



**HAL**  
open science

## Marqueurs moléculaires, RAPD et SCAR, de résistances au *Bremia lactucae* identifiées chez des *Lactuca sauvages*

Brigitte Maisonneuve, Richard Micheltore, Yannick Bellec

### ► To cite this version:

Brigitte Maisonneuve, Richard Micheltore, Yannick Bellec. Marqueurs moléculaires, RAPD et SCAR, de résistances au *Bremia lactucae* identifiées chez des *Lactuca sauvages*. Proceeding of Réunion du groupe de travail marqueurs moléculaires chez les végétaux: Meribel 1993, FRA (1993-03-22 - 1993-03-26), 1993. hal-02852541

**HAL Id: hal-02852541**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02852541>**

Submitted on 7 Jun 2020

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

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

# MERIBEL 1993

**Groupe de travail *Marqueurs Moléculaires*  
chez les *Végétaux*, 22-26 mars 1993**

**Document préparé par la Station de  
Génétique Végétale du Moulon**

## Marqueurs moléculaires, RAPD et SCAR, de résistances au *Bremia lactucae* identifiées chez des *Lactuca* sauvages

Brigitte Maisonneuve (1, 2), Richard Michelmore(2), Yannick Bellec(1)

(1) INRA, Station de Génétique, 78026-Versailles Cedex

(2) University of California, Department of Vegetable Crops, Davis-CA95616, USA

### INTRODUCTION

La recherche de résistances aux maladies est l'un des principaux objectifs de l'amélioration de la laitue. Les espèces sauvages constituent une source importante de résistances ; *L. serriola* a été souvent utilisée (résistances au *B. lactucae*, résistance au corky root). A l'INRA, nous avons identifié dans cette espèce des résistances au *B. lactucae* efficaces vis à vis de tous nos isolats ; nous cherchons à cumuler plusieurs de ces résistances dans un même génotype. Pour réaliser ces programmes, un marquage des gènes de résistances serait très intéressant pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, le cumul dans un même génotype de plusieurs gènes différents conférant une résistance à tous nos isolats est un travail très long et lourd (test sur descendances en croisement avec un génotype sensible). De plus tout croisement pour améliorer la valeur agronomique remet en question le cumul. Chez une plante comme la laitue, pour laquelle la gamme variétale est très large et en permanente évolution, un tel cumul de gènes est, en pratique, irréaliste pour un sélectionneur. Seule la possession de marqueurs codominants, stables, faciles à utiliser permet d'envisager cette stratégie d'utilisation des nouveaux gènes de résistance.

D'autre part, ces tests nécessitent l'emploi d'agent pathogènes dangereux (isolats très virulents reçus de l'étranger). Des marqueurs utilisés comme aide à la sélection permettraient de limiter les tests.

De plus, les marqueurs permettent de localiser les gènes de résistances sur la carte génétique ; tous les gènes actuellement identifiés sont regroupés sur 4 linkats, alors que la carte génétique comprend aujourd'hui 14 linkats (n=9 chez *Lactuca sativa*). La localisation permet de déterminer une stratégie d'utilisation des gènes.

En outre, un programme de clonage de gènes de résistance au *B. lactucae* est développé à Davis. Il nécessite, au préalable, une bonne carte génétique saturée en marqueurs encadrant les gènes de résistance.

Il était donc intéressant de rechercher des marqueurs de 2 nouvelles résistances au *B. lactucae* identifiées chez *L. serriola*. L'identification des marqueurs a pu être réalisée rapidement en utilisant la "Bulk Segregant Analysis" (Michelmore, Paran Kesseli, 1991 ; Proc.Natl. Acad. Sci., 88, 9828-9832). Des marqueurs RAPD ont été identifiés et certains ont été transformés en SCAR. Les SCARs (= Sequence Characterized Amplified Regions) sont aussi des marqueurs basés sur une PCR, mais avec des amorces spécifiques d'une séquence d'une région du génome liée au gène étudié (Paran et Michelmore, 1993 ; Theor. Appl. Genet., 85, 985-993). Une publication sur ce travail est en cours de rédaction.

