

Utilisation des marqueurs moléculaires en sélection

Application à la résistance au striga chez le Niébé

J T. Ouédraogo¹⁻² C A. St-Pierre²

A. Olivier² M P. Timko³

M P. Dubé² F J. Belzile²

C. Dabiré¹

Introduction

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), légumineuse alimentaire, est la source de protéines végétales la plus importante pour les populations d'Afrique subsaharienne. Une des principales contraintes à sa production est la plante parasite *Striga gesnerioides* (Willd.) Vatke, qui cause des pertes de rendement de 30 à 100 % aux variétés sensibles (Aggarwal et Ouédraogo, 1989 ; Muleba *et al.*, 1997). Pour lutter contre cette mauvaise herbe, plusieurs méthodes

ont été expérimentées. L'utilisation de cultivars résistants s'est avé-

¹ Institut de l'environnement et de recherches agricoles (Inera), 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso.

² Département de Phytologie, université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada.

³ Department of biology, university of Virginia, Charlottesville, Virginia 22903, USA.

rée la plus efficace. Des cultivars résistants ont été identifiés (Aggarwal, 1991 ; Singh et Emechebe, 1990 ; Muleba *et al.*, 1996) : Gorom (ou Suvita-2) originaire du Burkina Faso, B301 du Botswana, 58-57 du Sénégal, TN121-80 du Niger, IT81D-994 et IT82D-849 de l'Italie au Nigeria. Malheureusement, l'exploitation de cultivars résistants est limitée par l'existence de plusieurs races physiologiques de striga répertoriées à travers l'Afrique de l'Ouest. Cinq biotypes ou races de *S. gesnerioides* ont été identifiés suite aux résultats des évaluations des cultivars mentionnés plus haut dans différentes localités de plusieurs pays. Ainsi, on retrouve la race 1 au Burkina Faso, au Mali, au Togo et au Nigeria ; la race 2 au Mali ; la race 3 au Niger et au Nigeria ; la race 4 au Bénin ; et la race 5 au Burkina Faso, au Bénin, au Nigeria et au Cameroun. Aucun des cultivars cités plus haut n'est résistant à toutes les races. Gorom, par exemple, est résistant aux races 1, 2 et 4 ; B301 est résistant aux races 1, 2, 3 et 5 (Lane *et al.*, 1997).

Des différentes études réalisées pour élucider les modes d'hérédité de la résistance, il ressort, notamment pour les cultivars résistants Gorom, B301 et IT82D-849, que la résistance à une race particulière est contrôlée par un gène dominant (Aggarwal *et al.*, 1984 ; Singh et Emechebe, 1990 ; Atokple *et al.*, 1995 ; Touré *et al.*, 1997). Atokple *et al.* (1995) ont toutefois montré que le gène de résistance à la race 1 du cultivar Gorom est différent de celui de B301 et de celui de IT82D-849. Ces gènes sont désignés par les sigles Rsg1 pour B301, Rsg2 pour IT82D-849 et Rsg3 pour Gorom.

Un des principaux objectifs des sélectionneurs est d'améliorer les cultivars existants qui manquent d'une ou de plusieurs caractéristiques désirées, en les croisant avec des lignées qui possèdent ces caractéristiques. Dans les schémas conventionnels de sélection, cette opération implique le croisement de génomes entiers, suivi de la sélection des meilleurs recombinants parmi les nombreux produits en ségrégation. Une telle procédure est très longue et laborieuse. Elle demande plusieurs croisements, plusieurs générations et une minutieuse sélection phénotypique. De plus, la liaison étroite

à la disposition des améliorateurs et des généticiens. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs systèmes de marqueurs d'ADN ont été mis au point (Kumar, 1999). On peut citer entre autres la méthode de l'ADN polymorphe amplifié au hasard (Random-Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (Williams *et al.*, 1990), le

Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Botstein *et al.*, 1980), et le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) (Vos *et al.*, 1995). Ces techniques ont grandement contribué à l'établissement de cartes génétiques de liaison pour plusieurs cultures importantes, dont le niébé (Fatokun *et al.*, 1993, 1997 ; Menendez *et al.*, 1997). En combinaison avec l'analyse de ségrégants en mélange (Bulk Segregant Analysis, BSA), une méthode développée par Michelmore

de marqueurs fortement liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* et leur incorporation dans un programme de sélection assistée par marqueurs accroîtrait donc sans doute l'efficacité avec laquelle le germoplasme pourrait être évalué pour la résistance à ce parasite. L'identification de tels marqueurs procurerait également un point de départ pour le clonage et la caractérisation des gènes codant pour la résistance à cette plante.

