RAPD analyses (8) one obviously does not need such large DNA fragments, but the use of the same mixture has the unique advantage of enabling crude DNA purification without the need for any centrifugation step. At the end of the incubation phase, the proteinase K is inactivated by a 5 min boiling step to avoid any damage to the *Taq* polymerase. The other components (EDTA and sarkosyl) are highly diluted before the PCR and therefore do not interfere with the enzyme. The addition of RNase A seems to improve the efficiency of the amplification process. The figure 1 shows the comparison of the amplification profiles of DNA prepared according to this protocol and to the one described by Dellaporta et al (9). The figure 2 exemplifies the utility of this method for high throughput DNA extraction as it may be required for the assessment of the number of inbreds in F1 hybrid seed lots (10).

By performing all the different steps in microtitration plates, one can maximise the rapidity of the technique, *e.g.* the pieces of leaves are quickly frozen, lyophilised, crushed and incubated in the same 96 well plate. All the subsequent steps (*e.g.* dilutions, boiling and the PCR) can also be done in such plates if one has a thermocycler accepting these devices, therefore reducing handling to a minimum.

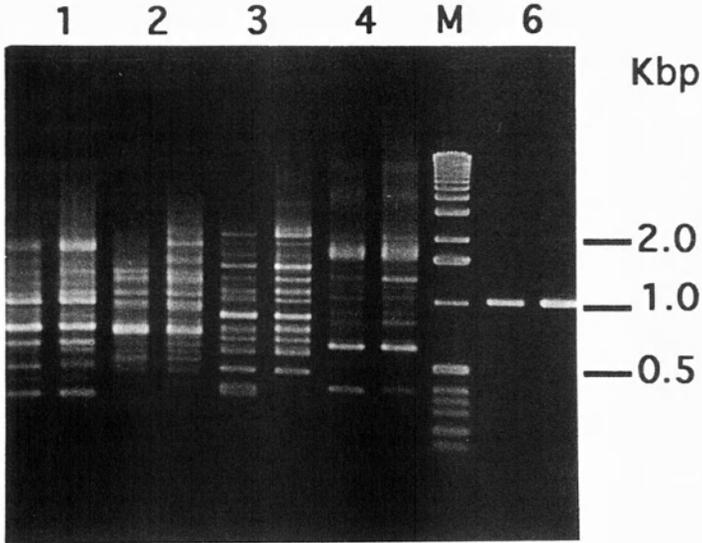


Figure 1 : Comparison of the profiles obtained with DNA extracted with our method and with the one from Dellaporta et al (9) (each pair of lanes has the DNA extracted with our method on the left). Numbers 1 to 4 show RAPD patterns (10 mers from Operon Technology) and n° 6 represents the results of a PCR experiment with rDNA primers (NS7 and ITS4, White et al (11)).

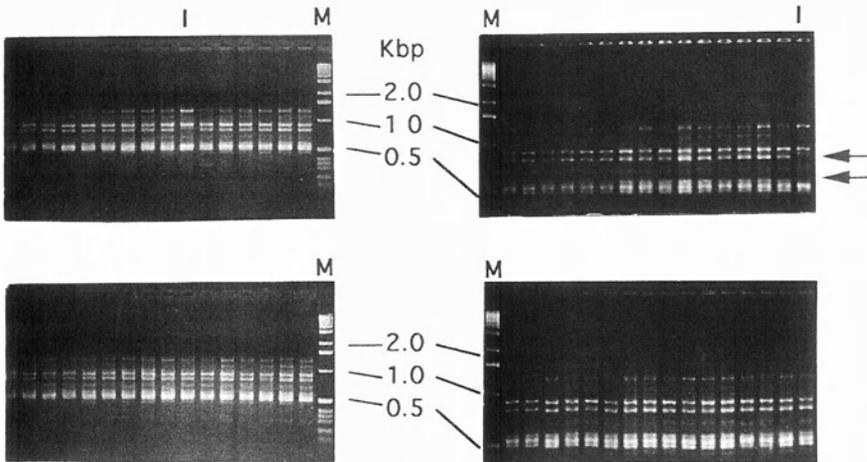


Figure 2 : RAPD analysis of F1 hybrid cauliflower plantlets using a random primer from Operon Technology (USA). The arrows indicate two male markers which can be followed in the F1 progeny: among the 64 individuals shown here 62 are true F1 hybrids and 2 are in-breeds (lanes with a I at the top). Lanes M correspond to the 1 Kbp ladder sold by BRL. The electrophoresis is performed in a 1.5% agarose gel in 0.5 X TBE buffer. The gel is stained iium bromide.

Conclusion

In plant biotechnology or molecular genetics many current applications exist that would benefit from the use of a simple and efficient method which is amenable to automation, and which at the very least would minimise technical work. Due to its ability to reduce costs, error rates and the cumbersome workload attached to all series of PCR analyses, the procedure presented here should appeal to all scientists having to deal with large numbers of plant samples.

Acknowledgement : This work was supported by EUREKA (Project EU 324/F250 : RFLP *Brassica*).