When a RAPD marker was new for lettuce genome, a creation of SCARs was made with the method described previously by Paran and Michelmore (1993). If there was the same amplified band for the both parental genotypes, fragments were digested with different four cutter endonucleases by adding in PCR tube 2.5  $\mu$ l of buffer and enzyme to reveal a polymorphism.

### *Mapping*

If there was a polymorphism, parental DNA was analysed, then individual segregating plants were studied. Data were analysed using Mapmaker (Lander et al., 1987) and a LOD score of 3.5.

For markers not yet located on lettuce map, study of polymorphism between Calmar and Kordaat was made for the same band; if the result was positive individual F<sub>2</sub> (Calmar x Kordaat) was scored, because this is the basic population to make genetic map of lettuce (Landry et al., 1987).

## RESULTS

### *Resistance of YYD to B. lactucae*

Les résultats sont en accord avec une hypothèse de 1 gène dominant.

### *Identification of RAPD markers linked to resistance of YYD*

For F<sub>2</sub> (Girelle x YYD), DNA was extracted 59 days after sowing for the bulks of resistant and susceptible individuals and 8 to 10 weeks after sowing for the individuals 133 plants (growth in winter).

The initial study of 11 RAPD markers that mapped to the four clusters of *Dm* genes identified no polymorphism between the bulks. Therefore, random primers were tested. Fourteen out of 230 primers revealed potential polymorphisms, with 2 polymorphic bands for one primer (Table 1). But only 5 primers (OPS02, OPT08 with 2 bands, OPR13, OPX04, OPO03) identified reliable polymorphism that could be confirmed with individual plants. Scoring of the polymorphic band was easy and stable with OPS02 and OPO03, more difficult with OPT08 and OPX04 and very difficult with OPR13. The study of Calmar vs Kordaat with first three RAPDs found for R17 gave a useful polymorphism with OPS02; therefore we can locate OPS02 on lettuce genetic map on *Dm5/8* cluster. Then new markers mapped to this cluster were studied. Only 1 out of 21 markers of this cluster was polymorphic between Girelle and YYD (OPG02-1100). In fact, OPT08 and OPO03 were polymorphic between Calmar and Kordaat, but not yet located on this cluster.

Four scars of this cluster studied identified no polymorphism between Girelle and YYD (presence of band for SCF12, SCU16 and SCX03, no band for SCD08).

### *Production of Scars*

Two out of 4 polymorphic bands linked to R17 isolated from electrophoretic gels were successfully cloned into bluescript vector. Therefore, 2 new SCARs were made (produced by Operon Technologies) with sequence of the primer extend with 14 first extra bases from amplified band for each extremity :

bands OPS02-1470 and OPT08-490. After a PCR with 60°C for annealing, each of these 2 SCARs revealed the same band for both parental DNA. Cutting with restriction enzymes revealed codominant marker, cutting with HaeIII for SCS02-1470 and with AluI+MseI for SCT08 (annealing temperature was 65°C). Both SCARs were used to score F<sub>2</sub> (Girelle x YYD), but only SCT08 was useful to score F<sub>2</sub> (Calmar x Kordaat).

#### *Map of R17*

Polymorphic primers between bulks were used with 133 F<sub>2</sub> individuals (Table 2a). Scoring was successful for each plant with OPS02, OPG02, OPX04, OPO03 and both SCARs (SCS02 and SCT08). The recombination values and best fit gene orders were determined using Mapmaker. The markers were in a window of 36 cM with R17 close to the middle. The closest markers were OPX04 at 4.0cM and SCT08 at 6.2cM from R17.

#### *Resistance of Mariska to B. lactucae*

Les résultats sont en accord avec une hypothèse de 1 gène dominant.

