

Optimisation et application de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dans un programme de sélection récurrente chez le cotonnier (*Gossypium* spp.)

Irié Vroh Bi ^(1,2), Patrick du Jardin ⁽²⁾, Guy Mergeai ⁽¹⁾, Jean-Pierre Baudoin ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Unité de Phytotechnie des Régions intertropicales. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). ⁽²⁾ Unité de Biologie végétale. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

Reçu le 18 juin 1996, accepté le 2 septembre 1996.

À partir d'ADN extrait de différentes espèces cultivées et sauvages de cotonnier, nous avons étudié et optimisé les paramètres intervenant dans les réactions RAPD. Ils montrent tous une influence sur le résultat final mais la concentration de l'ADN, du chlorure de magnésium, des désoxynucléotides triphosphates et la température de dénaturation semblent être les déterminants majeurs. L'optimisation des différents facteurs envisagés s'est faite par réajustements successifs en partant des conditions RAPD standard et en tenant compte des conditions indiquées par les fournisseurs des différents constituants de la réaction. Les conditions optimales obtenues ont ensuite été utilisées pour l'application de la technique RAPD comme assistance dans un programme d'hybridations interspécifiques chez le cotonnier. Dans ce programme, deux hybrides trispécifiques allotétraploïdes [(*Gossypium thurberi* Tod. × *G. sturtianum* Will.) doublé × *G. hirsutum* L., désigné par G405] et [(*G. hirsutum* × *G. raimondii* Ulbr.) doublé × *G. sturtianum*, désigné par G376] ont été rétrocroisés par trois variétés du cotonnier cultivé *G. hirsutum* (LPB5, NC8 et C2). Les études de distances génétiques réalisées par la méthode UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetical mean*) et le coefficient de similarité de Jaccard ont permis d'établir la variabilité génétique entre tous les génotypes étudiés. Au total, 375 bandes RAPD ont été générées par 30 amorces décimères. La similarité entre les espèces sauvages utilisées et le cotonnier cultivé *G. hirsutum* varie de 31,3 % à 39,2 % ; la similarité entre les variétés cultivées varie de 78,3 % à 78,7 %. À l'intérieur des individus issus du premier rétrocroisement (backcross de première génération ou backcross 1), la similarité varie de 63,2 % à 78,0 % pour le croisement G405 × LPB5, de 75,0 % à 80,4 % pour G405 × NC8, de 63,9 % à 82,2 % pour G405 × C2, de 76,3 % à 83,0 % pour G376 × C2 et de 64,9 % à 79,8 % pour le croisement G376 × LPB5. La distance entre le cotonnier cultivé et les backcross 1 a été calculée, permettant ainsi de choisir parmi les backcross ayant le caractère recherché, ceux qui sont les plus proches du cotonnier cultivé *G. hirsutum*. Ces résultats montrent que la RAPD peut être utilisée pour accélérer la sélection de matériels interspécifiques issus de rétrocroisements.

Mots-clés. RAPD, optimisation, cotonnier, *Gossypium*, hybridation interspécifique, similarité, dendrogramme, sélection.

Optimization and application of RAPD (random amplified polymorphic DNA) in a recurrent selection programme of cotton (*Gossypium* spp.). Using DNA extracted from different wild and cultivated species of cotton, we analyzed and optimized the parameters for the random amplification of polymorphic DNA (RAPD). All the parameters have an effect on the final result but the concentrations of template DNA, magnesium chloride, deoxynucleoside triphosphates, and the temperature of denaturation seem to be the most important factors. The optimization was performed by successive adjustments of the standard RAPD conditions and by taking into account the manufacturers' recommendations for each reagent. The optimized conditions were then used to assist an interspecific hybridization programme involving two allotetraploid trispecific hybrids [(*Gossypium thurberi* Tod. × *G. sturtianum* Will.) doubled × *G. hirsutum* L., designated by G405] and [(*G. hirsutum* × *G. raimondii* Ulbr.) doubled × *G. sturtianum*, designated by G376]. Both trispecific hybrids were backcrossed with three varieties (LPB5, NC8 and C2) of the cultivated upland cotton *G. hirsutum*. In RAPD analysis, thirty random decamer primers generated 375 RAPD markers. Analysis of genetic similarity from the RAPD data with UPGMA and Jaccard's distance revealed 78.3–78.7% similarity between the three varieties of *G. hirsutum* and 31.3–39.2% similarity between *G. hirsutum* and the wild diploid species (*G. thurberi*, *G. raimondii* and *G. sturtianum*). The genetic similarity within backcross 1 progenies showed values ranging between 63.2–78.0% for the cross G405 × LPB5, 75.0–80.4% for G405 × NC8, 63.9–82.2% for G405 × C2, 76.3–83% for G376 × C2 and 64.9–79.8% for the cross G376 × LPB5. This study allowed to choose within the first backcross progenies having the searched trait, those sharing the highest genetic similarity with the cultivated parent *G. hirsutum*. Results indicate that RAPD analysis can be used to accelerate the recurrent selection of interspecific materials from backcrosses.

Keywords. RAPD, optimization, cotton, *Gossypium*, interspecific hybridization, similarity, dendrogram, selection.

INTRODUCTION

Chez les plantes cultivées, une grande partie des caractères agronomiques importants sont sous la dépendance de nombreux gènes dont le nombre et la localisation au sein du génome ne sont pas déterminés. Aujourd'hui, de nouvelles techniques en biologie moléculaire et biochimie permettent de mieux comprendre le mode d'action de ces gènes. Au cours de ces dernières années, ces techniques ont permis l'intégration de marqueurs moléculaires dans plusieurs programmes d'amélioration des plantes. Les principaux types de marqueurs moléculaires utilisés sont les isozymes, les RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) et les RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Les isozymes ont été perçus, au départ, comme l'outil idéal pour la sélection assistée par marqueurs mais cette technique bien qu'efficace ne révèle qu'un faible taux de variabilité quand les génotypes testés sont très proches (Heun *et al.*, 1994). L'attention des améliorateurs se concentre à présent de plus en plus sur les marqueurs de type RFLP et les RAPD qui permettent d'accéder à une plus grande variabilité directement au niveau de l'ADN. Les marqueurs RFLP sont largement utilisés dans la construction de cartes génétiques chez plusieurs espèces ; Beckmann et Soller (1986) et Bulot (1990) insistent sur leur utilité en amélioration des plantes.

