

# Les marqueurs moléculaires, applications à l'amélioration des espèces fruitières.

P. OLLITRAULT\*

## MOLECULAR MARKERS, APPLICATIONS TO FRUIT IMPROVEMENT.

P. OLLITRAULT.

*Fruits*, May 1989, vol. 44, n° 5, p. 243-251.

**ABSTRACT** - The main techniques for analyzing molecular polymorphism (polyphenols, isozymes, total protein and DNA restriction fragment) are described briefly. Their value and limits to their use for managing genetic resources and improving fruit crops are then discussed, on the basis of a bibliographical summary.

## LES MARQUEURS MOLECULAIRES, APPLICATIONS A L'AMELIORATION DES ESPECES FRUITIERES.

P. OLLITRAULT.

*Fruits*, May 1989, vol. 44, n° 5, p. 243-251.

**RESUME** - Les principales techniques d'analyse du polymorphisme moléculaire (polyphénols, isozymes, protéines totales, fragment de restriction de l'ADN) sont décrites succinctement. L'intérêt et les limites de leur utilisation pour la gestion des ressources génétiques et l'amélioration des espèces fruitières sont ensuite discutés, sur la base d'une synthèse bibliographique.

La définition des stratégies de gestion des ressources génétiques et l'établissement des schémas d'amélioration repose sur une connaissance préalable de l'organisation génétique des espèces travaillées. La longueur des périodes juvéniles, l'encombrement des descendances et parfois les contraintes des régimes de reproduction ont grandement limité la connaissance génétique des espèces fruitières pérennes. Pour ces espèces plus que pour toute autre, il est donc séduisant de rechercher au niveau moléculaire des variables descriptives de l'organisation génétique, ou prédictives des caractères phénotypiques.

De l'ADN aux caractères phénotypiques, l'analyse de la diversité peut aujourd'hui se faire à différents niveaux (figure 1). La variation biochimique peut ainsi être divisée en trois types (MASTENBROEK et VAN BREDERODE, (1986).

- variabilité des métabolites secondaires (polyphénols, arômes, etc.), analysées par chromatographie,
- variabilité des protéines (enzymes inclus), étudiées par électrophorèse,
- variabilité des brins d'ADN analysés par le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP).

Si tous ces niveaux dépendent des variations génétiques, le dernier reflète directement les bases génétiques de la différenciation, tandis que les phénomènes d'adaptation et de régulation sont fortement impliqués dans le premier.

Nous allons décrire succinctement les techniques d'analyse de ces différents niveaux d'expression de la variation génétique, ainsi que leurs intérêts pour l'amélioration variétale des espèces fruitières.

## LES POLYPHENOLS

Parmi les molécules du métabolisme secondaire, les polyphénols se sont avérés les plus intéressants pour le marquage moléculaire dans une optique phylogénétique. Deux grandes classes y sont distinguées en fonction de leur squelette de base : les acides phénols et les flavonoïdes.

Les polyphénols présentent une diversité structurale très importante et se distribuent différemment suivant les types botaniques. A l'intérieur de chaque classe, cette diversité s'organise par rapport :

- au type de squelette (figure 2a),
- à la position et la nature des substitutions (figure 2b),
- aux modes de conjugaison (figure 2c).

L'analyse de ces composés par chromatographie (sou-

\* - Station de Recherche Agronomique INRA-IRFA San Giuliano - 20230 SAN NICOLAIO (Haute Corse).

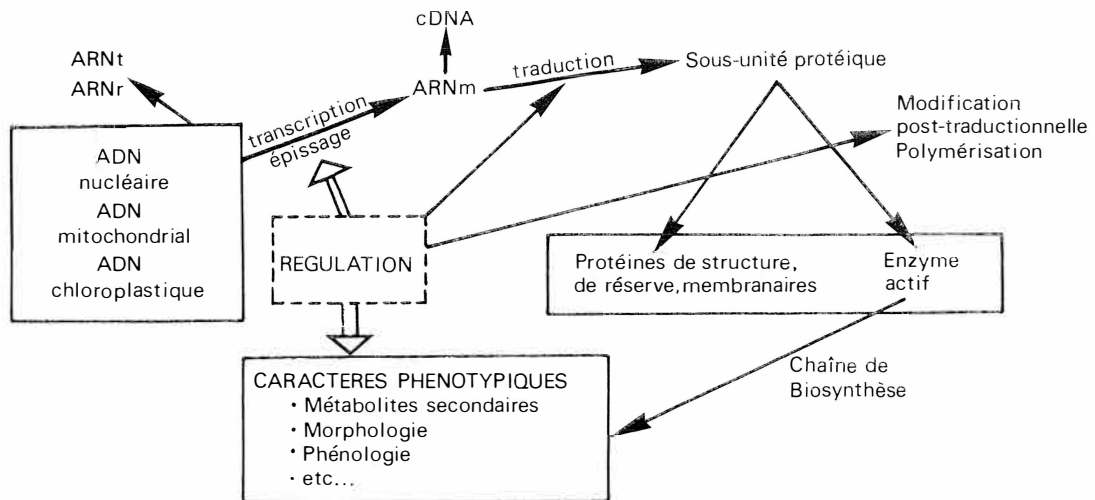


FIGURE 1 \* LES TROIS NIVEAUX D'EXPRESSION DE LA VARIATION GENETIQUE.

vent HPLC) permet d'établir pour chaque individu, un phénotype polyphénolique déterminé par des gènes de structure pour la qualité des édifices moléculaires et sur des processus de régulation pour les quantités relatives des différentes molécules. La synthèse de ces molécules pouvant être régulée en fonction du stade de développement et des conditions environnementales, il convient d'homogénéiser au maximum ces deux paramètres pour les études phylogéniques.