Parmi les méthodes qui peuvent être utilisées pour ce faire, on retrouve la méthode AFLP, qui passe pour être la technique la plus puissante d'identification de polymorphismes entre des individus. Celle-ci donne toutefois des marqueurs dominants, donc pas très convenables pour les programmes de sélection. Cette faiblesse est heureusement contrecarrée par les techniques de conversion de ces marqueurs en SCAR « Sequence-Characterized Amplified Region ». Les SCAR sont des fragments génomiques amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques obtenues après séquençage des produits RAPD ou AFLP. Ils constituent des marqueurs qui ont l'avantage d'être codominants et peu onéreux (Paran et Michelmore, 1993 ; Lu *et al.*, 1999, 2000 ; Shan *et al.*, 1999), et donc plus propices à un programme de sélection.

En employant les méthodes conventionnelles de sélection, les tentatives de création de cultivars, exempts de caractères génétiques indésirables et résistants aux cinq races de striga, n'ont pas été couronnées de succès. Dans un tel contexte, le développement de marqueurs moléculaires liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* apparaît comme étant impérative en vue de faciliter les efforts de sélection.

Les objectifs de la présente recherche étaient d'identifier les marqueurs AFLP liés aux gènes de résistance et en particulier aux races 1 et 3 de *S. gesnerioides* et d'envisager leur utilisation dans un programme de sélection assistée par marqueurs. Nous rapportons ici l'identification de huit marqueurs fortement liés aux races 1 et 3 de

Matériel et méthodes

Matériel végétal et expérimentation au champ

Le matériel végétal utilisé comprend deux cultivars résistants *S. gesnerioides* et deux sensibles au B301, originaire du Botswana, est résistant aux races 1, 2, 3 et 5 du *Striga*. Tvu 14676, un cultivar mis au point par l'Institut international d'agriculture tropicale (Iita) au Nigeria, est résistant à la race 3. Sa réaction aux autres races n'a pas été testée. Tvx 3236 et IT84S-2246-4, deux lignées développées par l'Iita, sont sensibles aux cinq races de *Striga*.

Un croisement a été effectué entre Tvx 3236 et B301 et un autre a été fait entre IT84S-2246-4 et Tvu 14676. Les individus F_1 ont été avancés en F_2 par autofécondation. La réaction des parents et des individus F_1 et F_2 de chaque population a été testée sur des parcelles infestées de *Striga* de la race 1 à la station de recherche de Kamboinsé, au Burkina Faso, et de *Striga* de la race 3 à l'Iita à Ibadan, au Nigeria. L'émergence du *Striga* a été notée tous les deux jours à partir de trois semaines après le semis et ce jusqu'à la sénescence complète des plantes (120 jours après le semis). Les plantes ont ensuite été déterrées afin de vérifier l'attachement de plants de *Striga* sur les racines. Les plantes qui ont montré l'attachement, le développement et l'émergence du *Striga* ont été considérées comme sensibles. Les plantes indemnes et celles qui ont présenté peu de *Striga* attachés aux racines et n'ont pas permis l'émergence du *Striga* ont été classées comme résistantes. Environ cent cinquante individus F_2 ont été observés pour chaque population. Dans le but de déterminer précisément le génotype de chacun des individus F_2 de chaque population, une famille F_3 de 25 individus (récoltés sur chaque plante F_2) a été testée sous infestation de *Striga*.

Extraction de l'ADN

L'ADN génomique total de 140 individus F_2 de chaque population a été extrait à partir de 2 g de feuille selon la méthode décrite par

Varadarajan et Prakash (1991). Après en avoir déterminé la concentration au spectrophotomètre, les solutions stock d'ADN ont été maintenues à 4 °C. Les solutions de travail sont diluées dans du tampon TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) jusqu'à une concentration de 100 ng/μl et conservées à -20 °C.