La technique RAPD appelée aussi AP-PCR (*arbitrary primed-PCR*), ou DAF (*DNA amplification fingerprinting*) est une variante de la technique PCR (*polymerase chain reaction*). Elle a été proposée simultanément par Welsh et McClelland (1990), Williams *et al.* (1990) et Caetano-Anollès *et al.* (1991). Elle est basée sur l'amplification par PCR de segments d'ADN en utilisant une amorce de petite taille (généralement 10 nucléotides) avec une séquence nucléotidique arbitraire. Dans cette réaction, la même amorce se lie à deux sites différents, situés sur les deux brins complémentaires de la matrice d'ADN. Si ces sites sont espacés par une distance amplifiable, des produits d'amplification thermocyclique sont obtenus. La présence de chaque produit d'amplification reflète l'homologie partielle ou totale de séquence entre l'amorce et chacun des deux bouts du produit amplifié (Waugh, Powell, 1992). Le polymorphisme entre individus peut résulter soit de changements nucléotidiques empêchant l'hybridation de l'amorce, soit de la délétion de tout le site d'hybridation de l'amorce ou des insertions entre deux amorces augmentant la longueur du fragment à amplifier par PCR (Williams *et al.*, 1990). L'avantage de cette technique par rapport aux RFLP est qu'elle n'utilise que quelques nanogrammes d'ADN et n'emploie pas la radioactivité. Elle est plus facile à réaliser par rapport à la PCR classique puisqu'elle ne nécessite pas la connaissance préalable de la séquence de l'ADN matrice à amplifier.

Les applications de la technique RAPD en amélioration des plantes sont diverses. Elle est utilisée dans la gestion

des ressources phylogénétiques pour étudier les relations phylétiques et la diversité génétique intra- ou interspécifique, par exemple entre ou au sein de populations (Stammers *et al.*, 1995 ; Virk *et al.*, 1995 ; Yeh *et al.*, 1995 ; Hoey *et al.*, 1996). Elle peut notamment servir à identifier des marqueurs génétiques (Paran, Michelmores, 1993 ; Miklas *et al.*, 1996 ; Ohmori *et al.*, 1996), à déterminer l'hybridité ou la pureté d'un matériel végétal (Marshall, Marchand, 1994 ; Wang *et al.*, 1994 ; Rom *et al.*, 1995) et à construire des cartes génétiques (Sobral, Honeycutt, 1993 ; Bradshaw *et al.*, 1994 ; Byrne *et al.*, 1995 ; Mukai *et al.*, 1995). Une des applications intéressantes de cette technique est de permettre le suivi des marqueurs spécifiques aux espèces parentales dans la descendance d'hybrides complexes (McCoy, Echt, 1993 ; Garcia *et al.*, 1995).

Bien que très utilisés ces dernières années dans les programmes de sélection, les tests RAPD ont souvent posé des problèmes de reproductibilité. Cependant, il a été démontré que ces problèmes peuvent être éliminés en optimisant les conditions expérimentales et en suivant un protocole précis pour un matériel végétal donné (Williams *et al.*, 1991 ; Heun, Helentjaris, 1993). Le but du présent travail est d'optimiser les réactions RAPD chez le cotonnier, en vue d'utiliser cette technique pour accélérer la restauration de l'équilibre génétique dans la descendance obtenue par rétrocroisement de différents hybrides trispécifiques avec le cotonnier cultivé *Gossypium hirsutum* L.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les cotonniers utilisés dans cette étude proviennent de la collection du Laboratoire de Phytotechnie des Régions intertropicales de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Maréchal, 1983). Les **figures 1 et 2** montrent les schémas de création de deux hybrides trispécifiques allotétraploïdes à partir du cotonnier cultivé tétraploïde *G. hirsutum* et des cotonniers diploïdes sauvages *Gossypium raimondii* Ulbr., *Gossypium thurberi* Tod. et *Gossypium sturtianum* Will. Ces deux hybrides trispécifiques désignés par G376 et G405 ont été rétrocroisés par trois variétés du cotonnier cultivé *G. hirsutum* (une variété américaine LPB5 et deux variétés africaines NC8 et C2). Ces rétrocroisements ont produit 42 graines backcross de première génération dont 27 ont donné des plantes adultes par culture *in vitro* et greffage (Vroh Bi, 1994 ; Mergeai *et al.*, 1995). L'ADN a été extrait à partir des feuilles de ces plantes par une méthode modifiée au CTAB (bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthyl ammonium) utilisant le charbon actif pour mieux éliminer les impuretés pouvant complexer l'ADN (Vroh Bi *et al.*, 1996).

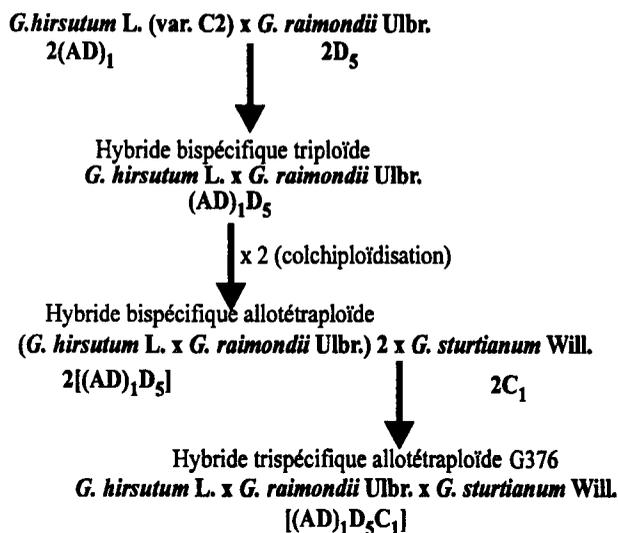


Figure 1. Schéma de création de l'hybride trispécifique G376 *G. hirsutum* L. × *G. raimondii* Ulbr. × *G. sturtianum* Will. — Outline to create the trispécific hybrid G376 *G. hirsutum* L. × *G. raimondii* Ulbr. × *G. sturtianum* Will.

