L'utilisation des techniques d'hybridation in situ et de clonage de séquences d'ADN pour l'étude des chromosomes chez les végétaux

Jane Hutchinson, Christiane Fauron

► To cite this version:

Jane Hutchinson, Christiane Fauron. L'utilisation des techniques d'hybridation in situ et de clonage de séquences d'ADN pour l'étude des chromosomes chez les végétaux. *Agronomie*, 1984, 4 (10), pp.957-966. hal-00884599

HAL Id: hal-00884599

<https://hal.science/hal-00884599>

Submitted on 1 Jan 1984

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.

L'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* et de clonage de séquences d'ADN pour l'étude des chromosomes chez les végétaux

Jane HUTCHINSON ⁽¹⁾ & Christiane FAURON

Cytogenetics Department, Plant Breeding Institute, Trumpington, Cambridge, CB2 2LQ, Grande-Bretagne

RÉSUMÉ

Cet article présente une revue des méthodes utilisées pour le clonage de séquences d'ADN dans des vecteurs comme des plasmides, cosmides et le phage lambda, en même temps que la technique de localisation des séquences clonées sur les chromosomes en utilisant l'hybridation *in situ*.

Il donne une description détaillée de l'application de ces techniques à l'étude de la structure, l'organisation et l'identification des chromosomes chez les plantes.

Mots clés additionnels : *Plasmide, cosmide, phage lambda, identification des chromosomes, organisation des séquences.*

SUMMARY

Use of in situ hybridization and DNA sequence cloning for the study of plant chromosomes.

The methods used for cloning DNA sequences in plasmid, cosmid and phage lambda vectors are reviewed, together with the technique for localising the cloned sequences on chromosomes using *in situ* hybridization. Applications of these techniques to the study of the structure, organization and identification of chromosomes in plants are described in detail.

Additional key words : *Plasmid, cosmid, phage lambda, chromosome identification, sequence organisation.*

Un programme d'amélioration des plantes faisant appel à l'ingénierie chromosomique nécessite l'identification individuelle des chromosomes. Traditionnellement, on utilise des caractères tels que la longueur et la position du centromère surtout chez les espèces diploïdes ; dans le cas d'espèces polyploïdes comme le blé tendre où les chromosomes sont difficilement reconnaissables par leur taille, on a employé des lignées aneuploïdes ou porteuses de chromosomes marqués cytologiquement, notamment des chromosomes télocentriques. Plus récemment, les techniques de coloration différentielle ont apporté quelques informations supplémentaires. L'hybridation *in situ* à partir de séquences clonées permet aujourd'hui de compléter ces méthodes.

I. LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION *IN SITU*

La technique d'hybridation *in situ* est basée sur le principe de la formation de duplexes ARN-ADN ou

ADN-ADN où l'une des molécules est immobilisée dans la cellule et l'autre utilisée comme sonde moléculaire pour la localiser. La méthodologie, développée à la fin des années 60 (GALL & PARDUE, 1971), a été largement appliquée à un grand nombre d'organismes. Depuis cette date, de nombreuses mises au point concernant cette technique et ses applications ont été publiées (JONES, 1973 ; WIMBER & STEFFENSEN, 1973 ; PARDUE & GALL, 1975 ; WOBUS, 1976 ; HUTCHINSON *et al.*, 1981, etc...). Quelques modifications mineures ont été introduites en vue de recherches particulières.

Dans le cas des plantes, on prépare tout d'abord sur une lame des étalements de chromosomes mitotiques ou méiotiques : des extrémités de racines prétraitées (APPELS *et al.*, 1978) ou des anthères (HUTCHINSON *et al.*, 1980) sont fixées dans l'alcool acétique 3 : 1, puis écrasées entre lame et lamelle dans l'acide acétique à 45 p. 100. Après l'écrasement, les préparations sont traitées à la neige carbonique ou à l'azote liquide ce qui permet de séparer lame et lamelle, sans perdre les cellules qui restent fixées sur la lame. Les préparations sont ensuite déshydratées à l'alcool éthylique

⁽¹⁾ Adresse actuelle : Department of Biological Sciences, Manchester Polytechnic, Oxford Road, Manchester, Grande-Bretagne.

absolu et séchées à l'air. A ce stade, tout ARN endogène qui pourrait interférer avec l'hybridation est détruit par traitement des préparations à l'ARNase (GALL & PARDUE, 1971). L'étape suivante consiste à dénaturer l'ADN chromosomique par traitement soit à l'acide, soit à l'alcali, soit à la chaleur (voir revues déjà citées). Pour les chromosomes des plantes, 2 traitements sont couramment utilisés : la dénaturation avec HCl 0,2 N (PEACOCK *et al.*, 1977) et la dénaturation par action combinée de la chaleur et de la formamide (HUTCHINSON *et al.*, 1980). On peut également appliquer simultanément les 2 traitements (GERLACH *et al.*, 1982).

On prépare ensuite des sondes moléculaires radioactives. Plusieurs méthodes peuvent être employées (voir revues) : pour identifier les chromosomes des plantes, la meilleure méthode consiste à utiliser l'ARN complémentaire (marqué au tritium) des séquences d'ADN. Cet ARN est obtenu à l'aide de l'enzyme ARN polymérase, en présence de ^3H nucléotides triphosphates (GALL & PARDUE, 1971). La sonde ^3H -ARN est préparée dans une solution de $6 \times \text{SSC}$, puis diluée de moitié avec de la formamide avant hybridation. La solution d'hybridation est donc de $3 \times \text{SSC}$ -50 p. 100 formamide. Un volume de 6 à 8 μl de cette solution est placé sur la préparation, qui est alors recouverte d'une lamelle, puis lavée à l'acide (HCl 0,2 N) et scellée. La durée et la température requises pour l'hybridation dépendent de la complexité de la séquence, de la présence de répétitions et de l'activité spécifique de la sonde (SZABO *et al.*, 1977). En général, l'identification des chromosomes des plantes demande un temps d'hybridation d'environ 16 h à une température de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ (GERLACH *et al.*, 1982). Tout excès de sonde est alors éliminé par une série de lavages très méticuleux et par d'autres traitements à l'ARNase (HUTCHINSON *et al.*, 1981 ; GERLACH *et al.*, 1982). Les lames sont ensuite déshydratées et séchées à l'air avant d'être recouvertes par une émulsion photosensible. Le temps d'exposition des autoradiographies dépend du degré répétitif des séquences et de l'intensité du marquage de la sonde. Les préparations sont donc développées et les essais sont répétés autant de fois que cela est nécessaire pour obtenir l'exposition optimale. Après le développement, on fixe puis on colore les préparations, le plus souvent avec une solution aqueuse à 10 p. 100 de Giemsa. La présence de grains d'argent dans l'émulsion photographique indique la localisation des séquences utilisées comme sonde.