#### *Identification of RAPD markers linked to resistance of Mariska (R18)*

DNA was extracted from 85 F<sub>3</sub> lines 3 weeks after sowing in greenhouse in summer. Two bulks were made with DNA from homozygous 19 susceptible and 14 resistant families. For some of recombinant families a second extraction was made from full seedlings 10-days old in growth chamber on filter paper (<1g of leaves per family).

The initial study of RAPD markers that mapped to the *Dm1/Dm3* cluster identified a polymorphism between the bulks. Therefore only RAPDs from this cluster were tested (Table 1) ; four out of 20 tested primers were polymorphic (OPA08-1720, OPW09-980, OPY02-1100, OPV02-1970). Also three out of the six SCARs from this cluster (Paran and Michelmore, 1993) were polymorphic (SCI11-1200, SCV12-330 and SCW09-860) ; a codominance was revealed only after cutting with restriction enzymes for two out of these SCAR (SCI11 cut with Mbo1, SCW09 cut with Taq1).

#### *Map of R18*

Polymorphic primers between bulks were used with 85 F<sub>3</sub> families (Table 2b). Scoring was successful for each plant with OPY02, OPA08, OPW09 and three SCARs (SCW09, SCI11 and SCV12). When there were 3 different DNA extractions from the same line, the score was identical with each primer. When electrophoresis was made with mix synergel/agarose, OPV02 could be scored. The recombination values and best fit gene orders were determined using Mapmaker. The markers were in a window of 25 cM. The closest markers were SCW09 at 0.6cM and SCV12 at 2.4cM from R18. A study for some F<sub>3</sub> (Cobham Green x Mariska) lines with probe CL922 was consistent with results with OP and SCARs primers for the recombinations. CL922 was in cosegregation with OPA08.

## CONCLUSION

Grâce à l'utilisation de la BSA et à une connaissance de la carte génétique de la laitue, une localisation assez rapide des 2 gènes de résistance a été possible. La "BSA" permet de trouver des marqueurs quand on ne dispose pas de lignées isogéniques ; il suffit de créer une population en ségrégation pour le caractère à étudier (F2 par exemple). La "BSA" permet de n'étudier, dans un premier temps, que 2 échantillons (mélange d'ADN de 10 à 15 plantes homozygotes sensibles et mélange d'ADN de 10 à 15 plantes homozygotes résistantes). Les polymorphismes obtenus doivent ensuite être contrôlés sur quelques individus homozygotes avant d'étudier chacune des plantes de la population.

Ce travail a montré certaines limites à l'utilisation des RAPD. Plusieurs des marqueurs RAPD obtenus ne sont pas assez faciles à noter ou assez stables (OPT08, OPR13) pour servir comme aide à la sélection. Par contre, les SCARs utilisés ne possèdent pas les inconvénients des RAPD tout en gardant leurs avantages.

En effet les 2 SCARs créés, SCS02-1470 et SCT08-490, sont faciles à noter et codominants après digestion par une enzyme des bandes amplifiées. Ils demandent, comme les RAPDs, peu d'ADN et pas de radioactivité. Ils pourront être utilisés efficacement comme marqueur de résistance dans un programme de cumul de gènes.

La seule limitation à l'utilisation de ces marqueurs en sélection est la lourdeur de leur création. En effet, certaines bandes RAPD sont difficiles à cloner (échec, dans cette étude, avec OPR13-860) ; certains SCARs n'ont pas révélé de polymorphisme (OPW09 avec Calmar et Kordaat) ; la recherche d'enzymes révélant un polymorphisme de type codominant peut être fastidieuse. De plus, tous les SCARs ne se comportent pas en marqueurs codominants. Néanmoins, un SCAR dominant est plus facile à utiliser qu'un marqueur RAPD. En effet, une seule bande est amplifiée lors d'une PCR avec un SCAR ce qui élimine les risques d'erreur de lecture du gel et permet des migrations courtes donc plus rapides. Parmi les premiers SCARs créés à Davis, 9 sont dominants entre Calmar et Kordaat (variétés utilisées pour établir la carte génétique) et 5 sont codominants.