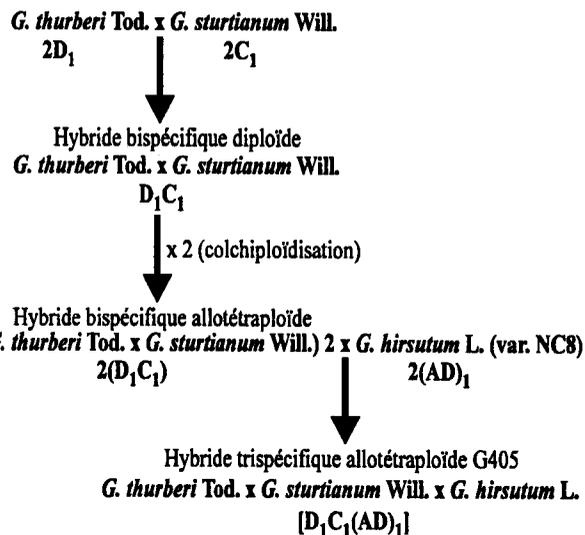


Figure 2. Schéma de création de l'hybride trispécifique G405 *G. thurberi* Tod. × *G. sturtianum* Will. × *G. hirsutum* L. — Outline to create the trispécific hybrid G405 *G. thurberi* Tod. × *G. sturtianum* Will. × *G. hirsutum* L.

Amplification de l'ADN par RAPD

Pour l'optimisation de la RAPD, six amorces décarnères [OPE-01 à OPE-06 de Operon Technologies Inc. (Alameda CA, USA)] ont été choisies. Le protocole de notre première réaction RAPD (conditions initiales) est une fusion des conditions d'amplification conseillées par Operon Technologies et des conditions d'amplification par PCR d'un gène de la petite sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase (rbcS) (Vroh Bi, résultats non publiés). Pour une réaction de 100 µL, nous avons employé 200 µM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 mM de MgCl₂, 20 picomoles d'oligonucléotide et 60 ng d'ADN génomique. Le mélange est couvert par trois gouttes d'huile minérale. Il subit une dénaturation de 5 min à 94°C, puis deux unités d'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (*Taq* polymérase) fournie par Pharmacia (Uppsala, Suède) y sont ajoutées. L'ensemble est ensuite soumis à 45 cycles d'amplification, chaque cycle étant composé d'une dénaturation de 1 min à 94°C, d'une hybridation à 34°C pendant 1 min, d'une élongation de 2 min à 72°C et d'une élongation finale à 72°C pendant 10 min. L'amplification est réalisée avec un thermocycleur Techne PHC-3.

Dans tous les essais d'optimisation qui ont suivi, nous avons utilisé 7 µL de chaque réaction pour réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose 1,8 % de dimension 12 cm × 25 cm dans du tampon tris-acétate-EDTA (TAE) 1× (Sambrook *et al.*). L'électrophorèse se fait à une intensité de 45 mA pendant 120 à 150 min. Le marqueur de poids moléculaire est l'ADN des phages φX174 et λ digérés respectivement par les enzymes de restriction *Hae*III et *Hind*III. Dans ces essais d'optimisation, nous avons testé

14 concentrations d'ADN de *G. hirsutum* L. (variété NC8), huit concentrations de MgCl₂ (chlorure de magnésium), cinq concentrations de dNTPs (désoxynucléosides triphosphates), deux durées de première dénaturation, deux températures d'hybridation, sept concentrations d'amorce, cinq durées de dernière élongation et 12 concentrations de *Taq* polymérase. L'optimisation a consisté en une modification progressive des conditions initiales de la réaction, en retenant, à chaque nouvelle étape où un nouveau paramètre est étudié, les valeurs ou conditions optimales obtenues pour les paramètres déjà testés.

À partir des conditions optimales ainsi définies, la technique RAPD est appliquée pour l'étude des relations entre tous les génotypes. Dans cette étude, nous avons employé 30 amorces RAPD, et 12 µL de chaque réaction pour réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose 1,8 % de dimension 21 cm × 36 cm dans du tampon TAE 1×. L'électrophorèse se fait à une intensité de 75 mA pendant 150 à 180 min.

Analyses statistiques

Le coefficient de similarité de Jaccard (Heun *et al.*, 1994) a été calculé en utilisant la méthode UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetical mean*) avec le logiciel Systat version 5.2.1 (Systat Inc. 1992, Illinois, USA). Cette méthode génère des matrices de similarité en comparant tous les individus à classer pris deux à deux. Elle permet aussi de construire des dendrogrammes en partant des deux individus entre lesquels la similarité est la plus élevée, et en recherchant ensuite parmi les individus restant, celui qui est le plus proche des deux premiers classés, assimilés à

une unité taxonomique opérationnelle (Nei, 1987). Les bandes RAPD auxquelles nous nous intéressons sont désignées par le nom de l'amorce qui les a générées, suivi de l'estimation de leur poids moléculaire exprimé en paires de bases en comparaison au marqueur. Toutes les réactions RAPD ont été répétées deux fois et seules les bandes reproductibles sont analysées. Toutes les bandes reproductibles ont été enregistrées pour leur présence (1) ou leur absence (0) chez tous les génotypes étudiés et avec les 30 amorces RAPD utilisées. À partir de ce tableau de présence (1) – absence (0), la méthode UPGMA génère des matrices de similarité et des dendrogrammes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Optimisation des paramètres de la RAPD