Avant que le clonage moléculaire des séquences d'ADN de plantes n'ait été mis au point, la plupart des séquences utilisées pour l'hybridation *in situ* des chromosomes de plantes étaient des séquences répétitives isolées, séparées de l'ADN principal grâce à leurs propriétés physiques. Une fraction de l'ADN hautement répétitif nommé ADN Cot 10^{-2} était séparée du reste de l'ADN sur colonne d'hydroxyapatite grâce à sa renaturation très rapide après dénaturation (Cot = moles nucléotide $1 \times$ temps d'incubation en s). C'est ainsi que les fractions Cot isolées à partir des chromosomes de *Secale cereale* (APPELS *et al.*, 1978), *Luzula purpurea* (RAY & VENKETESWARAN, 1979), *Triticum aestivum* (GERLACH & PEACOCK, 1980) ont été réhybridées à leurs chromosomes respectifs. L'exa-

men des chromosomes met en évidence des régions d'hybridation très spécifiques mais aussi des sites d'hybridation plus dispersés. Etant donné que l'ADN Cot 10^{-2} représente un mélange de familles de séquences répétitives sans relation les unes avec les autres, il n'est pas possible dans ce cas de connaître la localisation d'une séquence particulière ; chaque site pouvant être attribué à plus d'une famille (GERLACH & PEACOCK, 1980 ; HUTCHINSON & LONSDALE, 1982). On a donc, par la suite, cherché à isoler certains composants de l'ADN Cot 10^{-2} , ce qui a été possible car certaines familles de séquences hautement répétitives appelées ADN satellite présentent une composition en bases très particulière et peuvent être séparées du reste de l'ADN par centrifugation en gradients de densité. De tels ADN satellites ont été isolés à partir de *Scilla sibirica* (TIMMIS *et al.*, 1975 ; DEUMLING & GREILHUBER, 1982), *Vicia faba* (TIMMIS *et al.*, 1975), *Triticum aestivum* et *Hordeum vulgare* (GERLACH *et al.*, 1978 ; DENNIS *et al.*, 1980) et *Zea mays* (PEACOCK *et al.*, 1981b) et localisés sur les chromosomes par hybridation *in situ*. Cependant, comme pour l'ADN Cot 10^{-2} , l'ADN satellite, bien que moins hétérogène, consiste en un mélange de séquences différentes. Finalement, ces dernières années, des séquences uniques ont pu être isolées grâce au clonage moléculaire.

II. LES TECHNIQUES DU CLONAGE MOLÉCULAIRE

Le clonage moléculaire consiste à joindre un morceau d'ADN à un transporteur moléculaire appelé vecteur qui sert à la propagation de cet ADN dans une bactérie réceptrice. Ce vecteur (plasmide, phage, cosmide) a la capacité de se répliquer dans la cellule-hôte permettant ainsi au fragment d'ADN étranger qui lui est attaché de se perpétuer indéfiniment. Une séquence unique d'ADN peut ainsi être isolée d'un génome complexe à partir d'une population de molécules d'ADN recombinées appelée bibliothèque ou banque génomique. Une banque est complète si le nombre de clones obtenu est suffisamment grand pour représenter la totalité de l'ADN chromosomique. Connaissant la longueur moyenne des fragments d'ADN clonés et la taille du génome haploïde, ce nombre peut être aisément calculé (CLARKE & CARBON, 1976). Par exemple un génome de 3×10^6 kilobases (kb) (tel que le génome des mammifères) cloné à partir de fragments de 15 kb en moyenne nécessite environ 10^6 molécules recombinées pour atteindre une probabilité de 99 p. 100 d'obtenir une séquence donnée. Des banques complètes ont été créées à partir d'ADN chromosomique d'organismes très différents. Ce but a été atteint pour la première fois par MANIATIS *et al.* en 1978. Des banques partielles ont également été obtenues par enrichissement, avant le clonage, de séquences d'ADN particulières (BEDBROOK *et al.*, 1980 ; GERLACH & BEDBROOK, 1979).

Les bibliothèques d'ADN chromosomique peuvent être obtenues par 2 voies différentes mais complémentaires : clonage direct de l'ADN chromosomique ou clonage d'ADN complémentaire (ADNc). La fabrication d'ADNc se fait par copie *in vitro* d'une popula-

tion entière d'ARN messagers grâce à la transcriptase réserve (WILLIAMS, 1981). Dans cette 2^e partie, les différents vecteurs utilisés en génie génétique seront décrits succinctement ; leurs avantages et leurs inconvénients seront résumés. Jusqu'à présent, ce sont les plasmides bactériens qui ont été le plus communément utilisés pour l'obtention de banques génomiques à partir de matériel végétal. Cependant, comme indiqué un peu plus loin, les vecteurs dérivés du bactériophage lambda et les cosmides offrent d'autres avantages. De toute façon, on ne doit pas oublier que les stratégies employées en génie génétique évoluent de façon très rapide.

A. Clonage avec les plasmides

Un plasmide bactérien est une molécule d'ADN double brin, circulaire, qui contient, suffisamment d'information génétique pour pourvoir à sa propre réplication ; il peut coder aussi pour des protéines qui confèrent à l'hôte bactérien une résistance à certains antibiotiques. Ces plasmides qui existent à l'état naturel ont été modifiés génétiquement afin de faciliter leur utilisation comme vecteurs de clonage. pBR32 est une molécule d'ADN de 4,362 pb (SUTCLIFFE, 1978) qui confère la résistance aux antibiotiques ampicilline (amp) et tétracycline (tet) (fig. 1 ; BOLIVAR *et al.*, 1977 ; BOLIVAR & BACKMAN, 1980). Cette molécule d'ADN peut être rendue linéaire, par exemple après traitement avec l'enzyme de restriction Ban H1 pour laquelle un site unique de coupure est présent dans le gène tet. Un fragment d'ADN étranger obtenu après hydrolyse par Ban H1 (ou un autre isoschizomère tel que Sau 3A) peut être inséré dans ce site et attaché de façon covalente avec la ligase T4 (PANASENKO *et al.*, 1977), produisant ainsi un plasmide hybride ou recombiné. Cette molécule recombinante est alors introduite dans une bactérie (*Escherichia coli*) par transformation. Celle-ci est possible si les cellules bactériennes sont rendues compétentes par traitement au calcium (MANDEL & HIGA, 1970). Afin d'éviter la possibilité de réarrangements de séquences d'ADN du plasmide hybride pendant l'amplification du nombre de copies, les molécules recombinées sont propagées dans une souche bactérienne qui est déficiente pour la recombinaison : les souches Rec A- telles que HB101 ou ED8767 sont couramment employées. Les cellules bactériennes ainsi transformées peuvent être sélectionnées grâce à leur résistance en milieu ampicilline et testées pour leur sensibilité en milieu tétracycline puisque la résistance à cet antibiotique a été perdue lors de l'insertion du fragment d'ADN étranger dans le gène tet. Le nombre de copies de cette molécule recombinée peut alors être amplifié considérablement par culture des bactéries en milieu contenant un inhibiteur de synthèse protéique tels que le chloramphénicol ou la spectinomycine (CLEWELL, 1972). Les plasmides dérivés de ColE1, pMB1 sont les plus utiles. Une dizaine de copies existent à l'état naturel et peuvent être amplifiées jusqu'à 1 500 copies en milieu chloramphénicol. Une liste des vecteurs plasmides est présentée dans les publications de BERNARD & HELSINKI (1980), BOLIVAR & BACKMAN (1980) et THOMPSON (1982).