References

1. BERTHOMIEU P., MEYER C., 1991. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol Biol* 17: 555-557.
2. EDWARDS K., JOHNSTONE C., THOMSON C., 1991. : A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349.
3. LANGRIDGE U., SCHWALL M., LANGRIDGE P., 1991. : Squashes of plant tissue as substrate for PCR. *Nucleic Acids Res* 19: 6954.
4. LUO G., HEPBURN A. G., WIDHOLM J. M., 1993. : Preparation of plant DNA for PCR analysis : a fast, general and reliable procedure. *Plant Mol Biol Reprtr* 10(4): 319-323.
5. OARD J. H., DRONAVALLI S., 1992. : Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random primer PCR. *Plant Mol Biol Reprtr* 10: 236-241.
6. GUIDET F., 1994. : A powerful new technique to prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res.* vol 22, n°9: 1772-1773 .
7. GUIDET F., LANGRIDGE P., 1992. : Megabase DNA preparation from plant tissue. *Meth Enzymol* 216: 3-12.
8. WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. K., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. AND TINGEY S. V., 1990. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
9. DELLAPORTA S. L., WOODS J. AND HICKS J. B., 1983. : A plant DNA minipreparation. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21.
10. BOURY S., LUTZ I., GAVALDA M.C., GUIDET F. AND SCHLESSER A., 1992. : Empreintes génétiques du chou-fleur par RAPD et vérification de la pureté hybride F1 d'un lot de semences. *Agronomie* 12, 669-681.
11. WHITE T. J., BRUNS T., LEE T. AND TAYLOR J., 1989. : PCR Protocols : A guide to methods and applications. Academic Press, NY.

La DGGE, principe et utilisation. Exemple de l'analyse de la D-Loop de l'ADN mitochondrial

Eric DESMARAIS^{1*} et Gérard ROIZES²

*1 Laboratoire Génome et Populations, CNRS URA 1493, Université de Montpellier II,
Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France (FAX (33) 67 14 4554).*

*2 Inserm U249 CNRS UPR 9008, Institut de biologie Boulevard Henri IV.
34060 Montpellier Cedex.*

(Corresponding author)*

Summary

The DGGE is a method based on the property of any double-stranded DNA molecule to melt progressively in an increasing concentration of chemical denaturing agent. So, the molecules to be studied are loaded on an electrophoresis gel containing a gradient of denaturation. However when the molecule is partially or totally melted, its migration is stopped. Thus the length of migration of one molecule is dependant on the point where it will be denatured, which is itself dependant on its primary structure; the sequence of nucleotides. With this method and under very strictly controlled conditions, we are able to detect a single nucleotide variation between two sequences. So, a nucleotide variant can be detected easily within a population without the need for sequencing.

We applied this method to the study of the D-Loop of the mitochondrial genome, a highly polymorphic sequence. From a sample of thirty people, we were able to detect all the mutations present on the part of the molecules analysable by DGGE. We thus show the efficiency of this method, even if the too high level of polymorphism in this region lead us to sequence all the individuals. We also demonstrate the prediction power of the computer programs provided for predicting the migration pattern of a molecule of known sequence in a gradient of denaturation.

Introduction

Présentation de la technique:

Cette technique est basée sur l'utilisation d'un gradient de dénaturant chimique: L'ADN migre dans un gel d'acrylamide où il rencontre des conditions de plus en plus

dénaturantes. Cependant, si le gradient est linéaire, l'ADN, lui ne se dénature pas de façon progressive mais de domaine en domaine, chacun représentant un ensemble de bases contiguës qui se dénaturent à la même température. La migration de l'ADN est affectée par la séparation partielle de ces deux brins. La stabilité de chacun des domaines dépend de la structure primaire de la molécule. Deux molécules variant par une mutation unique ne s'ouvriront donc pas au même moment et migreront différemment à travers un gradient précis. Les échantillons à analyser sont d'abord amplifiés par PCR, puis chargés sur un gel en gradient dénaturant en parallèle avec, s'il est disponible, un ADN de séquence connue qui sert de standard. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium et les résultats sont analysés en comparant les distances respectives de migration des échantillons.

Mise en oeuvre de la technique

Analyse des séquences avec les logiciels: Choix des amorces pour la DGGE:

La DGGE ne permet pas d'analyser toutes les molécules: il faut qu'elles contiennent au moins deux domaines de stabilité différente, le plus stable retardant l'ouverture totale de la molécule. Il existe un programme permettant de calculer la courbe de fusion d'une molécule en fonction de sa séquence nucléotidique. Il est ainsi possible de voir *a priori* combien de domaines contient le fragment à analyser et prédire le gradient à appliquer et le comportement de la molécule en DGGE. Dans l'exemple 1, la molécule ne contient qu'un seul domaine de fusion: elle ne sera pas analysable directement par DGGE. Il est possible d'insérer à une extrémité de la molécule une portion d'ADN très stable (GCclamp: 40 nucléotides de G et C consécutifs) qui crée artificiellement un domaine à haute température de fusion. Ceci peut être fait lors de la synthèse des oligonucléotides pour la PCR. Ces amorces sont alors constituées d'une partie spécifique du gène à amplifier et en 5' une queue de poly-CG.

La molécule de l'exemple 2 comporte deux domaines de températures différentes. En choisissant une amorce de PCR dans le domaine le plus haut et l'autre dans le plus bas, l'amplification produira un fragment directement analysable par DGGE N.B. La taille du domaine le plus bas (le seul analysable) ne doit pas dépasser 300 nucléotides.

Préparation d'un gradient:

La préparation d'un gradient s'effectue tout simplement à l'aide d'un préparateur de gradient. Les solutions utilisées sont préparées au laboratoire et le dénaturant employé est un mélange d'urée et de formamide.

Exemple de l'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial et en particulier la D-Loop où se situe l'origine de réplication est très variable au niveau de sa séquence nucléotidique. Il est donc très intéressant