Effets de différentes concentrations d'ADN. La figure 3 présente l'effet de 14 concentrations différentes d'ADN sur l'amplification. La réaction a été réalisée avec l'amorce OPE-06 sur l'ADN de *G. hirsutum* (variété NC8). Une perte d'intensité des bandes se manifeste à partir de 90 ng pour les fortes concentrations en ADN. La concentration limite pour distinguer le maximum de bandes semble se situer à 100 ng d'ADN. La concentration de 200 ng d'ADN permet encore d'amplifier quelques fragments de faible poids moléculaire. À partir de 300 ng d'ADN, aucune amplification n'a été obtenue. Au-delà de cette concentra-

tion, des "smear" (traînées continues d'ADN) apparaissent sur le gel. La concentration en ADN des réactions RAPD est un des paramètres les plus importants. La concentration optimale d'ADN varie en fonction du matériel végétal et de la méthode d'extraction utilisée. Dans le cadre de notre travail, la fourchette de 50 à 80 ng d'ADN par réaction de 25 µL peut être proposée, la taille du génome du cotonnier *G. hirsutum* utilisé dans cette étude étant de 2118 à 2374 Mbp (Arumuganathan, Earle, 1991). Cependant, quel que soit le matériel utilisé, un compromis doit être trouvé pour la concentration d'ADN employée dans les réactions ; une trop faible concentration en ADN ne permet pas de bien distinguer tous les produits amplifiés, alors que de trop fortes concentrations peuvent inhiber la réaction à cause de l'accumulation possible de contaminants. Dans la fourchette proposée, nous avons retenu 50 ng pour optimiser les autres paramètres.

Effet du MgCl₂ (chlorure de magnésium). La figure 4 montre la différence d'amplification observée à six concentrations différentes de MgCl₂. La réaction a été réalisée avec l'amorce OPE-06 (5'-AAGACCCCTC-3') sur l'ADN de *G. hirsutum* (variété NC8). La réduction drastique du nombre de bandes et de leur intensité à partir de 2,5 mM confirme l'importance du rôle du MgCl₂ dans les réactions RAPD et l'intérêt d'en optimiser la concentration. Le chlorure de magnésium est un élément essentiel des réactions RAPD. Les ions Mg²⁺ forment un complexe

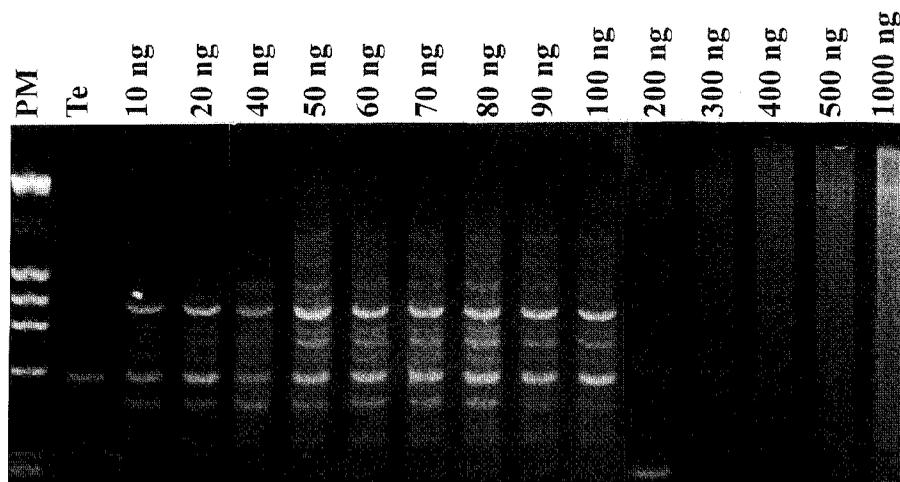


Figure 3. Profil RAPD de 14 concentrations d'ADN de *G. hirsutum* (variété NC8) sur gel d'agarose 1,8 % : résultats obtenus avec l'amorce OPE-06 (5'-AAGACCCCTC-3'). PM est le marqueur de poids moléculaire (*Lambda/Hind*III + *PhiX174/Hae*III), Te est le témoin amplifié sans ADN. La bande de 600 pb amplifiée à toutes les concentrations d'ADN est, ici, aussi présente dans le témoin — RAPD profile of 14 concentrations of template DNA, in 1.8% agarose gel. The RAPD products were generated using OPE-06 (5'-AAGACCCCTC-3') and the DNA of *G. hirsutum* (variety NC8). PM represents the molecular size marker (DNA of *Lambda/Hind* III and *PhiX174/Hae* III), Te is the negative control amplified without DNA. The 600 bp band amplified for all the DNA concentration is here also present in the negative control.