Par conséquent, cette nouvelle famille de marqueurs devrait apporter un progrès intéressant dans la sélection assistée par marquage moléculaire.

Table 1. Bulk segregant analysis to map 2 Downy Mildew resistance factors (R17 in YYD and R18 in Mariska)

Structure of bulks	Segregating population	
	F2 (Girelle x YYD) plants	F3 (Cobham Green x Mariska) lines
	9 r/r vs 15 R/R	19 r/r vs 13 R/R
RAPDs mapped on Dm clusters		
studied number	27	20
giving amplification	27	20
polymorphic between bulks	3	4
linked to new R factor	OPG02-1100	OPA08, OPV02, OPW09, OPY02
Random primers		
studied number	230	0
giving amplification	217	
polymorphic between bulks	14	
linked to new R factor	OPS02, OPT08, OPR13, OPX04, OPO03	
polymorphic between C vs K (a)	OPS02, OPT08, OPO03	
SCARs mapped on Dm clusters		
studied number	4	6
giving amplification	3	6
polymorphic between parents *	0	3 codominant
linked to new R factor		SC11+Mbol, SCW09 +TaqI, SCV12
New SCARs made		
studied number	2	
giving amplification	2	
polymorphic between parents *	2 codominant	
linked to new R factor	SCS02+HaeIII, SCT08+(AluI&MseI)	
polymorphic between C vs K	SCT08	

(a) C=Caimar, K=Kordaat, varieties used to make genetic map in Lactuca  
 \* directly or only after cutting of amplified band with restriction enzyme

Table 2. RAPD markers linked to two resistances to Downy Mildew

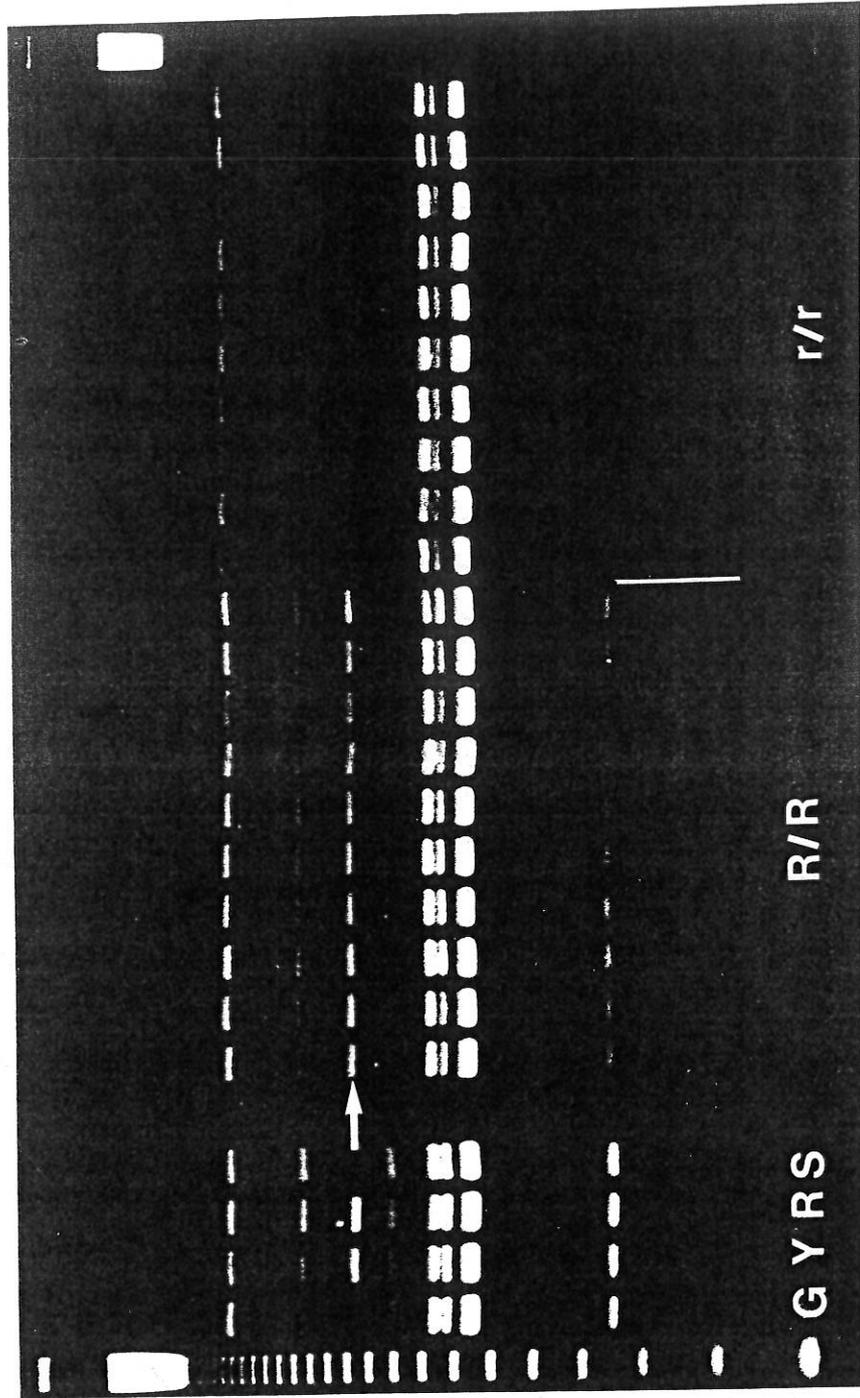
Table 2a - Markers RAPD linked to resistance of YYD (R17)