L'inférence phylogénétique se fait à trois niveaux emboîtés :

- les données sur les types de squelettes accumulés dans chaque classe (figure 2a) permettent en liaison avec les règles de l'évolution moléculaire (HARBORNE, 1977 ; YOUNG et STERNER, 1981) d'établir une hiérarchisation évolutive des taxons analysés. Ces règles ont en effet permis de reconnaître en certains squelettes un caractère ancestral et en d'autre un signe d'évolution (ainsi, les flavonols et les proanthocyanes illustrent l'ancestralité tandis que les flavones témoignent d'un réel avancement évolutif ; RICHARDSON et YOUNG, 1982).

- le nombre et la position des substituants du squelette, et en particulier ceux du noyau B, permettent également de hiérarchiser évolutivement les taxons. Ainsi, pour les flavonols (figure 2b) et les proanthocyanes, il est classiquement admis que l'évolution aurait procédé par une réduction progressive du nombre de substitution (BAHRMAN *et al.*, 1985).

- Enfin, l'analyse du mode de conjugaison du squelette donne des informations sur l'intervention de systèmes enzymatiques parfois séquentiels (figure 2c) et peut permettre d'évaluer des distances «génétiques» intervariétales.

L'analyse de la diversité polyphénolique apporte donc une dimension dynamique aux études phylogéniques. Elle présente toutefois l'inconvénient de reposer sur des molécules de relation, directement soumises aux phénomènes de sélection et d'adaptation. Les différenciations observées à leurs niveaux ne reflètent donc pas la divergence génétique globale entre les entités analysées. De plus, l'interprétation

phylogénétique doit prendre en compte les possibilités d'évolution convergente et de régression.

Très en vogue dans les années 1960, l'étude du polymorphisme polyphénolique s'est souvent limitée à des aspects descriptifs généralement à des fins taxonomiques (SIMMONDS, 1954 ; ALBACH et REDMAN, 1969 ; PONTIKIS *et al.*, 1980 ; KAJIURA *et al.*, 1983) mais également pour la détection d'hybrides et d'embryons nucléaires ou zygotiques chez les Citrus (TATUM *et al.*, 1974). L'approche biogénétique ne s'est réellement développée qu'à la fin des années 1970 (SALEH, 1979 ; GOTTSBERGER et GOTTLIEB, 1981 ; RICHARDSON et YOUNG, 1982 ; FIASSON *et al.*, 1987 ; HERRY et JAY, 1988).

## LES ISOZYMES

Les isozymes sont avec les polyphénols les premiers marqueurs moléculaires à avoir été étudiés. Ils sont classiquement séparés, en fonction de leur charge et de leur masse moléculaire, par électrophorèse de zone. Leur révélation est ensuite réalisée en incubant le gel dans une solution contenant les substrats et cofacteurs spécifiques de l'enzyme ; la catalyse enzymatique est couplée à l'oxydoréduction d'un colorant.

La nature codominante de la majorité des allèles et les règles simples d'analyse des zymogrammes (figure 3) permettent généralement d'interpréter génétiquement les variations observées. Cette interprétation est primordiale pour toutes les utilisations autres que la simple identification variétale.

La très forte diversité enzymatique mise en évidence dans les années 1960 a donné lieu à des débats passionnés sur la nature et la signification du polymorphisme enzymatique. L'absence d'effets phénotypiques et de valeurs adaptatives différentielles de la majorité des allozymes (KIMURA, 1983) est aujourd'hui généralement admise.