Afin d'accroître les chances d'insertion de fragments d'ADN d'origine diverse dans un vecteur donné,

Figure 1

Représentation schématique des cartes physiques du plasmide pBR322 (A) et du cosmide pHC79 (B). Les tirets représentent les régions où sont localisés les gènes codant pour la résistance à l'ampicilline (A') et la tétracycline (T'). ORI représente l'origine et la flèche la direction de la réplication. Les cartes sont basées sur les publications de : (A) J. C. SUTCLIFFE, Nucl. Acids Res., 5, 2721 (1978) et (B) B. HOHN & J. COLLINS, Gene, 11, 291 (1980). Le cercle intérieur à pHC79 représente les séquences de pBR 322. La ligne épaisse représente le fragment BglII contenant les séquences cos, et les tirets un fragment du phage λ de 0,65 kb également inséré dans pHC79. Le fragment comprenant les paires de base 1459-1666 de pBR322 a été perdu dans pHC79.

Schematic representation of the map of the plasmid pBR322 and the cosmid pHC79. Indicated in broken lines are the regions of genes encoding drug resistance : A' = ampicillin resistant, T' = tetracycline resistant. ORI represents the origin of replication and the arrow the direction of replication. A : the map is based on J. G. SUTCLIFFE, Nucl. Acids Res., 5, 2721 (1978). B : the map is based on B. HOHN & J. COLLINS, Gene, 11, 291 (1980). The inside circle of pHC79 represents the pBR322 sequences. The thick line represents the BglII cos fragment and thick broken lines a 0.65 kb fragment of λ phage also inserted in pHC79. The 1459 to 1666 pb fragment of pBR322 has been deleted.

diverses stratégies expérimentales ont été développées. L'une consiste à modifier les termini d'un vecteur linéarisé par enzyme de restriction, afin d'éviter que les molécules vectrices non-attachées à un morceau d'ADN étranger se recircularisent entre elles ; sinon les ligations intramoléculaires seraient, de loin, l'évènement le plus fréquent et la sélection des clones non-recombinés serait beaucoup trop élevée. La modification de ces extrémités consiste en l'élimination du phosphate 5' terminal par la phosphatase alcaline (ULLRICH *et al.*, 1977). La recircularisation du plasmide n'est possible qu'après insertion d'ADN double brin possédant un groupe phosphate à ses extrémités 5' (WEAVER & WEISSMAN, 1979).

Afin de permettre l'utilisation d'un grand nombre d'enzymes de restriction pour un vecteur donné, 2 méthodes peuvent être utilisées : l'une consiste en l'addition d'un fragment d'ADN synthétique (SCHELLER *et al.*, 1977 ; BAHL *et al.*, 1977) au vecteur linéaire, par ligation bout franc (SGARAMELLA, 1972) ; ce fragment d'une dizaine de nucléotides, appelé « linker », possède une séquence qui peut être reconnue par une ou plusieurs enzymes de restriction ; la 2^e méthode repose sur le principe d'hybridation des polynucléotides poly d(A)-poly d(T) ou poly d(G)-poly d(C) qui ont été ajoutés aux extrémités du vecteur et de fragments d'ADN chromosomique grâce à la transférase terminale déoxynucléotidyle (WENSINK *et al.*, 1974).

Après avoir obtenu un ensemble de clones (tel que la banque BamHI de pBR322), ceux-ci doivent être identifiés. L'identification de clones contenant une séquence recherchée se fait normalement en 2 étapes. Si une sonde moléculaire est disponible, la méthode d'hybridation moléculaire *in situ* de colonies (GRUNSTEIN & HOGNESS, 1975) peut être employée. Cette méthode consiste à transférer les transformants sur papier de nitro-cellulose et à les amplifier sur milieu sélectif. Les colonies sont lysées *in situ*, l'ADN fixé au filtre, dénaturé, puis hybridé aux séquences de la sonde radioactive marquée au Phosphore 32 (SOUTHERN, 1975). Ce premier criblage permet l'identification des clones qui sont alors examinés individuellement (analyse par enzymes de restriction, hybridation...) afin de déterminer si la séquence recherchée est présente. De tels clones peuvent alors être utilisés pour la méthode d'hybridation *in situ* décrite dans la 1^{re} partie de cet article (BEDBROOK *et al.*, 1980 ; GERLACH *et al.*, 1982).

B. Clonage avec le phage lambda

Un avantage du clonage avec le phage λ est que son ADN peut être purifié facilement et en grande quantité. Il est possible d'obtenir 0,5 mg/ml d'ADN à partir de phages purifiés par centrifugation en gradient de chlorure de césium. L'efficacité avec laquelle un fragment particulier d'ADN peut être cloné dépend de la disponibilité d'un bon vecteur.

Deux découvertes importantes ont eu un grand impact sur l'utilisation de λ en tant que vecteur. Tout d'abord l'observation qu'un tiers de la partie centrale du génome de λ ne contient que des gènes n'intervenant pas directement sur sa croissance lytique (fig. 2 ; HENDRIX, 1971). Cette région peut donc être remplacée par un morceau d'ADN étranger. L'autre observation découle de l'étude de la morphogénèse de λ (revue par HOHN & KATSURA, 1977) et elle a permis la mise au point de la technique d'encapsidation *in vitro* (ou packaging). L'ADN de λ , mis en présence de protéines d'encapsidation et de précurseurs nécessaires à la morphogénèse du phage, peut donner lieu à la production de particules infectieuses (BECKER & GOLD, 1975). Le substrat pour l'encapsidation *in vitro* est une molécule concatémère d'ADN de λ contenant les séquences cos (régions des extrémités cohésives de λ) (HOHN, 1975 ; FEISS *et al.*, 1977 ; HOHN & MURRAY, 1977 ; STERNBERG *et al.*, 1977 ; HOHN, 1979) et seuls les monomères de longueur appropriée, soit 75 à 105 p. 100 de génome λ , peuvent produire des particu-

les viables (WEIL *et al.*, 1973). L'insertion dans le génome λ de fragments d'ADN de plus de 22 kb n'est donc pas possible. L'encapsidation est un ensemble de réactions très complexes se produisant à la suite d'un mélange de 2 lysats bactériens obtenus à partir de souches lysogènes pour le phage λ qui contiennent des prophages possédant des gènes mutés codant pour différentes étapes de la morphogénèse du phage. Lorsque ces 2 extraits sont mélangés avec l'ADN DE λ , ils se complètent pour produire des particules infectieuses (HOHN & MURRAY, 1977 ; STERNBERG *et al.*, 1977).

1. Les différents types de vecteurs lambda

Un génome de λ délété de sa partie non-essentielle et possédant un seul site de coupure pour une enzyme de restriction particulière est appelé un vecteur d'insertion (ce sont les plus utiles pour le clonage de petits fragments d'ADN, 10 kb). Les vecteurs de remplacement sont ceux qui ont conservé 2 sites de coupure par une même enzyme de restriction, localisés aux extrémités de fragments d'ADN non-nécessaires au développement lytique de λ . Cette région non-essentielle, quand elle est remplacée par un fragment de taille appropriée, permet la formation de particules viables. Des fragments d'ADN de 6 kb à 20 kb peuvent être insérés (THOMAS *et al.*, 1974 ; MURRAY & MURRAY, 1975 ; MURRAY *et al.*, 1977 ; BLATTNER *et al.*, 1977 ; LOENEN & BRAMMAR, 1980).