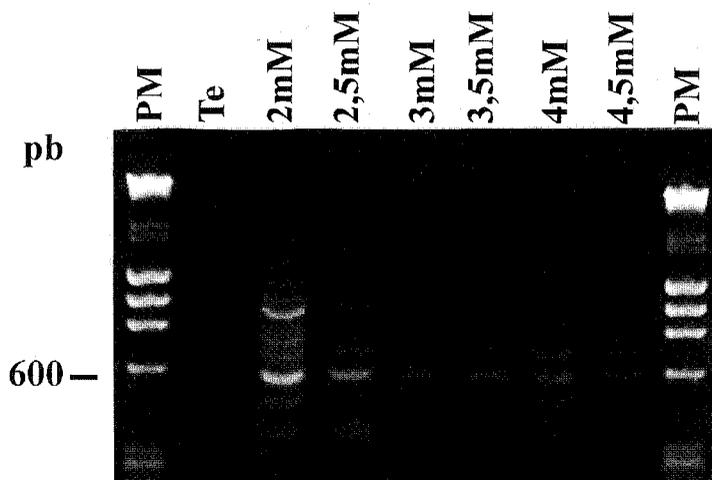


Figure 4. Profil RAPD de six concentrations de $MgCl_2$ sur gel d'agarose 1,8 % : résultats obtenus avec l'amorce OPE-06 (5'-AAGACCCCTC-3') chez *G. hirsutum* (variété NC8). PM est le marqueur de poids moléculaire (*Lambda/HindIII* + *PhiX174/HaeIII*), Te est le témoin amplifié sans ADN. La bande de 600 pb a été amplifiée à toutes les concentrations testées — RAPD profile of six concentrations of $MgCl_2$, in 1.8% agarose gel. The RAPD products were generated using OPE-06 (5'-AAGACCCCTC-3') and the DNA of *G. hirsutum* (variety NC8). PM represents the molecular size marker (DNA of *Lambda/Hind III* and *PhiX 174/Hae III*), Te is the negative control amplified without DNA. The 600 bp band was amplified for all the concentrations tested.

soluble avec les dNTPs, ce qui est indispensable à l'incorporation de ces derniers dans la chaîne d'ADN en croissance ; ces ions stimulent l'activité de l'ADN polymérase (Newton, Graham, 1994). De plus, le $MgCl_2$ affecte d'autres paramètres comme l'hybridation des amorces et la dissociation des brins de l'ADN et des produits d'amplification (Innis *et al.*, 1990). Dans nos expériences, nous avons aussi testé 1,5 mM de $MgCl_2$ (résultats non montrés). Cette concentration amplifie moins de bandes que celle de 2 mM. Nous utiliserons donc 2 mM de $MgCl_2$ pour la suite de nos travaux.

Durée de la première dénaturation à 94°C. Deux durées de dénaturation à 94°C ont été comparées : 5 min à 94°C, et 1 min 30 s à 94°C. L'amplification est meilleure après 5 min de dénaturation à 94°C (résultats non montrés). Cette différence montre la grande importance de la température et du temps de dénaturation dans les réactions RAPD. Un des plus importants facteurs de réussite des réactions PCR est la dénaturation complète de l'ADN matrice et/ou des produits PCR, une dénaturation incomplète entraînant la renaturation des brins avec pour conséquence une réduction du rendement d'amplification (Innis *et al.*, 1990). La température de toutes les autres dénaturations au cours des cycles est aussi de 94°C, mais avec une durée réduite à 1 minute pour éviter la perte d'activité de la *Taq* polymérase. En général, des températures de première dénaturation de 95°C à 100°C sont suffisantes pour dénaturer l'ADN de génomes complexes.

Résumé des essais d'optimisation de la RAPD. Le tableau 1 reprend l'ensemble des résultats de tous les essais d'optimisation des réactions RAPD réalisés chez le cotonnier. Les paramètres sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été testés. Les conditions optimales retenues sont indiquées dans la dernière colonne du tableau.

Polymorphisme et similitude entre les géotypes étudiés

L'utilisation de 30 amorces décimères avec les conditions RAPD jugées optimales a permis d'étudier le polymorphisme entre tous les géotypes intervenant dans la présente étude. Sur 375 produits RAPD générés au total, 339 soit 90,4 % sont polymorphes. La figure 5 présente les résultats obtenus avec l'amorce OPD-03 chez les backcross 1 des croisements G405 × NC8 et G376 × NC8, et chez tous les parents de ces backcross 1. Le marqueur OPD03-690 est spécifique à *G. sturtianum*, il est présent chez les trispécifiques G376 et G405 et ségrège chez les backcross 1. La bande OPD03-520 est spécifique aux variétés du cotonnier cultivé *G. hirsutum* (1, 2, 3, 4) et permet de faire une différence nette entre les parents cultivés et les parents sauvages. La variabilité des profils des cinq backcross 1 du croisement G405 × NC8, et des deux backcross 1 du croisement G376 × NC8 est aussi remarquable. Des analyses de similarité ont été réalisées pour six croisements (G405 × LPB5, G405 × NC8, G405 × C2, G376 × NC8, G376 × C2 et G376 × LPB5). Un exemple de matrice de similarité obtenue pour le croisement G405 × LPB5 est présenté dans le tableau 2. Cette matrice fait ressortir directement les coefficients de similarité de Jaccard obtenus entre les 11 géotypes de ce croisement, pris deux à deux. La figure 6 montre le dendrogramme obtenu à partir de la matrice du tableau 2. Ce dendrogramme permet de vérifier la conformité de la classification. En effet, la place occupée dans ce dendrogramme par *G. sturtianum*, *G. hirsutum* et *G. thurberi* est conforme à la classification phylétique habituellement reconnue dans le genre *Gossypium*, ce qui laisse supposer que l'ordre de classement des backcross 1 du dendrogramme est correcte. Le tableau 3 montre un exemple de comparaison entre les backcross 1 du croisement G405 × LPB5 et leurs parents cultivés *G. hirsutum* (NC8 et LPB5). Ce tableau permet de choisir les backcross dont les profils RAPD sont les plus

Tableau 1. Optimisation des différents paramètres des réactions RAPD sur ADN de cotonnier (les tests sont réalisés dans un volume de réaction de 25 µL). Les paramètres sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été testés — *Optimization of the different RAPD reaction parameters when using cotton DNA (Tests are performed in 25 µL reaction volume). The parameters are presented in the order followed during the tests.*