Ce caractère «neutre» des isozymes rend bien compte

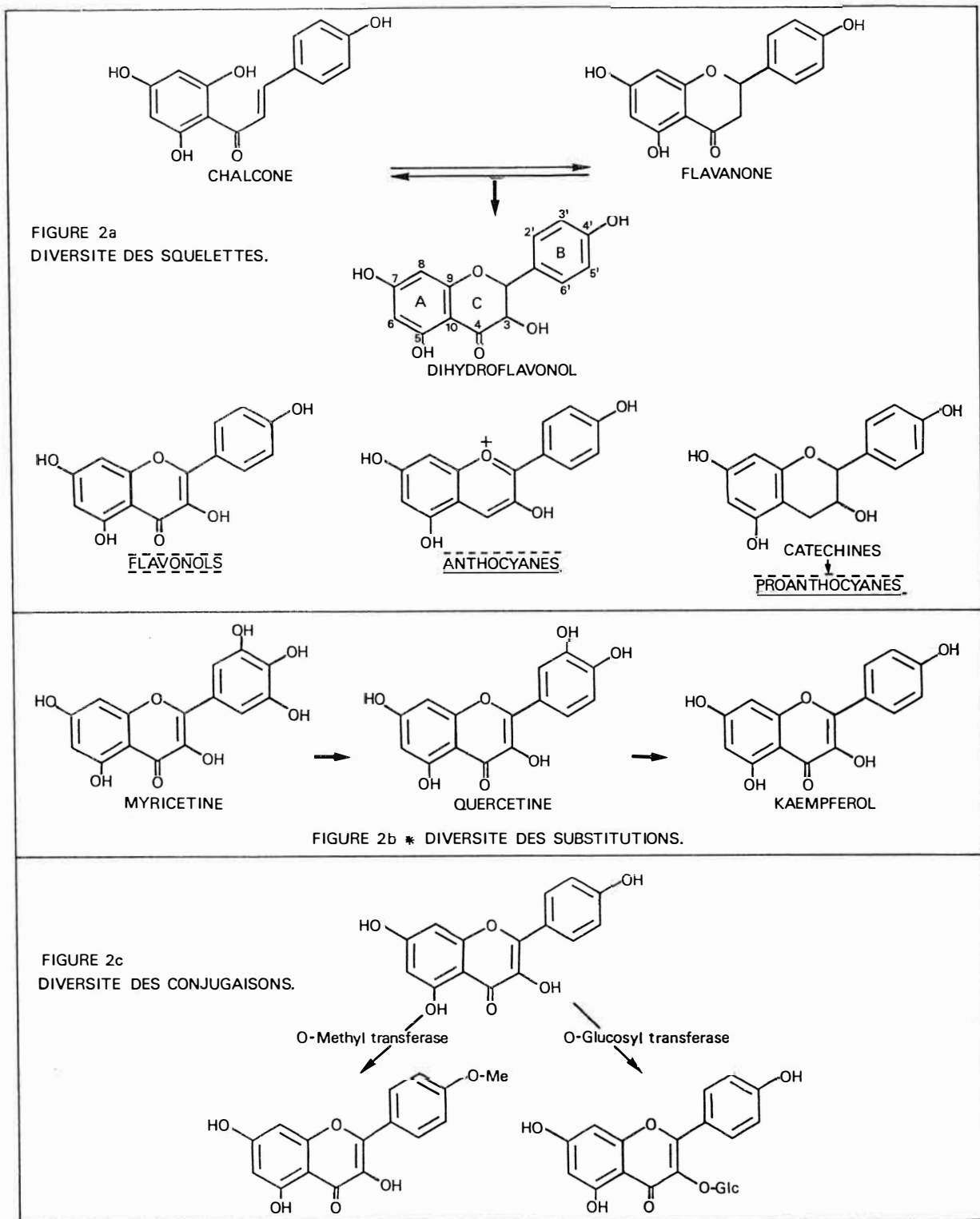


FIGURE 2 \* LES TROIS NIVEAUX D'ANALYSES DE LA DIVERSITE POLYPHENOLIQUE.

du nombre restreint d'exemples recensés de liaisons entre les variations phénotypiques et enzymatiques, et du fait que celles-ci sont très rarement imputables aux rôles métaboliques des isozymes dans l'établissement du phénotype (cf LEFORT BUSON et DE VIENNE, 1985 pour revue).

Les meilleures corrélations sont observées pour des espèces autogames (DAMERVAL et DE VIENNE, 1985) ou au sein de familles consanguines (FREY *et al.*, 1986).

Les isozymes se comportent en effet comme des marqueurs de segments chromosomiques et les corrélations avec les caractères phénotypiques dépendent des déséquilibres gamétiques entre les gènes déterminant ces caractères, et ceux codant pour les isozymes. Il est clair que tous les facteurs limitant la recombinaison (forte liaison génétique, autogamie, consanguinité, et à l'extrême apomixie) favorisent le maintien de tels déséquilibres gamétiques.

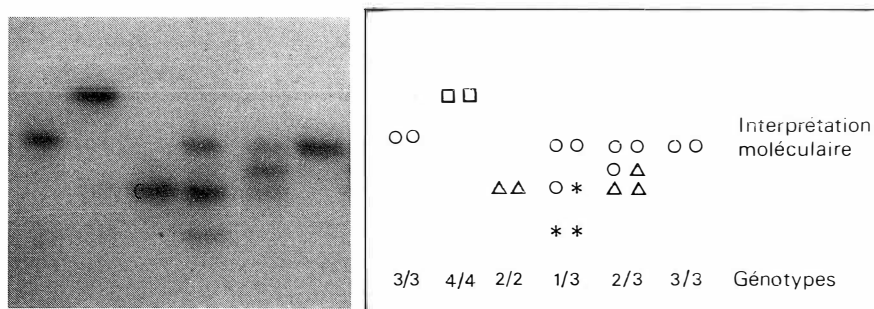


Fig. 3a \* Exemple d'enzyme dimérique : les isocitrate déshydrogénases de Citrus.

### FIGURE 3 \* REGLES D'INTERPRETATION DES ZYMOGRAMMES.

Les isozymes présentent donc deux intérêts majeurs pour les généticiens :

- leur «neutralité» vis-à-vis de la sélection permet :

- d'évaluer des divergences génétiques entre cultivars ou taxons (notions de distances génétiques et d'horloge moléculaire) ;
- d'analyser les structures des populations (hétérozygoties, déséquilibres gamétiques) en relation avec les systèmes de reproduction ;

- le marquage de segments chromosomiques peut permettre la sélection précoce, dans des descendance contrôlée, de gènes d'intérêts agronomiques liés à ceux codant pour les isozymes. Dans ce cadre les principaux handicaps de l'électrophorèse d'enzyme sont la détection limitée des mutations et le nombre restreint de locus polymorphes mis en évidence. Les espèces les mieux étudiées ne présentent, en effet que 30 (tomate ; RICK, 1983) à 40 (maïs ; GOODMAN et STUBER, 1983) locus polymorphes.

De nombreuses études de polymorphisme enzymatique ont été réalisées chez les espèces fruitières.

L'identification variétale et la taxonomie ont été des préoccupations importantes :

- Avocatier : TORRES et BERGH, 1980.
- Bananier : HARRY, 1989.
- Citrus : TORRES *et al.*, 1978 et 1982.
- Figuier : VALDEYRON et VALIZADEH, 1976 ; VALIZADEH *et al.*, 1977.
- Manguier : GAN *et al.*, 1981.
- Olivier : PONTIKIS *et al.*, 1980.
- Pommier : CHEVREAU, 1984 ; WEEDEN et LAMB, 1985 ; MENENDEZ *et al.*, 1986.

L'origine des plants de semis a également été analysée par électrophorèse d'enzymes :

- Avocatier : TORRES et BERGH, 1980.
- Citrus (détection zygotique/nucellaire) : TORRES *et al.*, 1978 et 1982 ; ORTIZ *et al.*, 1981 ; KHAN et ROOSE, 1988.
- Pommier : CHEVREAU, 1984.
- Hybrides prunier/pêcher : PARFITT et ARULSEKAR, 1985.