Analyses BSA et AFLP

Les bulks de la BSA ont été constitués selon la méthode décrite par Michelmore *et al.* (1991). Quatre bulks de douze individus ont été formés pour chaque population, soit deux bulks composés d'individus F₂ homozygotes résistants et deux bulks composés d'individus F₂ homozygotes sensibles.

Pour l'analyse AFLP, la méthode décrite par Vos *et al.* (1995) a été suivie en utilisant le kit de la compagnie Gibco BRL-Life Technologies, Inc., Gathersburg, Md., USA (AFLP™ Analysis System I AFLP Starter Primer Kit).

Afin d'identifier les marqueurs liés, 64 paires d'amorces EcoRI/MseI ont été testées sur les parents et les bulks des deux populations. Les marqueurs candidats ont été examinés sur l'ensemble des individus F₂ d'une population et les données obtenues ont été soumises à une analyse à l'aide du logiciel Mapmaker 3.0 (Lander *et al.*, 1987). La cartographie a été faite en employant un rapport de maximum de vraisemblance (LOD) de 3,0 et en utilisant la fonction de cartographie de Kosambi (Kosambi, 1944) pour convertir les fréquences de recombinaison en distance cartographique (cM).

Dans le but de situer les marqueurs liés aux gènes de résistance au *Striga* sur la carte génétique du niébé développée par Menendez *et al.* (1997), les paires d'amorces ayant révélé les marqueurs ont été employées pour tester les parents IT84S-2049 et 524B, puis les 88 individus de la population de cartographie. Les marqueurs poly-

morphes entre les deux parents de cette population ont alors été situés sur la carte en utilisant le logiciel Mapmaker 3.0, tel que décrit par Menendez *et al.* (1997).

Résultats

Les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1 de S. gesnerioides

Dans le but d'identifier les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1 de *S. gesnerioides*, deux bulks d'individus homozygotes résistants et deux bulks d'individus homozygotes sensibles de la population issue du croisement Tvx 3236 x B301 ont été testés avec

paire d'amorce variait de 58 à 112. Le nombre moyen de différences entre les deux parents était de 15 et variait en fonction de la paire d'amorce. La taille des fragments allait de 65 à 700 paires de bases.

Quatre paires d'amorces EcorI/MseI ont détecté des polymorphismes entre le parent résistant et le parent sensible, d'une part, et entre les bulks résistants et sensibles, d'autre part. Le combinaison

Mapmaker 3,0 a montré que les cinq marqueurs appartenaient au même groupe de liaison. Les distances cartographiques entre les marqueurs et le locus de résistance *Rsg1* du cultivar B301 sont de 1,7 cM pour 11S, 2,6 cM pour 34S, 3,6 cM pour 41R, et 0,9 cM pour 111R et 111S (fig. 1 A). Ces marqueurs couvrent une distance totale de 6,2 cM.

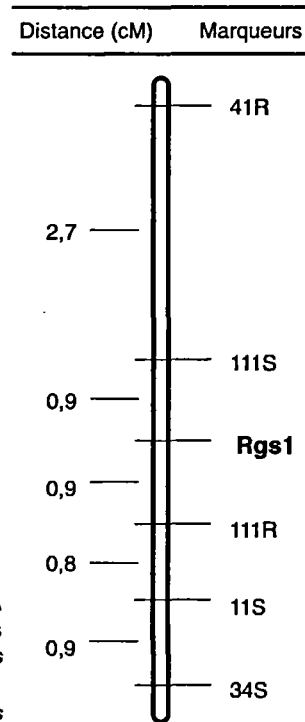


Figure 1 A
Cartographie des marqueurs liés
aux gènes de résistance au *S. generioides*
- marqueurs liés au gène *Rsg1*
de résistance à la race 1 de *S. generioides*

*Les marqueurs liés au gène de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides**

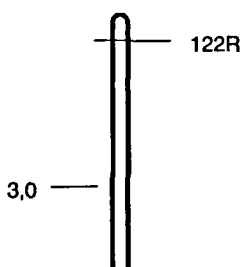
En procédant de la même manière que celle décrite pour identifier les marqueurs liés au gène de résistance à la race 1, 64 paires d'amorces ont été testées sur les parents et les bulks d'individus issus du croisement entre IT84S-2246-4 et Tvu 14676 afin de trou-

ver des marqueurs liés au gène de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides*.