Paramètres étudiés	Gamme testée	Commentaires	Conditions retenues
Concentration en ADN (ng)	10–20–40–50–60–70–80–90–100–200–300–400–500–1000	Perte de grands et petits fragments entre 10 et 40 ng. Amplification constante entre 50 et 80 ng. Baisse d'amplification au-delà de 80 ng. Inhibition totale de 300 ng.	50 ng
Concentration de MgCl ₂ (mM)	1,5–2–2,5–3–3,5–4–4,5–5	1,5 mM amplifie moins de bandes que 2mM. Les concentrations supérieures à 2mM ne permettent pas en général d'amplifier les grands fragments.	2 mM
Concentration des dNTPs (µM)	50–100–150–200–250	50 et 100 µM entraînent des pertes de bandes.	200 µM
Durée de première dénaturation à 94°C (min)	1,5–5	94°C en 5 min convient mieux à la dénaturation de l'ADN utilisé dans notre cas.	5 min
Concentration en amorce (pM/25 µL)	0–10–20 ; 30–40–50–60	Les meilleures amplifications sont obtenues avec 10 et 20 pmoles. Au-delà, les "smears" apparaissent avec perte des grands fragments.	20 pM/ 25 µL
Température d'hybridation (°C)	34–36	Les meilleures amplifications sont obtenues à 34°C.	34°C
Durée de la dernière élongation à 72°C (min)	0–2,5–5–7,5–10	Les temps compris entre 0 et 5 min entraînent la perte des fragments de haut poids moléculaire. Entre 7 min 30 s et 10 min l'amplification est constante.	7,5
Nombre de cycles d'amplification	35–45	35 cycles semblent insuffisants pour amplifier le maximum de bandes reproductibles.	45 cycles
Quantité de <i>Taq</i> polymérase (unités enzymatiques)	0–0,4–0,6–0,8–1–1,2–1,4–1,6–1,8–2–2,2–2,4	Les quantités d'unités inférieures à 1,4 entraînent la perte de grands fragments. Entre 1,4 et 2,4 unités, les amplifications semblent constantes.	1,5 unités

proches de ceux des parents cultivés. Le nombre de backcross à retenir pour le prochain cycle de rétrocroisement dépendra des capacités de gestion du matériel par le sélectionneur.

Cette étude de similarité a été réalisée pour tous les croisements que nous avons effectués. Elle montre que la similarité entre les espèces sauvages utilisées et le cotonnier cultivé *G. hirsutum* varie de 31,3 % à 39,2 %. La similarité entre les variétés cultivées varie de 78,3 % à 78,7 %. À l'intérieur des backcross 1 la similarité varie de 63,2 % à 78,0 % pour le croisement G405 × LPB5, de 75,0 % à 80,4 % pour G405 × NC8, de 63,9 % à 82,2 % pour G405 × C2, de 76,3 % à 83,0 % pour G376 × C2 et de 64,9 % à 79,8 % pour le croisement G376 × LPB5.

CONCLUSION

La technique RAPD est devenue un outil très utile d'assistance en amélioration des plantes grâce à sa rapidité et à sa simplicité par rapport aux autres types de marqueurs

moléculaires. Les conditions optimales de réalisation des réactions RAPD varient sensiblement en fonction du matériel végétal utilisé. L'optimisation des différents paramètres intervenant dans ces réactions constitue un préalable indispensable à toute utilisation de ce type de marqueurs dans un programme d'amélioration. Ce travail préliminaire doit aboutir à un rendement optimal en terme d'amplification de l'ADN et garantir une haute reproductibilité des résultats. Les essais d'optimisation menés chez le cotonnier semblent montrer qu'il est difficile de proposer un schéma standard d'optimisation des réactions RAPD, car presque tous les paramètres interagissent pour influencer le résultat final. Une série de réajustements successifs est donc nécessaire pour obtenir un résultat satisfaisant. Il semble cependant souhaitable de partir des conditions proposées par Williams *et al.* (1990) et de tenir compte des conditions proposées par les fournisseurs des différents constituants de la réaction. Cette démarche a abouti, chez le cotonnier, à une très bonne reproductibilité des réactions RAPD. Les paramètres majeurs pour une optimisation

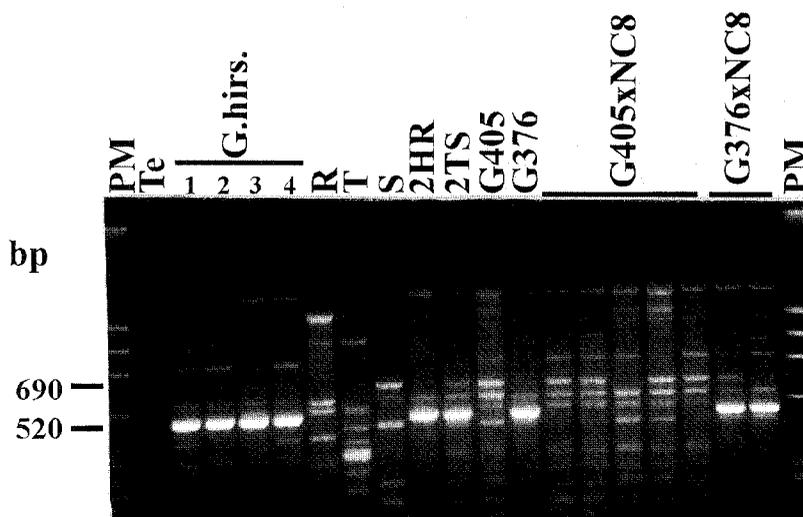


Figure 5. Profil RAPD en gel d'agarose 1,8 % obtenu avec **OPD-03** (5'-GTCGCCGTCA-3') chez les génotypes suivants — *RAPD profile in 1.8% agarose gel, obtained with OPD-03 (5'-GTCGCCGTCA-3')* in the following genotypes :