Les isozymes ont également été utilisés pour contrôler des hybridations somatiques (fusions de protoplastes) chez les agrumes (BEN HAYYIM *et al.*, 1982).

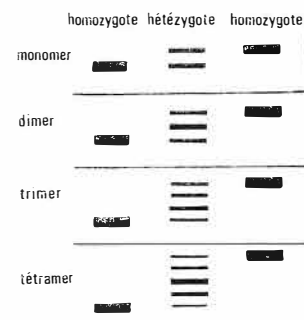


Fig. 3b\* Zymogrammes observés en fonction du degré de polymérisation de l'enzyme.

Notons enfin deux exemples de liaisons génétiques entre des gènes codant pour les isozymes et ceux déterminant un caractère phénotypique intéressant :

Pommier : liaison entre un locus codant pour une aspartate transaminase et un locus d'incompatibilité gamétophytique (gène S), MANGANARIS et ALSTON, 1987.

Figuier : liaison entre le gène déterminant le sexe et un locus de peroxidase, VALIZADEH, 1978.

En revanche, conformément à ce qui a été dit précédemment sur la nature du polymorphisme enzymatique, les diverses tentatives d'identification de mutants morphologiques ou physiologiques se sont révélées infructueuses.

## LES PROTEINES TOTALES

Les techniques d'analyse du polymorphisme au niveau protéique sont l'électrophorèse de zone (cf isozymes), l'isoélectrofocalisation et l'électrophorèse bidimensionnelle.

### L'isoélectrofocalisation (IEF).

C'est une technique d'électrophorèse «à l'équilibre» qui permet de séparer des protéines (ou d'autres molécules amphotères), dans un gradient de pH, uniquement en fonction de leur point isoélectrique. Elle est réalisée sur des gels d'acrylamide à faible concentration, les protéines sont révélées soit au bleu de comassie, soit au nitrate d'argent.

Cette technique est surtout exploitée pour l'identification de cultivars chez les céréales par l'analyse des protéines de réserves du grain (AUTRAN et ABBAL, 1986) ; elle a également été utilisée avec succès pour l'identification d'espèces fruitières (pêcher, CARTER et BROCK, 1980 ; Citrus, HANDA *et al.*, 1986).

Du fait de la complexité des électrophorégrammes obtenus l'interprétation génétique des variations, et par là même leur utilisation comme marqueur génétique, restent très limitées.

### Electrophorèse bidimensionnelle.

Cette technique combine :

- une IEF en première dimension qui permet de séparer les

protéines suivant leur point isoélectrique ;

- une électrophorèse de zone en condition dénaturante en deuxième dimension qui sépare les protéines (sous forme de complexe SDS-protéines) selon leur poids moléculaire.

L'analyse des électrophorogrammes prend en compte la position et l'intensité des spots obtenus (plusieurs centaines) :

. De légers déplacements de spots dans le sens de l'IEF sont attribués à des variations alléliques.

. Des positions différentes suivant la dimension SDS sont généralement attribuées à des gènes différents. Il peut toutefois exister des cas d'allélisme par addition ou délétion d'acides aminés neutres ou de substitution d'acides aminés sans modification de charge.

. Les variations d'intensité des spots sont assignées à des éléments génétiques qui contrôlent l'expression des gènes de structure au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel. Il peut cependant exister pour les espèces polyploïdes une ambiguïté entre phénomènes de régulation et dosages alléliques différents.

L'électrophorèse bidimensionnelle présente vis-à-vis de l'électrophorèse classique d'enzymes des intérêts indéniables, puisqu'elle permet d'étudier un nombre de gènes nettement plus élevé et de deux natures différentes : gènes de structure et systèmes de régulation dont les effets se manifestent au niveau de l'expression des gènes de structure et des modifications de leurs produits.

Ce dernier point revêt un intérêt tout particulier pour la recherche de marqueurs moléculaires de la variation phénotypique. En effet, il semble que les systèmes de régulations (qui présentent une variabilité importante), sont impliqués prioritairement dans la diversification phénotypique et l'adaptation (WILSON *et al.*, 1977 ; DAMERVAL *et al.*, 1987). L'étude des régulations au niveau protéique, dont on peut penser qu'il intègre l'ensemble des variations significatives de l'ADN et seulement elle, apparaît donc être une approche pertinente de l'analyse des relations phénotypes-génotypes (DE VIENNE, 1984).

Toutefois le coût de cette technique et la lourdeur de son exploitation la cantonnent encore aux recherches fondamentales.

### LES RFLP

L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction est une technique de marquage génétique récente.

Après isolement, l'ADN est découpé par des enzymes de restriction reconnaissant des séquences de 4 à 6 bases.

Les fragments de restriction ainsi obtenus sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose.

Une coloration au bromure d'éthidium permet de visualiser l'électrophorogramme de restriction par fluorescence ultraviolette. Dans la pratique, 20 à 40 fragments

sont isolés à partir des génomes chloroplastiques, et une centaine à partir des génomes mitochondriaux.

Le génome nucléaire, trop important, produit un voile continu où il n'est pas possible d'observer de bandes discrètes. Il est alors nécessaire d'utiliser des sondes marquées (gènes ou séquences d'ADN isolées de façon aléatoire, clonés dans des plasmides bactériens) qui se fixent sur les séquences homologues de l'électrophorogramme. Les sondes peuvent être marquées radioactivement ou bien être révélées par l'intermédiaire d'une réaction enzymatique (sondes froides).

Pour le marquage génétique, il convient d'utiliser des sondes correspondant à des séquences uniques de l'organisme étudié.

Deux grands types de banque de sondes peuvent être distingués suivant les fragments d'ADN clonés :

- Les banques génomiques.

Elles renferment des fragments de restriction isolés de façon aléatoire par digestion enzymatique de l'ADN total. Elles sont donc constituées aussi bien de séquences codantes que non codantes, permettant ainsi d'explorer la totalité du génome.