Les vecteurs dérivés de λ les plus utilisés sont ceux qui permettent une insertion de fragments EcoRI, Hind III ou Ban HI (RIMM *et al.*, 1980 ; POURCEL *et al.*, 1979). Une liste de ces vecteurs a été établie par WILLIAMS & BLATTNER (1980) et BRAMMAR (1982) ; ces auteurs ont aussi catalogué les sites de restriction et la longueur limite des fragments d'ADN qui peuvent être insérés.

2. Identification et sélection des recombinants

Le 1^{er} criblage qui identifie les recombinants à partir d'une grande population de colonies est basé sur des tests de couleur ou de changement de morphologie des plaques. Les plaques de phage λ sauvage sont turbides, parce que certaines bactéries ont été lysées à la suite de l'infection. Les phages recombinants peuvent être reconnus par la formation de plaques claires (MURRAY & MURRAY, 1975 ; BLATTNER *et al.*, 1977 ; MURRAY *et al.*, 1977 ; KLEIN & MURRAY, 1979). Dans le cas des tests de couleurs, le phage vecteur produit des plaques bleues tandis que les phages recombinants produisent des plaques incolores (BLATTNER *et al.*, 1977 ; POURCEL & TIOLLAIS, 1977). D'autres tests, bien que plus laborieux, sont disponibles ; ce sont les procédés de replique ou « spot tests » (MURRAY & MURRAY, 1974).

Le 2^e criblage se fait par hybridation lorsqu'une sonde moléculaire est disponible. Cette méthode est simplement une modification de la technique d'hybridation de colonies mise au point par GRUNSTEIN & HOGNESS (Voir plasmides ; KRAMER *et al.*, 1976 ; BENTON & DAVIS, 1977). C'est une technique très sensible — des séquences de 1 kb ou moins peuvent être détectées — et très rapide puisque 10⁵ plaques peuvent être détectées sur une boîte de Petri de 9 cm de diamè-

tre (JEFFREYS *et al.*, 1982). La méthode d'obtention de banques génomiques à partir de λ se trouve détaillée dans la publication de DAHL *et al.* (1981).

3. Comparaison des vecteurs : *lambda*-plasmides

L'efficacité avec laquelle une bactérie est transformée par un plasmide dépend avant tout de la taille de celui-ci. De grands plasmides (≈ 50 kb) transforment de 100 à 1 000 fois moins que de petits plasmides (≈ 5 kb) (COLLINS, 1977 ; COLLINS & HOHN, 1978).

L'encapsulation *in vitro* de λ type sauvage produit 10^8 plaques par g d'ADN λ et 5×10^4 à 5×10^5 plaques par g d'ADN recombiné, ce qui est de 100 à 1 000 fois plus élevé que l'obtention de plasmides recombinés de taille identique (COLLINS & HOHN, 1978).

C. Clonage avec les cosmides

Afin de pouvoir cloner efficacement de grands fragments d'ADN, de nouveaux vecteurs appelés cosmides ont été développés (HOHN, 1975 ; COLLINS & HOHN, 1978). Les cosmides possèdent à la fois les propriétés des plasmides et des phages et présentent des avantages par rapport aux deux. Ce sont des plasmides qui en plus contiennent les régions cohésives (cos) du bactériophage λ (FEISS *et al.*, 1977) permettant l'encapsulation *in vitro* (voir clonage avec λ). Un exemple d'obtention d'un vecteur cosmide est décrit par HOROWITZ *et al.* (1980).

Semblable à un plasmide, un vecteur cosmide présente un site unique de coupure par une ou plusieurs enzymes de restriction ; en outre, il possède une origine de réplication permettant une reproduction autonome dans la bactérie et il porte un marqueur sélectif tel que la résistance à certains antibiotiques permettant la sélection des recombinants. Semblables au phage λ , les cosmides contiennent les séquences cos nécessaires à l'encapsulation *in vitro* des molécules recombinées. L'encapsulation est possible seulement si les séquences cos sont séparées de 37 à 52 kb, une distance qui correspond à 73 à 105 p. 100 du génome λ (voir clonage avec λ) (FEISS *et al.*, 1977). Ainsi un vec-

fragments de longueur appropriée sélectionnée : 35 à 50 kb pour pHC79, 20 kb pour le phage λ , basé sur la stratégie utilisée par MANIATIS *et al.* (1978). La ligation du vecteur et du fragment d'ADN étranger se fait à haute concentration d'ADN afin de permettre la formation de longues molécules multimériques contenant les séquences cos. Les monomères linéaires de longueur appropriée peuvent alors être encapsidés *in vitro* (voir texte). La croissance des bactéries réceptrices au phage λ est menée en fin de phase exponentielle dans un milieu L + 0,4 p. 100 maltose, puis les cellules sont concentrées dans 0,01 M $MgSO_4$ (HOHN & COLLINS, 1980). L'adsorption se fait à la température ambiante pendant 20 min. Les cellules sont alors diluées dans le milieu L et incubées à 37 °C pour permettre l'expression des gènes de résistance.

Schematic diagram illustrating a strategy used to construct libraries of random eucaryotic DNA fragments (A) using λ cloning, (B) using cosmid cloning. The high molecular weight DNA (or cDNA) is fragmented by restriction enzyme partial digest then sizing the DNA to be cloned : 35 to 50 kb for pHC79 cloning, 20 kb for this particular phage λ , based on the strategy used by MANIATIS *et al.* (1979). To form long concatenated molecules with interspersed cos sequences, ligation of vector and insert DNA is performed at high concentration. Linear monomeric genome of appropriate length (see text) can be packaged *in vitro*. The λ -sensitive bacteria are grown in L broth + 0.4 % maltose and concentrated in 0.01 M $MgSO_4$ (HOHN & COLLINS, 1980). Adsorption is at room temperature for 20 min. Then the cells are diluted in L broth, incubated at 37 °C to allow expression of the resistance genes.

Figure 2

Diagramme schématique illustrant deux des stratégies utilisées pour la construction de banques génomiques avec comme vecteur le phage λ (A) ou le cosmid pHC79 (B). L'ADN à haut poids moléculaire (ou ADNC) est d'abord fragmenté par hydrolyse partielle et les

teur cosmide permettant l'insertion d'un fragment d'ADN chromosomique le plus grand possible doit être le plus petit possible puisque la longueur totale de l'ADN qui peut être cloné dans un cosmide est égale à la longueur de λ (37-52 kb) diminuée de la longueur du vecteur (un cosmide de 6 kb permet des insertions de fragments de 30 à 45 kb tandis qu'un cosmide de 10 kb permet des insertions de fragments de 25 à 40 kb).