Primers	OPG02	OPO03	OPR13	OPS02	SCS02	OPT08	SCT08	OPT08	OPX04
Band	1100	1900	860	1450	1450	490	490	1100	1350
Girelle (r/r)	D	A	D	D	A	D	A	A	A
YYD (R/R)	B	C	B	B	B	B	B	C	C
30 F2 r/r	29 D/1 B	24 A/6 C	18 D	29 D/1B	22 A/7 H/1 B	11 D	24 A/3 H/3 B	9 A/1 C	27 A/3 C
67 F2 R/r	58 D/9 B	12 A/55 C	no score	57 D/10 B	7 A/50 H/10 B	22 D/2 B	3 A/60 H/4 B	26 C/3 A	1 A/66 C
35 F2 R/R	5 D/28 B	35 C	20 B	6 D/29 B	1 A/5 H/29 B	15 B	33 B/2 H	15 C	35 C

Table 2b - Markers RAPD linked to resistance of Mariska (R18)

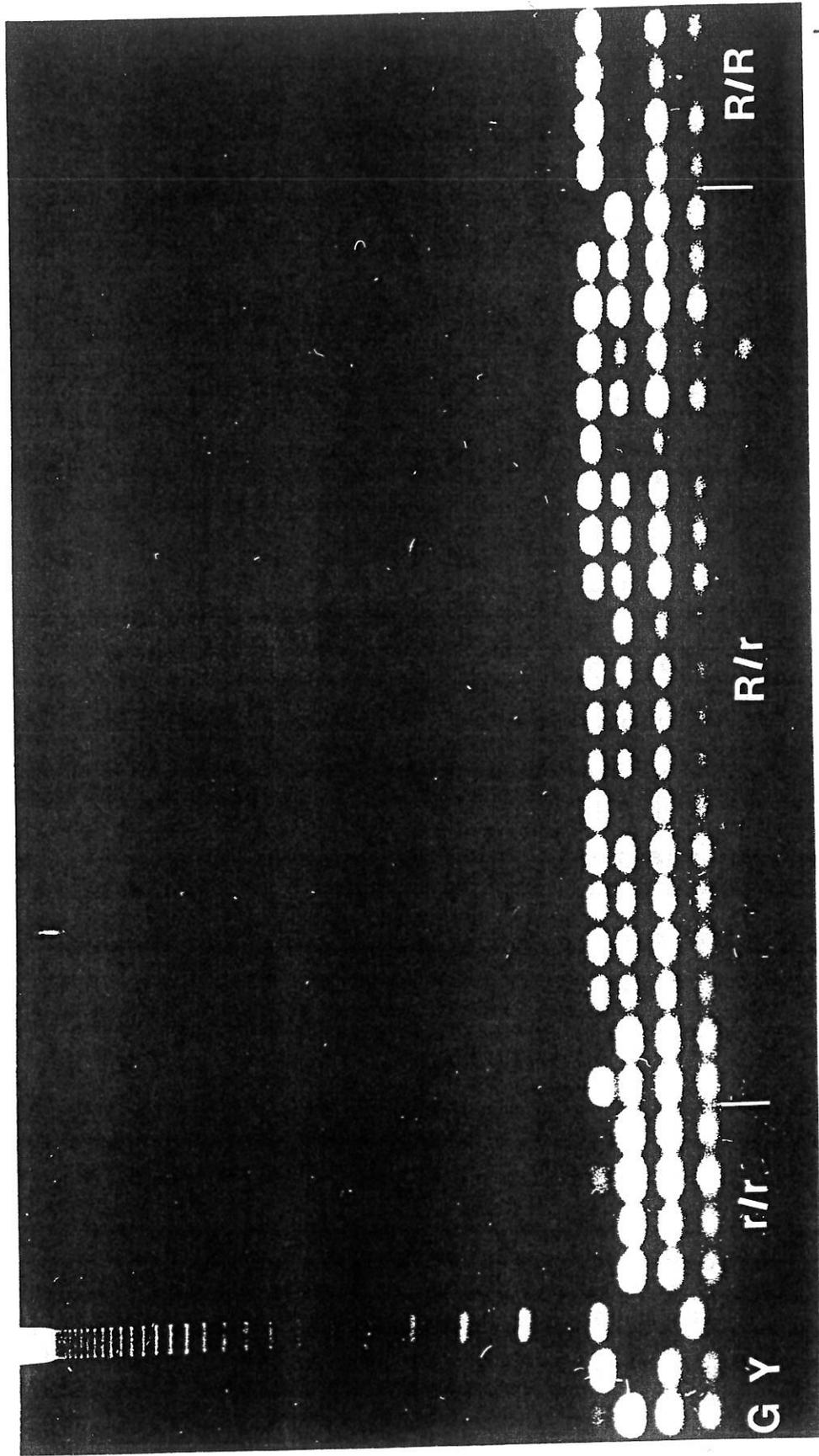
Primers	OPA08	OPY02	OPW09	SCW09	SC11	SCV12	OPV02
Band	1720	1100	980	980	1210	350	1970
Cobham Green (r/r)	A	D	A	A	A	A	A
Mariska (R/R)	C	B	C	B	B	B	C
25 F2 r/r	24 A/1 C	24 D/1 B	25 A	25 A	24 A/1 H	20 A/1 H+4 D	16 A
38 F2 R/r	2 A/36 C	35 D/3 B	38 C	38 H	3 A/34 H/1 B	1 A/34 H+3 D	11 A/13 C
1 R/?	1 C	1 D	1 C	1 H	1 H	1 B	1 C
21 F2 R/R	21 C	8 D/13 B	21 C	1 H/20 B	21 B	1 H/20 B	19 C

# RAPD MARKER LINKED TO DM RESISTANCE FROM LS102



G = parent sensible r/2  
 Y = parent résistant R1A  
 R = bulh des plantes résistantes R1A  
 S = bulh des plantes sensibles r/2

# SCAR MARKER LINKED TO DM RESISTANCE FROM LS102



parents

plants F2

bandes après digestion par des enzymes