- Les banques de cDNA.

Le cDNA, obtenu *in vitro* par une succession de réactions enzymatiques, est la copie d'un ARN messenger. Une banque de cDNA est donc une banque de gènes au sens propre qui ne peut explorer que les zones codantes du génome.

Les diagrammes de restriction obtenus permettent de distinguer des plantes qui diffèrent par des mutations affectant :

- un des sites de restriction quelconque de l'enzyme si l'on révèle l'ADN total,
- un des sites de restriction encadrant les séquences homologues de la sonde marquée.

L'utilisation de plusieurs enzymes de restriction permet d'explorer les variations dans les zones encadrant les séquences homologues des sondes (figure 4).

La lecture et l'interprétation d'électrophorogrammes de restriction révélés par des sondes homologues de séquences uniques s'apparente à celles des zymogrammes d'enzymes monomères. On peut ainsi distinguer des structures homozygotes et hétérozygotes.

Le polymorphisme révélé par cette technique est important et variable suivant les espèces (HELENTJARIS *et al.*, 1985). Comme pour les allozymes, on peut penser que la majorité des variations mises en évidence sont sans effet phénotypique direct. Les thèmes d'étude abordés grâce au polymorphisme enzymatique peuvent donc également l'être par le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction.

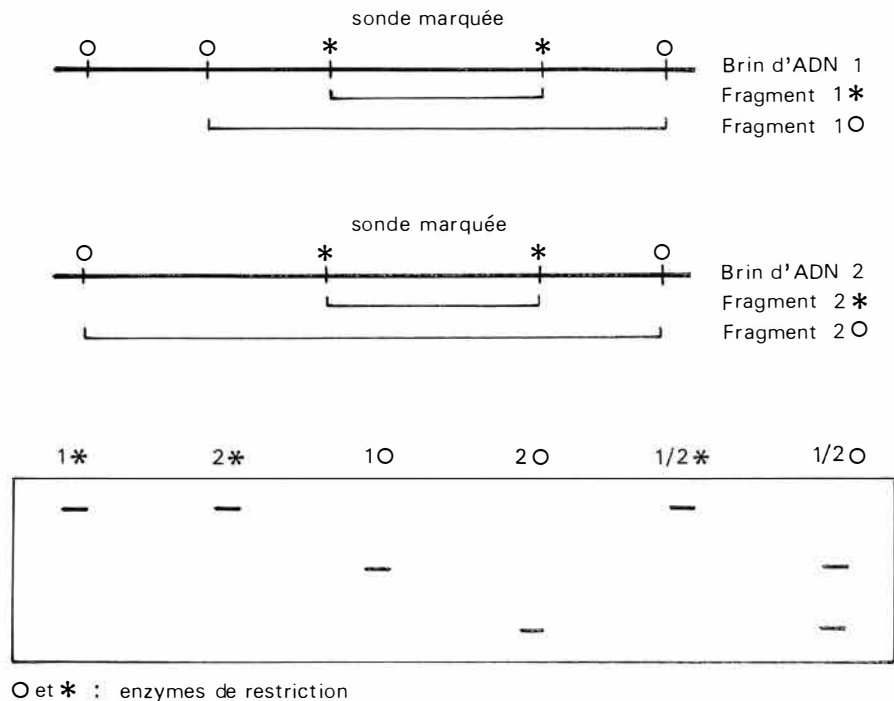


FIGURE 4 \* VARIATION DES ELECTROPHOREGRAMMES POUR UNE SONDE DONNEE EN FONCTION DE L'ENZYME DE RESTRICTION UTILISE.

Cependant, contrairement aux isozymes pour lesquels seul un petit nombre de locus (correspondant à un type donné de gènes de structure) est accessible à l'analyse, l'étude des RFLP paraît être une technique de marquage génétique très performante (BECKMANN et SOLLER, 1986 ; TANKSLEY *et al.*, 1989). En théorie, elle permet en effet d'obtenir un marquage continu du génome qui concerne aussi bien les zones codantes que non codantes (BECKMANN et SOLLER, 1983) et dont la finesse est seulement limitée par les contingences de coûts expérimentaux.

Des cartes génétiques « saturées » ont ainsi été obtenues [maïs (HELENTJARIS *et al.*, 1986), tomate (BERNATZKY et TANKSLEY, 1986), laitue (LANDRY *et al.*, 1987)] ou sont en cours de développement.

La puissance de cet outil pour le marquage de caractères à déterminisme monogénique ou oligogénique est reconnue par tous les auteurs. En revanche, son utilisation pour la localisation des gènes majeurs des caractères quantitatifs et l'analyse de leurs effets est encore discutée (BECKMANN et SOLLER, 1983, 1986 ; BURR *et al.*, 1983 ; ELLIS, 1986 ; OSBORN *et al.*, 1987). De même, l'élaboration des méthodes statistiques et l'établissement des plans expérimentaux à mettre en oeuvre à cet effet, constituent un vaste domaine de recherche pour les biométriciens (LEBOWITZ *et al.*, 1987 ; WELLER *et al.*, 1987 ; DONIS-KELLER *et al.*, 1987 ; PATERSON *et al.*, in press).

Les RFLP permettent, par ailleurs, d'aborder des études taxonomiques et phylogéniques directement au niveau des génomes nucléaires (divergence génétique et différenciations structurelles entre génomes) ou cytoplasmiques

(phylogénie maternelle à partir des ADN mitochondriaux ou chloroplastiques).

L'utilisation de cette technique sur les espèces fruitières est très récente et peu de travaux ont été publiés. Nous citerons pour les agrumes les travaux réalisés sur l'ADN chloroplastique et mitochondrial, soit dans le cadre d'études phylogéniques (GREEN *et al.*, 1986) soit à des fins de contrôle de fusion de protoplastes (VARDI *et al.*, 1987 ; KOBAYASHI *et al.*, 1988). L'université de Riverside (Californie) développe par ailleurs une banque de cDNA (18 sondes d'ores et déjà opérationnelles) qui lui a permis de réaliser une étude taxonomique (ROOSE, 1988).