L'emploi des cosmides permet le clonage de grands morceaux d'ADN dans un plasmide, clonage difficile dans un plasmide vecteur classique du fait de l'efficacité très faible de transformation de *E. coli* ; en même temps, il permet la sélection directe de ces grands morceaux d'ADN puisque le vecteur trop petit et les petites molécules ne peuvent pas être encapsidés. Il faut donc, avant de commencer le clonage, sélectionner ces grands fragments d'ADN afin d'éviter toute incorporation simultanée de plusieurs petits fragments qui, insérés ensemble dans un même cosmide, pourraient constituer ainsi un arrangement non-authentique de gènes : ex *cosmide pHc79* (fig. 1B, 2B ; HOHN & COLLINS, 1980).

pHC79 est un génome de pBR322 dans lequel a été introduit un site de coupure par BglIII. Dans ce site, localisé dans une partie non-essentielle du plasmide, un fragment BglIII qui contient les extrémités cohésives du phage λ Charon 4A (BLATTNER *et al.*, 1977) a été inséré. Le cosmide, rendu linéaire par l'enzyme de restriction Ban HI par exemple, est lié aux fragments Sau 3A (ou autre isoschizomère) d'ADN chromosomique. Comme pour le clonage avec λ , la technique d'encapsulation *in vitro* permet la production de particules phagiques à partir de ces molécules hybrides. Après la transduction d'*E. coli*, rendue possible après traitement au calcium (MANDEL & HIGA, 1970), chaque molécule d'ADN recombinée se comporte comme un plasmide classique et contrôle sa propre réplication. Les transformants sont sélectionnés grâce à l'expression de leurs marqueurs de résistance aux antibiotiques (voir plasmide) ainsi exprimée dans les bactéries transformées.

En permettant le clonage de grands fragments d'ADN, cette technique présente des avantages évidents :

— Une banque génomique complète peut être obtenue avec un nombre relativement petit de clones. Par exemple une banque génomique construite à partir d'un génome nucléaire de mammifères avec des fragments d'en moyenne 40 kb nécessite environ 7×10^4 clones pour être complète avec une probabilité de 95 p. 100 d'obtenir une séquence donnée (à comparer avec 10^6 clones qui seraient nécessaires si la taille moyenne des fragments clonés était de 15 kb).

— Le fait de pouvoir isoler de grandes séquences d'ADN contiguës permet l'étude de groupes de liaison de gènes dans leur intégrité.

— Enfin, ceci devrait permettre l'étude des génomes complexes des plantes supérieures par hybridation *in situ* de régions spécifiques des chromosomes mitotiques.

D. Autres vecteurs

Des vecteurs permettant de propager des gènes dans d'autres bactéries, *Bacillus subtilis*, et dans la levure

Saccharomyces cerevisiae (HOHN & HINNEN, 1980), ont aussi été développés mais leur emploi est encore limité. Sont également disponibles des vecteurs dérivés des virus M13 et fd. (BARNES, 1980).

III. APPLICATION DE LA TECHNIQUE D'HYBRIDATION *IN SITU* AVEC DES SÉQUENCES CLONÉES

L'application récente, dans le cas des chromosomes des plantes, de la technique d'hybridation *in situ* a déjà apporté beaucoup d'informations en ce qui concerne la structure, l'organisation ou l'identification des chromosomes. Jusqu'à présent, la plupart des études ont été menées sur des espèces appartenant à la famille des Gramineae. C'est pourquoi les exemples qui suivent ont été limités à ce groupe.

A. Structure et organisation des chromosomes

Des études biochimiques ont montré que la plupart des séquences de l'ADN répétitif sont mélangées entre elles et avec des séquences uniques (FLAVELL & SMITH, 1976 ; HUTCHINSON *et al.*, 1981). Corrélativement la détection de ces séquences par hybridation *in situ* montre qu'elles ne peuvent pas être localisées avec précision et qu'elles sont dispersées sur les chromosomes (FLAVELL *et al.*, 1981 ; HUTCHINSON *et al.*, 1981). Par contre, d'autres séquences, en particulier les séquences *hautement répétitives*, ont pu être localisées avec précision sur les chromosomes. Chez le blé, en utilisant l'ADN Cot⁻² et l'ADN satellite, la plupart des séquences hautement répétitives ont été localisées sur 9 paires de chromosomes, souvent près du centromère, mais avec aussi quelques sites interstitiels (GERLACH *et al.*, 1978 ; GERLACH & PEACOCK, 1980 ; DENNIS *et al.*, 1980 ; PEACOCK *et al.*, 1981a). En utilisant des progéniteurs diploïdes et des lignées pourvues de marqueurs télacentriques, il a été possible d'identifier les 7 chromosomes du génome B et les séquences des chromosomes 4 et 7 du génome A. D'autres hybridations *in situ* faisant appel à des séquences clonées ont confirmé ces résultats (fig. 3a) et elles ont également permis de mettre en évidence d'autres séquences présentes sur les mêmes chromosomes (HUTCHINSON, 1981 ; HUTCHINSON & LONSDALE, 1982). Des séquences clonées ont en outre été localisées dans les régions télomériques des chromosomes (fig. 3b). Chez le seigle, les séquences hautement répétitives ont été localisées, dans les zones télomériques ou aux extrémités des chromosomes, avec seulement quelques sites interstitiels sur certains chromosomes (APPELS *et al.*, 1978 ; BEDBROOK *et al.*, 1980 ; JONES, 1980 ; APPELS *et al.*, 1981). Ces hybridations *in situ* montrent, comme dans le cas précédent, que chaque site d'hybridation permet d'identifier soit une seule, soit plusieurs familles de séquences répétitives.

Chez de nombreux animaux, une corrélation a pu être établie entre la localisation des séquences répétitives et la localisation de l'hétérochromatine constitutive. Chez le blé, des techniques de coloration ont montré que l'hétérochromatine est localisée pour l'essentiel sur le génome B et le chromosome 4A (GILL & KIMBER, 1974 ; GERLACH, 1977). Une comparaison de la distribution de cette hétérochromatine

Figure 3

3a. Hybridation *in situ* d'une copie d'ARNc (marquée avec ^3H) de la séquence clonée TC22b et des chromosomes mitotiques de *Triticum aestivum*. Les chromosomes sont rangés en groupes homologues pour chaque génome A, B et D.

3a. In situ hybridization of a ^3H -labelled cRNA copy of cloned sequence TC22b with the mitotic chromosomes of *Triticum aestivum*. The chromosomes are arranged in homologous groups within the genomes A, B and D.

3b. Hybridation *in situ* de la séquence hautement répétitive C40 du blé et des chromosomes de *T. aestivum*.

Les détails sur ces sondes se trouvent dans HUTCHINSON & LONSDALE (1982).

3b. In situ hybridization of the C40 sequence in wheat highly repetitive with chromosomes of *T. aestivum*.

Details of both these probes are given in HUTCHINSON & LONSDALE (1982).

avec la distribution des séquences répétitives a permis d'établir une corrélation (DENNIS *et al.*, 1980 ; HUTCHINSON & LONSDALE, 1982). Une telle relation a également été observée pour les séquences répétitives du seigle (APPELS *et al.*, 1978 ; BEDBROOK *et al.*, 1980 ; JONES, 1980). Dans ce dernier cas, la démonstration a été faite directement en hybridant tout d'abord les séquences répétitives du seigle aux chromosomes mitotiques, et ensuite en hybridant *in situ* la

même préparation par la technique du C-banding (HUTCHINSON & SEAL, 1983). Les mêmes corrélations se retrouvent aussi chez le maïs (PEACOCK *et al.*, 1981b).