Quatre combinaisons ont mené à l'identification de cinq marqueurs

d'amorces E-AAC/M-CAA et E-ACA/M-CAT ont révélé les marqueurs 11S et 34S comme étant liés au gène de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides*. Le troisième marqueur de sensibilité, 115S (200 pb), a été identifié à l'aide de la paire d'amorce E-ATC/M-CTA (paire 11-5). Les deux marqueurs de résistance 115R (210 pb) et 122R (600 pb) ont été identifiés avec les amorces E-ATC/M-CTA et E-ATG/M-CAC (paire 12-2). Tous ces marqueurs sont dominants, montrent une ségrégation mendélienne (3:1) et appartiennent au même groupe de liaison. Les distances entre ces marqueurs et le locus de résistance à la race 3 de *S. gesnerioides* du cultivar de niébé Tvu 14676 sont de 1,7 cM pour 11S, 2,6 cM pour 34S et 115S, 0,9 cM pour 115R et 3,0 cM pour 122R (fig. 1 B). Ces marqueurs couvrent une distance totale de 5,6 cM.

Distance (cM)	Marqueurs
---------------	-----------



Placement des marqueurs sur la carte génétique du niébé

En vue de situer les marqueurs sur la carte génétique du niébé

développé par Mendonça et al. (1997). Les marqueurs sont

Michelmore et Meyers, 1998 ; Ronald, 1998). Ronald (1998) et Ashfield *et al.* (1995) ont également montré que de tels complexes de gènes de résistance pouvaient être efficaces contre différents types de pathogènes. D'après nos résultats, le génome du niébé pourrait contenir un complexe de gènes de résistance comprenant plusieurs gènes de résistance à plusieurs races de *S. gesnerioides*. Certains des marqueurs identifiés pourraient donc être utilisés pour analyser d'autres populations en ségrégation pour leur résistance à d'autres races de *S. gesnerioides*. C'est le cas de la race 2 que l'on retrouve essentiellement au Mali, de la race 4, existant au Bénin et de la race 5, retrouvée au Burkina Faso, au Niger, au Nigeria et au Cameroun (Lane *et al.*, 1997).

Nos marqueurs sont soit liés à l'allèle de sensibilité, soit liés à l'allèle de résistance. Quoique dominants, ceux liés à l'allèle de résistance sont aussi efficaces que des marqueurs codominants dans un programme de backcross. Ils peuvent permettre de déterminer la présence ou l'absence de l'allèle de résistance. Pour les deux gènes considérés, Rsg1 et Rsg4, des marqueurs flanquants ont été identifiés. En outre, la possibilité de localiser plusieurs marqueurs liés aux gènes de résistance aux différentes races de *S. gesnerioides* devrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance et ouvrir la voie au clonage de ces gènes. L'identification de ces marqueurs ouvre donc plusieurs perspectives pour la lutte contre cette plante parasite.

Ce type de marqueurs est particulièrement efficace dans un programme de sélection assistée de marqueurs (MAS) (Eathington *et al.*, 1997 ; Michelmore, 1995 ; Staub *et al.*, 1996 ; Tanksley et McCouch, 1997). Basée sur le concept de l'inférence du génotype de l'individu à partir de celui du marqueur, la MAS a pour principal critère la liaison étroite entre le marqueur et le gène d'intérêt. Avec des marqueurs flanquants, il faut une double recombinaison (événement rare) entre le gène et les deux marqueurs pour sélectionner un faux positif (c'est-à-dire prendre une plante sensible pour une résistante). Pour rendre la MAS plus facile et moins coûteuse, nous travaillons à la transformation des marqueurs AFLP en marqueurs SCAR. Ces marqueurs sont révélés par une simple amplification PCR et une électrophorèse sur gel d'agarose. Pour les laboratoires des pays en développement dans lesquels l'utilisation

des techniques faisant appel à la radioactivité est exclue, ces marqueurs SCAR sont une solution de premier choix. Ils ont en outre l'avantage d'être codominants, donc permettent de distinguer les individus homozygotes résistants des hétérozygotes et des homozygotes sensibles.