## CONCLUSION

Au delà de la simple identification variétale pour laquelle les RFLP devraient s'avérer très efficaces, les marqueurs moléculaires intéressent sur de nombreux points les généticiens des espèces fruitières ; pour chaque application nous retiendrons ceux présentant à l'heure actuelle le meilleur rapport performance/coût :

- Des marqueurs de l'évolution.

L'analyse du polymorphisme polyphénolique apporte des informations dynamiques sur l'évolution et conduit naturellement à des interprétations de type cladistique. Elle diffère en cela du polymorphisme enzymatique et des RFLP qui décrivent les divergences génétiques entre taxons

mais ne permettent pas de hiérarchiser ceux-ci évolutivement. L'analyse des RFLP des ADN cytoplasmiques renseigne par ailleurs sur la phylogénie maternelle. Enfin, l'établissement de «cartes génétiques saturées» grâce au RFLP permettra d'analyser les remaniements chromosomiques entre espèces et genres voisins.

Ces différentes approches sont donc complémentaires pour les analyses de phylogénie et de relation génétique entre taxons et peuvent s'avérer très utiles pour raisonner davantage la gestion et l'exploitation des ressources génétiques.

- Des marqueurs des systèmes de reproduction et de la structure des populations.

Les isozymes et les RFLP nucléaires sont particulièrement recommandés pour l'analyse des modifications des structures génotypiques, liées au régime de reproduction.

Compte tenu de leur facilité de mise en oeuvre et de leur moindre coût, les isozymes seront généralement préférés. Ils apporteront une connaissance sur les systèmes de reproduction (allogamie, incompatibilités, apomixie) et sur l'hétérozygotie des cultivars, mais seront également très précieux pour de nombreux contrôles de routine au cours des programmes de sélection (hybridation, multiplication conforme par graines des espèces partiellement apomictiques, détection d'haploïdes).

- Des marqueurs de segments chromosomiques.

L'efficacité d'un tel marquage dépend de la quantité et de la dispersion des marqueurs polymorphes disponibles. Comme nous l'avons vu, seuls les RFLP, éventuellement complétés par les isozymes, semblent pouvoir autoriser l'établissement de «cartes génétiques saturées» permettant de localiser les gènes impliqués dans l'établissement des caractères d'intérêts agronomiques. Une fois localisés, ces gènes pourraient être sélectionnés précocement, dans des

descendances contrôlées, grâce aux marqueurs moléculaires les encadrant sur les chromosomes.

Une telle approche ne permet pas le screening de populations d'origine génétique inconnue puisque l'on ne dispose alors d'aucune information sur les déséquilibres gamétiques entre les gènes à sélectionner et les marqueurs moléculaires. Dans ce cas, seul l'emploi de marqueurs révélant directement les variations du gène impliqué dans l'établissement du caractère phénotypique peut être envisageable. L'utilisation de sondes ADN, comme il en existe pour certaines maladies génétiques humaines, est la plus séduisante mais elle réclame à l'heure actuelle des investissements très importants.

La localisation de gènes d'intérêts agronomiques grâce aux «cartes génétiques saturées» pourrait, de plus, permettre d'isoler ces gènes et de les transférer grâce au génie génétique.

- Des marqueurs des systèmes de régulation.

L'analyse des polyphénols et surtout l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines totales prennent en compte les variations des processus de régulation. Ils pourraient donc constituer des marqueurs privilégiés de la variation morphologique et de l'exploration des phénomènes d'organogénèse et d'embryogénèse *in vitro*.

De l'exploitation des ressources génétiques à la multiplication conforme du matériel amélioré, les sélectionneurs disposent donc, ou sont en passe de disposer, avec les marqueurs moléculaires, d'outils de description et de décision puissants. Il ne faut cependant pas perdre de vue que certaines de ces techniques sont encore très jeunes (RFLP, électrophorèses bidimensionnelles) et que leurs limites ne sont pas toujours bien cernées. Il convient donc de ne pas tout attendre de ces marqueurs, comme cela a parfois été le cas avec les isozymes, et de raisonner leur utilisation.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALBACH (R.F.) and REDMAN (G.H.). 1969.  
Composition and inheritance of flavanones in *Citrus* fruit.  
*Phytochemistry*, vol. 8, 127-143.
- AUTRAN (J.C.) et ABBAL (P.). 1986.  
Informatisation de l'identification variétale des céréales par électrophorèse : une première étape.  
*IAA*, Jun. 1986, p. 535-545.
- BAHRMAN (N.), JAY (M.) et GORENFLOT (R.). 1985.  
Apport à la connaissance chimiosystématique de quelques espèces du genre *Chenopodium* L.  
*Bull. Soc. Bot. Fr.*, 132, *Lettres Bot.* 2 ; 107-113.
- BECKMANN (J.S.) and SOLLER (M.). 1986.  
RFLP and genetic improvement of agricultural species.  
*Euphytica*, 35, 111-124.
- BECKMANN (J.S.) and SOLLER (M.). 1983.  
Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement : methodology, mapping and costs.  
*Theor. Appl. Gen.*, 67, 35-43.
- BEN-HAYYIM (G.), SHANI (A.) and VARDI (A.). 1982.  
Evaluation of isozyme systems in *Citrus* to facilitate identification of fusion products.  
*Theor. Appl. Genet.*, 64, 1-5.
- BERNATZKY (R.) and TANKSLEY (D.). 1986.  
Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences.  
*Genetics*, 112, 887-898.
- BURR (B.), EVOLA (S.V.), BURR (F.A.) and BECKMANN (J.S.). 1983.  
The application of RFLP to plant breeding.  
In : Setlow J.K., Hollaender A. (eds) *Genetic engineering*, vol. 5, Plenum press, New York, p. 13-26.
- CARTER (G.E.) Jr and BROCK (M.M.). 1980.  
Identification of peach cultivars through protein analysis.  
*HortScience*, 15 (3), 292-293.
- CHEVREAU (E.). 1984.  
Intérêt de l'électrophorèse pour l'identification des génotypes de pommier.  
*Colloque sur les recherches fruitières, Bordeaux, 28-29 novembre 1984*.
- DAMERVAL (C.) et DE VIENNE (D.). 1985.  
Divergence morphologique et divergence moléculaire. I.- Apport des marqueurs protéiques, p. 61-80.  
In : M. Lefort-Buson et D. de Vienne. *Les distances génétiques. Estimations et applications*, INRA Paris, 181 p.