De telles séquences hautement répétitives ne semblent pas coder pour des protéines. Leur distribution, en parallèle à l'hétérochromatine telle que nous venons de la mentionner peut fournir une explication quant à l'inertie génétique de l'hétérochromatine comparée à l'euchromatine.

Un autre type de séquences répétitives qui sont au contraire transcrites sont celles porteuses des gènes d'ARN ribosomiaux (ARNr). En utilisant la technique d'hybridation *in situ*, ces gènes d'ARNr ont été localisées chez *Phaseolus* (AVANZI *et al.*, 1972 ; BRADY & CLUTTER, 1972 ; DURANT *et al.*, 1977), *Vicia faba* (SCHEUERMANN & KNALMANN, 1975), *Zea mays* (PHILLIPS *et al.*, 1979), *Hordeum vulgare* (GERLACH & BEDBROOK, 1979 ; APPELS *et al.*, 1980) ainsi que chez différentes espèces de *Triticum* et *Aegilops* (GERLACH & BEDBROOK, 1979 ; GERLACH *et al.*, 1980 ; MILLER *et al.*, 1980 ; CARROZZA, 1981 ; HUTCHINSON & MILLER, 1982). La figure 4 montre une hybridation *in situ* typique de chromosomes mitotiques sondés avec des séquences clonées de gènes d'ARNr. Cette figure illustre bien la validité de la technique, en montrant premièrement les variations entre chromosomes du nombre de gènes d'ARNr présent dans chaque groupement (MILLER *et al.*, 1980) et deuxièmement les variations de groupement de gènes d'ARNr entre différentes espèces, puisque les résultats issus de cette technique ne sont pas affectés par l'activité ou l'inac-

Figure 4

Hybridation *in situ* du gène cloné de l'ARN ribosomal et des chromosomes mitotiques de l'espèce tétraploïde *Triticum araraticum*. Deux paires de chromosomes ont été marqués par la sonde.

In situ hybridization of the cloned ribosomal RNA gene with mitotic chromosomes of the tetraploid species *Triticum araraticum*. Two pairs of chromosomes are labelled by the probe.

tivité des gènes comme dans le cas d'autres techniques de coloration.

Toutes ces expériences utilisant comme sonde moléculaire soit les séquences de gènes d'ARNr, soit les séquences hautement répétitives, montrent comme il est possible d'utiliser la technique d'hybridation *in situ* pour étudier la structure, l'organisation et les variations entre chromosomes de plantes.

B. Identification des chromosomes

Une des propriétés de ces séquences hautement répétitives est leur localisation précise sur les chromosomes et sur certains chromosomes seulement (fig. 3a et 3b). De plus, certaines de ces séquences sont présentes dans certaines espèces mais absentes (ou présentes en quantité non décelable) dans d'autres, et, par exemple, une séquence de 480 bp présente à 1×10^6 copies par génome haploïde de *Secale cereale* ne peut être décelée chez le blé (BEDBROOK *et al.*, 1980). En l'utilisant dans des expériences d'hybridation *in situ*, il a été possible de distinguer les chromosomes du seigle de ceux du blé dans les hybrides blé seigle (BEDBROOK *et al.*, 1980). D'autres études ont également montré que cette séquence était absente chez *Hordeum chilense* et qu'il a été possible de reconnaître les chromosomes du seigle de ceux de cette orge dans les métaphases des mitoses de l'hybride F₁ tétraploïde entre ces 2 espèces (fig. 5a).

De plus, la technique d'hybridation *in situ* appliquée à d'autres stades que la métaphase a apporté des informations sur le comportement des chromosomes au cours de la mitose (fig. 5). La position des télomères de seigle a pu être identifiée tout au long de la mitose puisqu'ils sont marqués avec cette séquence répétitive de 480 bp. Cette même séquence a également été utilisée pour distinguer les chromosomes de *S. cereale* de ceux d'*Aegilops* dans leurs hybrides F₁ soit à la mitose, soit à la méiose, ce qui a permis d'étudier l'appariement des chromosomes à la métaphase I de la méiose (HUTCHINSON *et al.*, 1980).

D'autres séquences ont été utilisées pour l'étude de chromosomes à la méiose. En particulier la séquence C40, illustrée sur la figure 3b, a permis d'identifier un chromosome étranger d'*Aegilops sharonensis* chez le blé et d'en étudier l'appariement (MILLER *et al.*, 1981). Les séquences porteuses des gènes d'ARN ribosomiaux sont également très utiles pour l'étude d'appariement de chromosomes à la métaphase I. Elles ont été employées pour l'analyse des hybrides seigle *Aegilops* déjà mentionnée (HUTCHINSON *et al.*, 1980) et plus récemment des hybrides F₁ entre *Triticum timopheevi* et *T. dicoccum* (HUTCHINSON *et al.*, 1982).

IV. CONCLUSION

On voit l'étendue d'utilisation des techniques d'hybridation *in situ* pour identifier les chromosomes des plantes. Cependant, jusqu'à présent leur emploi a été limité : on manque de séquences clonées et la plupart des études ont été faites sur un nombre limité d'espèces, principalement des céréales. Dans l'avenir, ces méthodes devraient permettre de localiser des gènes présents en exemplaire unique sur les chromoso-

Figure 5

Hybridation *in situ* à différentes étapes de la mitose de la séquence de 480 bp hautement répétitive du seigle et du noyau, d'un hybride tétraploïde entre *Hordeum chilense* et *Secale cereale*.

In situ hybridization of a cloned 480 pb highly repetitive sequence from rye with the nucleus, at various stages of mitosis, of a tetraploid hybrid between *Hordeum chilense* and *Secale cereale*.

mes de plantes, comme on l'a déjà fait chez les animaux (RUDDLE, 1981) et on devra pouvoir conduire ces études chez un plus grand nombre d'espèces végétales.