Les marqueurs d'ADN ont été utilisés pour le développement de cartes de liaison génétique détaillées chez plusieurs plantes (Chang et Meyerowitz, 1991 ; Jung, 1992 ; Mohan *et al.*, 1997). Pour utiliser les innombrables polymorphismes, révélés par les marqueurs AFLP, comme des marqueurs génétiques, il est nécessaire de connaître leur localisation dans le génome du niébé. Une carte intégrant plusieurs types de marqueurs a été produite par Menéndez *et al.* (1997). Ces marqueurs peuvent alors servir à repérer des gènes d'intérêt agronomique (Mohan *et al.*, 1997 ; Kumar, 1999). En vue de contribuer à la saturation de cette carte qui contient 181 marqueurs dont 25 AFLP, nous allons placer environ 250 marqueurs AFLP parmi lesquels une dizaine sont liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* identifiés à partir de cinq cultivars résistants.

Une des perspectives les plus importantes qu'offrent nos marqueurs liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* est le clonage de ces gènes. La méthode conventionnelle de clonage exige une connaissance préalable des caractéristiques biochimiques du gène ou de ses produits, de son ARNm etc. Le clonage basé sur la carte génétique, ou clonage positionnel, ne requiert la connaissance préalable ni du gène ni de ses produits. Cette stratégie nécessite seulement que l'on connaisse la localisation chromosomique du gène dont l'identification de marqueurs liés constitue la première étape (Young, 1990 ; Wicking et Williamson, 1991 ; Collins, 1992). Certains des marqueurs liés aux gènes de résistance au *S. gesnerioides* que nous avons identifiés seront situés sur la carte génétique du niébé développée par Menéndez *et al.* (1997). Ils serviront alors de point de départ au clonage du ou des gènes de résistance au *S. gesnerioides*. Ce travail sera effectué dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut de l'environnement et de recherches agricoles (Inera) du Burkina Faso, l'université de Virginie aux États-Unis et l'université Laval au Canada. Le clonage ouvrira la voie au transfert par trans-

d'excellente valeur agronomique. La transformation du niébé est de nos jours une procédure de routine selon les travaux effectués par exemple à l'Iita.

Si beaucoup d'efforts ont été consacrés à la recherche sur les gènes de résistance du niébé, très peu a par contre été entrepris pour mieux connaître la génétique de la plante parasite elle-même. La connaissance des variations intraspécifiques reste à approfondir. Les différentes populations devront être mieux caractérisées. Les cinq différentes races n'ont fait l'objet d'études, ni du point de vue de la structure des différentes populations ni du point de vue de la diversité génétique. Des études antérieures conduites par Olivier *et al.* (1998) ont permis de mieux caractériser plusieurs populations de *Striga hermonthica*, parasite de plusieurs cultures céréalières (sorgho, mil, maïs, riz et canne à sucre). Un projet est maintenant en voie de réalisation dans le but de mieux caractériser les différentes races de *S. gesnerioides*.

Conclusion

En utilisant les techniques AFLP et BSA, plusieurs marqueurs fortement liés aux gènes de résistance aux races 1 et 3 de *S. gesnerioides* ont été identifiés.

Ces marqueurs seront transformés en SCAR afin d'être utilisés dans un programme de sélection assistée par marqueurs.

Un de ces marqueurs a été situé sur le premier groupe de liaison de la carte génétique du niébé et constitue de ce fait un point de départ pour le clonage des gènes de résistance. La réalisation de ce clonage conduira au transfert par transgénèse de la résistance aux cultivars d'intérêt agronomique, mais sensibles au *S. gesnerioides*.