- DAMERVAL (C.), HEBERT (Y.) and DE VIENNE (D.). 1987.  
Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability? A comparison of two-dimensional electrophoresis data with morphological traits in maize.  
*Theor. Appl. Gen.*, 74, 194-202.
- DE VIENNE (D.). 1984.  
Limites et perspectives des marqueurs moléculaires.  
«*Le sélectionneur français*», (33), 35-46.
- DONIS-KELLER (H.) et al., 1987.  
A genetic linkage map of the human genome.  
*Cell*, vol. 51, 319-337.
- ELLIS (T.H.N.). 1986.  
RFLP markers in relation to quantitative characters.  
*T.A.G.*, 72, 1-2.
- FIASSON (J.L.), ARDOIN (P.) and JAY (M.). 1987.  
A phylogenetic groundplan of the specific complex *Dactylis glomerata*.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 15, 224-229.
- FREY (O.M.), STUBER (C.W.) and GOODMAN (M.M.). 1986.  
Use of allozyme as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids.  
*Crop Sci.*, 26, 37-42.
- GAN (Y.Y.), ZAINI (S.) and IDRIS (A.). 1981.  
Genetic variation in the grafted vegetatively propagated mango (*Mangifera indica*).  
*Pertanida*, 4, 53-62.
- GOODMAN (M.M.) and STUBER (C.W.). 1983.  
Maize. In isozymes in plant genetics and breeding, part. B.  
*Tanksley and Orton ed.*, Amsterdam, 1-33.
- GOTTSBERGER (G.) and GOTTLIEB (O.R.). 1981.  
Blue flower pigmentation and evolutionary advancement.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 9, 13-18.
- GREEN (R.M.), VARDI (A.) and GALUN (E.). 1986.  
The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera.  
*T.A.G.*, 72, 170-177.
- HANDA (T.), ISHIZAWA (Y.) and OOGAKI (C.). 1986.  
Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera.  
*The Japanese journal of Genetics*, 61 (1), 15-24.
- HARBORNE (J.B.). 1977.  
Flavonoids and the evolution of angiosperms.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 7-22.
- HELENTJARIS (T.), WEBER (D.F.) and WRIGHT (S.). 1986.  
Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using RFLP.  
*T.A.G.*, 72, 761-769.
- HELENTJARIS (T.), KING (G.), SLOCUM (M.), SIEDENSTRANG (C.) and WEGMAN (S.). 1985.  
Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding.  
*Plant Molecular Biology*, 5, 109-119.
- HORRY (J.P.). 1989.  
Chimiotaxonomie et organisation génétique dans le genre *Musa*.  
*Thèse de Doctorat en Sciences, Paris XI, Orsay*.
- HORRY (J.P.) and JAY (M.). 1988.  
Distribution of anthocyanins in wild and cultivated banana varieties.  
*Phytochem.*, 27, 2667-2672.
- KHAN (I.A.) and ROOSE (M.L.). 1988.  
Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113 (1), 105-110.
- KAJIURA (I.), NAKAJIMA (M.), SAKAI (Y.) and OOGAKI (C.). 1983.  
A species-specific flavonoid from *Pyrus aromatica* Nakaii and Kikuchi, and its geographical distribution in Japan.  
*Japan. J. Breed.*, 33 (1).
- KIMURA (M.). 1983.  
The neutral theory of molecular evolution.  
*Great Britain, Cambridge Univ. Press*, 337 p.
- KOBAYASHI (S.), OHGAWARA (T.), OIYAMA (I.) and ISHII (S.). 1988.  
Somatic hybridization between navel orange and murcott tangor.  
*International Citrus Congress, Middle East*.
- LANDRY (B.S.), KESSELI (R.V.), FARRARA (B.) and MICHELMORE (W.). 1987.  
A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with RFLP, isozyme, disease resistance and morphological markers.  
*Genetics*, 116, 331-337.
- LEBOWITZ (R.J.), SOLLER (M.) and BECKMANN (J.S.). 1987.  
Trait-based analyses for the detection of linkage between marker loci and quantitative trait loci in crosses between inbred lines.  
*T.A.G.*, 73, 556-562.
- LEFORT BUSON (M.) et DE VIENNE (D.). 1985.  
Les distances génétiques. Estimations et applications.  
*INRA Paris*, 181 p.
- MANGANARIS (A.G.) et ALSTON (F.H.). 1987.  
Inheritance and linkage relationships of glutamate oxaloacetate transaminase isoenzymes in apple.  
I.- The gene GOT-1, a marker for the S incompatibility locus.  
*T.A.G.*, 74, 154-161.
- MASTENBROEK (O.) and VAN BREDERODE (J.). 1986.  
The possible evolution of *Silene pratensis* as deduced from present day variation patterns.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 14, 165-181.
- MENENDEZ (R.A.), LARSEN (F.E.) and FRITTS (R.) Jr. 1986.  
Identification of carnation cultivars.  
*HortScience*, 20 (3), 372-373.
- ORTIZ (J.M.), TADEO (J.L.), GUERRI (J.) and FORNER (J.B.). 1981.  
Distinction between hybrid and nucellar *Citrus* trees by analysis of their biochemical compounds.  
*Proc. Int. Soc. Citriculture*, vol. 1, 4-7.
- OSBORN (T.C.), ALEXANDER (D.C.) and FOBES (J.F.). 1987.  
Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit.  
*T.A.G.*, 73, 350-356.
- PARFITT (D.E.) and ARULSEKAR (S.). 1985.  
Identification of plum x peach hybrids by isoenzyme analysis.  
*HortScience*, 20 (2), 246-248.
- PATERSON (A.H.), LANDER (E.S.), HEWITT (J.D.), PETERSON (S.), LINCOLN (S.E.) and TANKSLEY (S.D.). 1988.  
Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete RFLP linkage map.  
*Nature*, 335, 721-726.
- PONTIKIS (C.A.), LOUKAS (M.) and KOUSOUNIS (G.). 1980.  
The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars.  
*J. Hort. Sci.*, 55 (4), 333-343.
- RICHARDSON (P.M.) and YOUNG (D.A.). 1982.  
The phylogenetic content of flavonoid point scores.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 10, 251-255.
- RICK (C.M.). 1983.  
Tomato. In isozymes in plant genetics and breeding. part. B.  
*Tanksley and Orton ed.*, Amsterdam, 147-165.
- ROOSE (M.L.). 1988.  
Isozymes and DNA RFLP in *Citrus* breeding and systematics  
*International Citrus Congress, Middle East*.
- SALEH (N.A.M.). 1979.  
The biosynthesis of flavonoid glycosides and their importance in chemosystematics.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 7, 37-45.
- SIMMONDS (N.W.). 1954.  
Anthocyanins in bananas.  
*Ann. Bot. Lond., N.S.*, 18, 471-482.
- TANKSLEY (S.D.), YOUNG (N.D.), PATERSON (A.H.) and BONIERBALE (M.W.). 1989.  
RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science.  
*Bio/technology*, 7, 257-269.
- TATUM (J.H.), BERRY (R.E.) and HEARN (C.J.). 1974.  
Characterization of *Citrus* cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatography.  
*Proc. Fla. Sta. Hort. Soc.*, 87, 75-81.
- TORRES (A.M.) and BERGH (B.O.). 1980.  
Fruit and leaf isozymes as genetic markers in avocado.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105 (4), 614-619.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) and DIEDENHOFEN (U.). 1978.  
Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*.  
*Amer. J. Bot.*, 65 (8), 869-881.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) and MAU-LASTOVICKA (T.). 1982.  
*Citrus* isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings.  
*Journ. Heredity*, 73, 335-339.