Reçu le 2 novembre 1983.
Accepté le 12 juin 1984.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Appels R., Driscoll C., Peacock W. J.**, 1978. Heterochromatin and highly repeated DNA sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma (Berl.)*, **70**, 67-89.
- Appels R., Gerlach W. L., Dennis E., Swift H., Peacock W. J.**, 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences in coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma (Berl.)*, **78**, 283-311.
- Appels R., Dennis E. S., Smyth D. R., Peacock W. J.**, 1981. Two repeated DNA sequences from heterochromatic regions of rye (*Secale cereale*) chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, **84**, 265-277.
- Avanzi S., Durante M., Cionini P. G., D'Amato F.**, 1972. Cytological localization of ribosomal cistrons in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. *Chromosoma (Berl.)*, **39**, 191-203.
- Bahl C. P., Mariani K. J., Wu R., Stawinsky J., Narang S.**, 1977. A general method for inserting specific DNA sequences into cloning vehicles. *Gene*, **1**, 81.
- Barnes W. M.**, 1980. DNA cloning with single-stranded phage vectors. In 'Genetic Engineering'. Eds. J. K. Setlow & A. Hollaender, Vol. 2, 185-200. Plenum Press, New York.
- Becker A., Gold M.**, 1975. Isolation of the bacteriophage lambda A-gene protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 581-585.
- Bedbrook J. R., Jones J., O'Dell M., Thompson R. D., Flavell R. B.**, 1980. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, **19**, 545-560.
- Benton W. D., Davis R. W.**, Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science*, **196**, 180.
- Bernard H. U., Helinski D. R.**, 1980. Bacterial plasmid cloning vehicles. In 'Genetic Engineering'. Eds. J. K. Setlow & A. Hollaender, Vol. 2, 133-167. Plenum Press, New York.
- Blattner F. R., Williams B. G., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Furlong L., Grunwald J. D., Kiefer D. O., Moore D. D., Schumm J. W., Sheldon E. L., Smithies O.**, 1977. Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science*, **196**, 161.
- Bolivar F., Rodriguez R. L., Betlach M. C., Boyer H. W.**, 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistance derivatives of the plasmid pMB9. *Gene*, **2**, 75-93.
- Bolivar F., Backman K.**, 1980. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. In 'Methods in Enzymology'. Ed. R. Wu, Vol. 68, 245-269. Academic Press, New York.
- Brady T., Clutter M. E.**, 1972. Cytochemical localization of ribosomal cistrons in plant polytene chromosomes. *J. Cell. Biol.*, **53**, 827-832.
- Brammar W. J.**, 1982. Vectors based on bacteriophage lambda. In 'Genetic Engineering'. Ed. R. Williamson, Vol. 3, 53-81. Academic Press, New York.
- Carrozza M. L.**, 1981. Number of sites for ribosomal RNA genes in *Triticum durum*. *In situ* hybridisation on mitotic, meiotic and polytene nuclei. *Z. Pfl.*, **87**, 300-308.
- Clarke L., Carbon J.**, 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, **9**, 91.
- Clewell D. B.**, 1972. Nature of ColE1 plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.*, **110**, 667-676.
- Collins J.**, 1977. Gene cloning with small plasmids. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, **78**, 121-170.
- Collins J., John B.**, 1978. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable *in vitro* in bacteriophage λ heads. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 4242-4247.
- Dahl H. H., Flavell R. A., Grosveld F. G.**, 1981. The use of genomic libraries for the isolation and study of eukaryotic genes. In 'Genetic Engineering'. Ed. R. Williamson, Vol. 2, 49-127. Academic Press, New York.
- Dennis E. S., Gerlach W. L., Peacock W. J.**, 1980. Identical polypyrimidine-polypurine satellite DNAs in wheat and barley. *Heredity*, **44**, 349-366.
- Deumling B., Greilhuber J.**, 1982. Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla sibirica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridisation of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma (Berl.)*, **84**, 535-555.
- Durant M., Cionini P. G., Avanzi S., Cremonini R., D'Amato F.**, 1977. Cytological localization of the genes for the four classes of ribosomal RNA (25S, 18S, 5-8S, and 5S) in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. *Chromosoma (Berl.)*, **60**, 269-282.
- Feiss M., Crayton R. A., Egner C.**, 1977. Packaging of bacteriophage 1 chromosome: effect of chromosome length. *Virology*, **77**, 271-193.
- Flavell R.**, 1980. The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 569-596.
- Flavell R. B., Smith D. B.**, 1976. Nucleotide sequence organisation in the wheat genome. *Heredity*, **37**, 231-252.
- Flavell R. B., O'Dell M., Hutchinson J.**, 1981. Nucleotide sequence organization in plant chromosomes and evidence for sequence translocation during evolution. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **45**, 501-508.
- Gall J. G., Pardue M. L.**, 1971. Nucleic acid hybridisation in cytological preparations. In 'Methods in Enzymology'. Eds. L. Grossman & K. Moldave. Academic Press, New York, NY. Vol. 21, 470-480.
- Gerlach W. L.**, 1977. N-banded karyotypes of wheat species. *Chromosoma (Berl.)*, **62**, 49-56.
- Gerlach W. L., Appels R., Dennis E. S., Peacock W. J.**, 1978. Evolution and analysis of wheat genomes using highly repeated DNA sequences. *Proc. 5th Int. Wheat Genet. Symp.* Ed. S. Ramanaujam, Vol. 1, 81-91.
- Gerlach W. L., Bedbrook J. R.**, 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1869-1886.
- Gerlach W. L., Peacock W. J.**, 1980. Chromosomal locations of highly repeated DNA sequences in wheat. *Heredity*, **44**, 269-276.
- Gerlach W. L., Miller T. E., Flavell R. B.**, 1980. The nucleolus organizers of diploid wheats revealed by *in situ* hybridisation. *Theor. Appl. Genet.*, **58**, 97-100.
- Gerlach W. L., Dennis E. S., Peacock W. J.**, 1982. Molecular cytogenetics of wheat. In 'Cytogenetics of crop plants'. Eds. M. S. Swaminathan, P. K. Gupta, U. Sinha (in press).
- Gill B. S., Kimber G.**, 1974. Giemsa C-banding and the evolution of wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4086-4090.
- Grunstein M., Hogness D.**, 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3961-3965.
- Hendrix R. W.**, 1971. In 'The Bacteriophage Lambda'. Ed. A.D. Hershey, 355-370. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hohn B.**, 1975. DNA as a substrate for packaging in bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.*, **98**, 93-106.
- Hohn B.**, 1979. *In vitro* packaging of λ and cosmid DNA. In 'Methods in Enzymology', ed. R. Wu, 68, 299-309. Ac. Press N. Y.
- Hohn T., Katsura K.**, 1977. In 'Current Topics in Microbiology and Immunology', Vol. 78, 69-110.
- Hohn B., Murray K.**, 1977. Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 3259.
- Hohn B., Collins J.**, 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene*, **11**, 291-298.
- Hohn B., Hinnen A.**, 1980. Cloning with cosmids in *E. coli* and yeast. In « Genetic Engineering », Eds. J. K. Setlow & A. Hollaender, Vol. 2, 169-183. Plenum Press, New York.
- Horowitz M., Guild G. M., Prestidge L. S., Hogness D. S.**, 1980. A new high capacity cosmid vector and its use. *Gene*, **11**, 271-282.
- Hutchinson J.**, 1981. The identification of wheat chromosomes by means of the technique of *in situ* hybridisation of cloned DNA sequences. In « Induced Variability in Plant Breeding ». Proc. Eucarpia, PUDOC, Wageningen, The Netherlands, 42-44.
- Hutchinson J., Chapman W., Miller T. E.**, 1980. Chromosome pairing at meiosis in hybrids between *Aegilops* and *Secale* species: A study by *in situ* hybridisation using cloned DNA. *Heredity*, **45**, 245-254.
- Hutchinson J., Flavell R. B., Jones J.**, 1981. Physical mapping of plant chromosomes by *in situ* hybridisation. In « Genetic Engi-