Enfin, des études sur les différentes races de *S. gesnerioides* per-

Bibliographie

- Aggarwal VD 1991 —
Research on cowpea-*Striga* resistance at IITA. In Combating *Striga* in Africa, Proceedings of the International Workshop Organized by IITA, ICRISAT, and IDRC. Kim SK ed. IITA, Ibadan, Nigeria 22-24 August 1988. pp 90-95.
- Aggarwal VD, Ouédraogo JT 1989 —
Estimation of cowpea yield loss from *S. gesnerioides* infestation. *Tropical Agric* 66 : 91-92.
- Aggarwal VD, Muleba N, Drabo I, Souma J, Mbewe M 1984 —
Inheritance of *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. In Proceedings of the 3rd International Symposium on Parasitic Weeds. Parker C, Musselman LJ, Polhill RM, Wilson AK eds. Icarda, Aleppo, Syria 7-11 May 1984. pp 143-147.
- Ashfield T, Keen NT, Buzzell RI, Innes RW 1995 —
Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the *Ppg1* locus. *Genetics* 141 : 1597-1604.
- Atokple IDK, Singh BB, Emechebe AM 1995 —
Genetics of resistance to *Striga* and *Alectra* in cowpea. *J Heredity* 86 : 45-49.
- Botstein D, White RL, Skolnik M, Davis RW 1980 —
Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Human Genet* 32 : 314-331.
- Chang C, Meyerowitz EM 1991 —
Plant genome studies, restriction fragment length polymorphism and chromosome mapping information. *Curr Opin Genet Dev* 1 (1) : 112-118.
- Collins FS 1992 —
Positional cloning, let's not call it linkage anymore. *Nat Genet* 1 : 2-6.
- Eathington SR, Dudley JW, Rufener GK II 1997 —
Usefulness of marker-QTL associations in early generation selection. *Crop Sci* 37 : 1686-1693.
- Fatokun CA, Danesh D, Menancio-Hautea D, Young ND 1993 —
A linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) based on DNA markers. In A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms, Genetic maps. O'Brien JS ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp 6.256-6.258.
- Fatokun CA, Young ND, Myers GO 1997 —
Molecular markers and genome mapping in cowpea. In Advances in Cowpea Research. Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN eds. Sayce Publishing, Devon, UK. pp 352-360.
- Jung C 1992 —
Utilization of RFLP markers in plant breeding. *Adv Mol Genet* 5 : 101-117.
- Kelly JD, Miklas PN 1998 —
The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol Breed* 4 : 1-11.
- Kosambi DD 1944 —
The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics* 12 : 172-175.
- Kumar LS 1999 —
DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Adv* 17 : 143-182.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M, Lincoln SE, Newburg L 1987 —
Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental

and natural populations.
Genomics 1 : 174-181.

Lane JA, Child DV, Reiss GC,
Entcheva V, Bailey JA 1997 —
Crop resistance to parasitic plants.
In *The gene-for-gene relationship*

Michelmore RW,
Paran I, Kesseli RV 1991 —
Identification of markers linked to
disease-resistance genes by bulked
segregant analysis: a rapid method
to detect markers in specific genomic

- sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor Appl Genet* 98 : 1072-1078.
- Simpson J 1999 — Molecular markers for crop improvement. *In* *Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. Paredes-Lopez O ed. Lancaster, PA, USA pp 275-301.
- Singh BB, Emechebe AM 1990 — Inheritance of *Striga* resistance in cowpea genotype B301. *Crop Sci* 30 : 879-881.
- Staub JE, Serquen FC, Gupta M 1996 — Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31 (5) : 729-741.
- Tanksley SD, McCouch SR 1997 — Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277 : 1063-1066.
- Touré M, Olivier A, Ntare BR, Lane JA, St-Pierre C-A 1997 — Inheritance of resistance to *Striga gesnerioides* biotypes from Mali and Niger in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica* 94 : 273-278.
- Varadarajan GS, Prakash CS 1991 — A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Mol Biol Reporter* 9 : 6-12..
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M 1995 — AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23 : 4407-4414.
- Wicking E, Williamson B 1991 — From linked marker to gene. *Trends Genet* 7 : 288-293.
- 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.
- Young ND 1990 — Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiol Mol Plant Pathol* 37 : 81-94.