- VALDEYRON (G.) et VALIZADEH (M.). 1976.  
L'identification variétale du figuier (*Ficus carica* L.) par l'étude du polymorphisme enzymatique par électrophorèse.  
*C.R. Acad. Agric. France*, 62, 170-175.
- VALIZADEH (M.), RIVALS (P.) et VALDEYRON (G.). 1977.  
Utilisation du polymorphisme protéique pour l'étude des variétés de figuier (*Ficus carica* L.).  
*C.R. Acad. Agric. France*, 63, 647-655.
- VALIZADEH (M.). 1978.  
Aspects génétiques, écologiques et agronomiques de l'étude de la variabilité des protéines chez les plantes supérieures, cas de *Ficus carica* L.  
*Thèse de Doctorat, Académie de Montpellier, Univ. des Sci. et Tech. du Languedoc (France)*, 182 p.
- VARDI (A.), BREIMAN (A.) and GALUN (E.). 1987.  
Citrus cybrids : production by donor-recipient protoplast fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles.  
*T.A.G.*, 75, 51-58.
- WEEDEN (N.F.) and LAMB (R.C.). 1985.  
Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110 (4), 509-515.
- WELLER (J.I.), SOLLER (M.) and BRODY (T.). 1988.  
Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers.  
*Genetics*, 118, 329-339.
- WILSON (A.C.), CARLSON (S.S.) and WHITE (T.J.). 1977.  
Biochemical evolution.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 46, 573-639.
- YOUNG (D.A.) and STERNER (R.W.). 1981.  
Leaf flavonoids of primitive dicotyledonous angiosperms : *Degeneria vitiensis* and *Diospermum australiense*.  
*Bioch. Syst. Ecol.*, 9, 185-187.

#### MOLEKÜLMARKIERER UND IHR EINSATZ ZUR VERBESSERUNG VON OBSTSORTEN.

P. OLLITRAULT.

*Fruits*, May 1989, vol. 44, n° 5, p. 243-251.

KURZFASSUNG - Die wichtigsten Analyseverfahren für den Molekül-Polymorphismus (Polyphenole, Isozyme, Gesamteiweiss, DSN-Bestandteile) werden kurz beschrieben. Anschliessend wird über Bedeutung und Grenzen ihres Einsatzes zur Verwaltung des Gen-Materials und zur Verbesserung des Zuchtmaterials von Obstsorten auf Basis einer bibliographischen Zusammenschau referiert.

#### LOS MARCADORES MOLECULARES, APLICACION A LA MEJORA DE LAS ESPECIES FRUTERAS.

P. OLLITRAULT.

*Fruits*, May 1989, vol. 44, n° 5, p. 243-251.

RESUMEN - Se describen sucintamente las principales técnicas de análisis del polimorfismo molecular (polifenoles, isozimas, proteínas totales, fragmento de restricción del ADN). Se discuten a continuación, sobre la base de una síntesis bibliográfica, el interés y los límites de su utilización para la gestión de los recursos genéticos y la mejora de las especies fruteras.