G. hirs. = *G. hirsutum* (variétés 1 = Stam F, 2 = NC8, 3 = C2, 4 = LPB5) ; *R* = *G. raimondii* Ulbr. ; *T* = *G. thurberi* Tod. ; *S* = *G. sturtianum* Will. ; 2HR = hybride (*G. hirsutum* L. × *G. raimondii* Ulbr.) doublé ; 2TS = hybride (*G. thurberi* Tod. × *G. sturtianum* Will.) doublé ; G405 = (2TS × *G. hirsutum*) et G376 = (2HR × *G. sturtianum*) sont des hybrides trispécifiques (*trispécies hybrids*). Les backcross 1 sont indiqués par la formule du croisement qui les a générés (**G405 × NC8** et **G376 × NC8**). **PM** indique le marqueur de poids moléculaire (*Lambda/HindIII* + *PhiX174/HaeIII*). **Te** est le témoin amplifié sans ADN. La bande de 690 pb est spécifique à *G. sturtianum* (*S*) et ségrège chez les backcross 1. Le fragment de 520 pb est spécifique aux variétés de *G. hirsutum* (1, 2, 3, 4) et est absent chez les parents sauvages *R*, *T* et *S* — *The different groups of backcross 1 are indicated by their crosses formulas (G405 × NC8 and G376 × NC8). PM represents the molecular size marker (DNA of Lambda/Hind III and PhiX174/Hae III), Te is the negative control amplified without DNA. The band of 690 pb is specific to G. sturtianum (S) and segregates in the backcross 1 progenies. The 520 pb fragment is specific to the varieties of G. hirsutum (1, 2, 3, 4) and is absent in the wild parents R, T and S.*

Tableau 2. Matrice de similarité de Jaccard (% de similarité) des 11 génotypes du croisement G405 × LPB5 comparés deux à deux. *G. hirsutum* NC8, *G. thurberi* et *G. sturtianum* sont les parents de l'hybride trispécifique G405 ; G405 × LPB5/1 indique la plante n°1 issu du rétrocroisement de l'hybride trispécifique G405 par la variété de cotonnier cultivé LPB5. La diagonale indique que chaque individu a 100 % de similarité avec lui même — *Jaccard's similarity matrix (similarity percent) from the 11 genotypes of the combination G405 × LPB5 compared by pairs. G. hirsutum NC8, G. thurberi and G. sturtianum are the parents of the trispécific hybrid G405, G405 × LPB5/1 indicates the plant n°1 obtained by backcrossing the trispécific hybrid G405 with the variety LPB5 of the cultivated cotton. The diagonal indicates 100% similarity of each individual with itself.*

Génotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>G. hirsutum</i> NC8 =	1	100										
<i>G. hirsutum</i> LPB5 =	2	78,7	100									
<i>G. thurberi</i> =	3	39,7	38,3	100								
<i>G. sturtianum</i> =	4	31,2	30,9	29,8	100							
G405 =	5	57,6	56,2	43,1	38,9	100						
G405 × LPB5/1 =	6	58,5	58,1	45,5	34,8	67,5	100					
G405 × LPB5/4 =	7	62,4	58,7	44,8	33,4	66,2	72,8	100				
G405 × LPB5/6 =	8	61,6	60,7	43,0	31,2	63,8	70,2	73,8	100			
G405 × LPB5/8 =	9	58,6	57,8	43,4	35,8	69,7	71,4	71,8	76,8	100		
G405 × LPB5/10 =	10	58,0	57,7	42,3	34,2	67,9	66,7	68,3	68,8	78,0	100	
G405 × LPB5/12 =	11	58,1	57,8	42,2	37,5	57,6	64,0	63,4	63,2	68,5	67,4	100

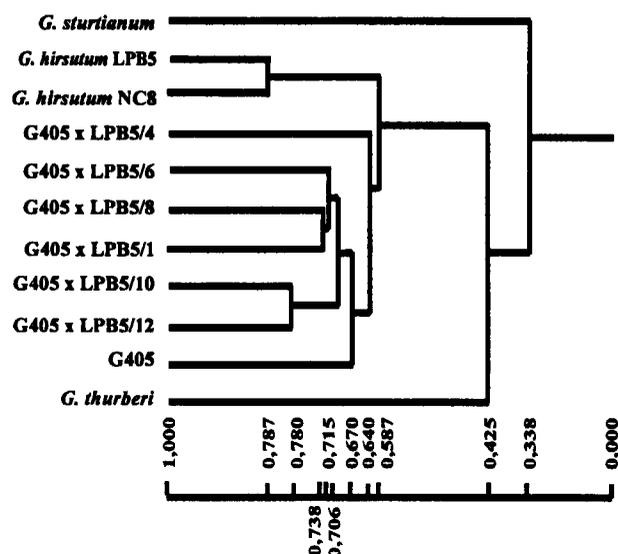


Figure 6. Dendrogramme construit à partir des coefficients de similarité de Jaccard obtenus entre les géotypes du croisement G405 x LPB5. *G. hirsutum* NC8, *G. thurberi* et *G. sturtianum* sont les parents de l'hybride trispécifique G405 ; G405 x LPB5/n indique la plante numéro n issue du rétrocroisement de l'hybride trispécifique G405 par la variété de cotonnier cultivé LPB5 — *Dendrogram established from the Jaccard's similarity coefficients calculated between the genotypes of the combination G405 x LPB5. G. hirsutum* NC8, *G. thurberi* and *G. sturtianum* are the parents of the trispécific hybrid G405; G405 x LPB5/n indicates the plant number n obtained by backcrossing the trispécific hybrid G405 with the variety LPB5 of the cultivated cotton.

de réaction RAPD chez une plante chez laquelle la RAPD n'a pas encore été étudiée sont ceux qui entraînent à certaines concentrations, durées ou températures, une perte totale de l'amplification. Dans notre cas, ce sont la concentration d'ADN, de $MgCl_2$, de dNTPs et la température de dénaturation. L'optimisation de ces derniers paramètres permet d'améliorer l'intensité des bandes amplifiées en ajustant les autres paramètres. La quantité de l'ADN polymérase doit être élevée au départ (de l'ordre de deux unités) pour assurer l'amplification.

Dans les programmes de sélection récurrente, une des priorités du sélectionneur est l'obtention rapide de formes agronomiquement acceptables mais possédant le caractère du géotype donneur. Dans ce sens, la RAPD facilite et accélère la sélection en permettant à chaque génération de rétrocroisement, le choix des individus introgressés génétiquement les plus proches du parent cultivé. L'utilisation de cette technique dans les programmes d'hybridation

devrait réduire sensiblement le nombre de générations de rétrocroisements habituellement nécessaire en sélection classique pour développer une forme introgressée acceptable.

Remerciements

Ce travail a été financé par la convention 2.4565.95 du "Fonds de la Recherche fondamentale collective" de Belgique.

Bibliographie

- Arumuganathan K, Earle ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9 (3), 208–218.
- Beckmann JS, Soller M (1986). Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35, 111–124.

Tableau 3. Comparaison des backcross de première génération du croisement G405 x LPB5. *G. hirsutum* NC8, *G. thurberi* et *G. sturtianum* sont les parents de l'hybride trispécifique G405 ; G405 x LPB5/1 indique la plante n°1 issu du rétrocroisement de l'hybride trispécifique G405 par le cotonnier cultivé *G. hirsutum* (variété LPB5) — *Comparison of the first generation backcrosses from the combination G405 x LPB5. G. hirsutum* NC8, *G. thurberi* and *G. sturtianum* are the parents of the trispécific hybrid G405; G405 x LPB5/1 indicates the plant n°1 obtained by backcrossing the trispécific hybrid G405 with the cultivated cotton *G. hirsutum* (variety LPB5).

Géotypes	Similarité avec la variété NC8 (%)	Géotypes	Similarité avec la variété LPB5 (%)
NC8	100	LPB5	100
LPB5	78,7	NC8	78,7
G405 x LPB5/8	62,4	G405 x LPB5/1	60,7
G405 x LPB5/1	61,6	G405 x LPB5/8	58,7
G405 x LPB5/10	58,6	G405 x LPB5/6	58,1
G405 x LPB5/6	58,5	G405 x LPB5/4	57,8
G405 x LPB5/4	58,1	G405 x LPB5/10	57,8
G405 x LPB5/12	58,0	G405 x LPB5/12	57,7

- Bradshaw Jr HD, Villar M, Watson BD, Otto KG, Stewart S, Stettler RF (1994). Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 167–178.
- Bulut S (1990). La méthode RFLP, nouvel outil du sélectionneur. *Semences Prog.* **64**, 22–28.
- Byrne M, Murrel JC, Allen B, Moran GF (1995). An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* **91**, 869–875.
- Caetano-Anollès G, Bassam GJ, Gresshof PM (1991). High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* **9**, 553–556.
- Garcia GM, Stalker HT, Kochert G (1995). Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers. *Genome* **38**, 166–176.
- Heun M, Helentjaris T (1993). Inheritance of RAPDs in F_1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 961–968.
- Heun M, Murphy JP, Phillips TD (1994). A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationship among *Avena sterilis* L. accessions. *Theor. Appl. Genet.* **87**, 689–696.
- Hoey BK, Crowe KR, Jones VM (1996). A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 92–100.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990). "PCR protocols", pp. 1–482. Academic Press, San Diego, USA.
- Marshall P, Marchand MC (1994). A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F_1 hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 853–858.
- Maréchal R (1983). Une collection d'hybrides interspécifiques du genre *Gossypium*. *Coton Fibres Trop.* **38**, 240–246.
- McCoy TJ, Echt CS (1993). Potential of trispecies bridge crosses and random amplified polymorphic DNA markers for introgression of *Medicago daghestanica* and *M. pironae* germplasm into alfalfa (*M. sativa*). *Genome* **36**, 594–601.
- Mergeai G, Vroh Bi I, du Jardin P, Baudoin JP (1995). Introgression of glanded-plant and glandless-seed trait from *G. sturtianum* Willis into tetraploid cotton plants. In "Proceedings of Beltwide cotton improvement conference, 6–7 January 1995", pp. 513–514. San Antonio, USA.
- Miklas PN, Afanador L, Kelly JD (1996). Recombination-facilitated RAPD marker-assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop Sci.* **36**, 86–90.
- Mukai Y, Suyama Y, Tsumura Y, Kawahara T, Yoshimaru H, Kondo T, Tomaru N, Kuramoto N, Murai M (1995). A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 835–840.
- Nei M (1987). "Molecular evolutionary genetics", pp. 1–512. Columbia University Press, New York, USA.
- Newton CR, Graham A (1994). "PCR", pp. 1–161. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F (1996). Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 151–156.
- Paran I, Michelmore RW (1993). Development of PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 985–993.
- Rom M, Bar M, Rom A, Pilowsky M, Gidoni D (1995). Purity control of F_1 -hybrid tomato cultivars by RAPD markers. *Plant Breed.* **114**, 188–190.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual", 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Sobral BWS, Honeycutt RJ (1993). High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers. *Theor. Appl. Genet.* (86), 105–112.
- Stammers M, Harris J, Evans GM, Hayward MD, Forster JW (1995). Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity* **74**, 19–27.
- Virk PS, Ford-Llyod BV, Jackson MT, Newbury HJ (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* **74**, 170–179.
- Vroh Bi I (1994). Étude sur les possibilités d'introgesser le retard à la morphogenèse des glandes à gossypol de la graine chez le cotonnier cultivé *Gossypium hirsutum* L. Mémoire de certificat d'études approfondies, Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Belgique.
- Vroh Bi I, Harvengt L, Chandellier A, Mergeai G, du Jardin P (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breed.* **115**, 205–206.
- Wang WY, Pai RC, Lai CC, Lin TP (1994). Molecular evidence for the hybrid origin of Paulownia based on RAPD markers and RFLP of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 271–275.
- Waugh R, Powell W (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotechnol.* **10**, 186–191.
- Welsh J, McClelland M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 7213–7218.
- Williams JJGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphism amplified arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531–6535.
- Yeh FC, Chong DKX, Yang RC (1995). RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *J. Hered.* **86**, 454–460.