- neering », Eds. J. K. Setlow & A. Hollaender. Plenum Publishing Co., New York, NY, Vol. 3, 207-222.
- Hutchinson J., Lonsdale D. M., 1982. The chromosomal distribution of cloned highly repetitive sequences from hexaploid wheat. *Heredity*, **48**, 373-378.
- Hutchinson J., Miller T. E., 1982. The nucleolar organisers of tetraploid and hexaploid wheats revealed by *in situ* hybridisation. *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 285-288.
- Hutchinson J., Seal A. G., 1983. A sequential *in situ* hybridisation and C-banding technique. *Heredity*, **51** (2), 507-509.
- Hutchinson J., Miller T. E., Jahier J., Shepherd K., 1982. Comparison of the chromosomes of *Triticum timopheevi* with related wheats using the techniques of C-banding and *in situ* hybridisation. *Theor. Appl. Genet.*, **64**, 31-40.
- Jeffreys A. J., Barrie P. A., Harris S., Fawcett D. H., Nugent Z. J., Boyd A. C., 1982. Isolation and sequence analysis of a hybrid δ -globin pseudogene from the Brown lemur. *J. Mol. Biol.*, **156**, 487-503.
- Jones K. W., 1973. The method of *in situ* hybridization. In « *New Techniques in Biophysics and Cell Biology* », Eds R. H. Pain & B. J. Smith, John Wiley and Sons Ltd., New York and London, Vol. 1, 29-66.
- Jones J., 1980. *Repeated DNA sequences in rye (Secale cereale), wheat (Triticum aestivum) and their relatives*. Ph. D. Thesis, University of Cambridge, UK.
- Klein B., Murray K., 1979. Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonuclease I of *Bacillus amyloliquefaciens* H. *J. Mol. Biol.*, **133**, 289.
- Kramer R. A., Cameron J. R., Davis R., 1976. Isolation of bacteriophage λ containing yeast ribosomal RNA genes : screening by *in situ* RNA hybridization to plaques. *Cell*, **8**, 227-232.
- Loenen W. A. M., Brammar W. J., 1980. A bacteriophage lambda vector for cloning large DNA fragments made with several restriction enzymes. *Gene*, **10**, 249-259.
- Mandel M., Higa A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162. *Gene*, **10**, 249.
- Maniatis T., Hardison R. L., Lacy R., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Sim G. K., Efstradiadis A., 1978. Isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell*, **15**, 687.
- Miller T. E., Gerlach W. L., Flavell R. B., 1980. Nucleolus organiser variation in wheat and rye revealed by *in situ* hybridisation. *Heredity*, **45**, 377-382.
- Miller T. E., Hutchinson J., Chapman V., 1981. Investigation of a preferentially transmitted *Aegilops sharonensis* chromosome in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **61**, 37-33.
- Murray N. E., Murray K., 1974. Manipulations of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature*, **251**, 331.
- Murray K., Murray N. E., 1975. Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonuclease III of *Haemophilus influenzae* and restriction endonuclease I of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **98**, 551.
- Murray N. E., Brammar W. J., Murray K., 1977. Lambdaoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 53.
- Panasenko S. M., Cameron J., Davis R. W., Lehman I. R., 1977. Five hundred fold over-production of DNA ligase after induction of a hybrid lambda lysogen constructed *in vitro*. *Science*, **196**, 188-189.
- Pardue M. L., Gall J. G., 1975. Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. *Meth. Cell. Biol.*, **10**, 1-16.
- Peacock W. J., Lohe A. R., Gerlach W. L., Dunsmutt P., Dennis E. S., Appels R., 1977. Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 1121-1135.
- Peacock W. J., Gerlach W. L., Dennis E. S., 1981a. Molecular aspects of wheat evolution : Repeated DNA sequences, 41-50. In « *Wheat science-today and tomorrow* », Eds. L. T. Evans & W. J. Peacock. Cambridge University Press, UK.
- Peacock W. J., Dennis E. S., Rhoades M. M., Prior A. J., 1981b. Highly repeated DNA sequence limited to knob heterochromatin in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4490-4494.
- Phillips R. L., Wang A. S., Rubenstein I., Park W. D., 1979. Hybridization of ribosomal RNA to maize chromosomes. *Maydica*, **24**, 7-32.
- Pourcel C., Tiollais P., 1977. λ plac 5 derivatives, potential vectors for DNA fragments cleaved by *Sst* I. *Gene*, **1**, 281.
- Pourcel C., Marchal A., Loise A., Fritsch A., Tiollais P., 1979. Bacteriophage lambda — *E. coli* K12 vector, host system for cloning and expressions under lactose promoter control. I. DNA insertion at the lacZ Eco RI restriction site. *Mol. Gen. Genet.*, **170**, 161.
- Ray J. H., Venketeswaran S., 1979. DNA replication, ^3H -cRNA *in situ* hybridisation and C-band patterns in the polycentric chromosomes of *Luzula purpurea* Link. *Chromosoma (Berl.)*, **74**, 337-346.
- Rimm D. L., Horness D., Huicera J., Blattner F. R., 1980. Construction of coliphage lambda Charon vectors with *Bam*HI cloning sites. *Gene*, **12**, 301.
- Ruddle F. H., 1981. A new era in mammalian gene mapping : somatic cell genetics and recombinant DNA methodologies. *Nature*, **294**, 115-120.
- Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K., 1977. Chemical synthesis of restriction enzyme recognition sites useful for cloning. *Science*, **196**, 177.
- Scheuermann W., Knalman M., 1975. Localization of ribosomal cistrons in metaphase chromosomes in *Vicia faba* L. *Exp. Cell Res.*, **90**, 463-465.
- Sgaramella V., 1972. Enzymatic oligomerisation of bacteriophage P22 DNA and of linear Simian Virus 40 DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**, 3389.
- Southern E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503.
- Sternberg N., Tiemeier D., Enquist L., 1977. *In vitro* packaging of a *Dam* vector containing *Eco*RI DNA fragments of *Escherichia coli* and phage P1. *Gene*, **1**, 255.
- Sutcliffe J. G., 1978. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR 322. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **43**, 77-90.
- Szabo P., Elder R., Steffensen D. M., Uhlenbeck O. C., 1977. Quantitative *in situ* hybridisation of ribosomal RNA species to polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, **115**, 539-563.
- Thomas M., Cameron J. R., Davis R. W., 1974. Viable molecular hybrids of bacteriophage λ and eukaryotic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4579-4583.
- Thompson R., 1982. Plasmid and phage M13 cloning vehicles. In « *Genetic Engineering* », Ed. R. Williamson, Vol. 3, 2-41. Academic Press, New York.
- Timmis J. N., Deumling B., Ingle J., 1975. Localisation of satellite DNA sequences in nuclei and chromosomes of two plants. *Nature*, **257**, 152-155.
- Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutrer W. J., Goodman H. M., 1977. Rat insulin genes : construction of plasmids containing the coding sequences. *Science*, **196**, 1313-1319.
- Weaver R. F., Weissmann C., 1979. Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure : the 5' termini of 15S β -globin mRNA precursor and mature 10S β -globin mRNA have identical map coordinates. *Nucl. Acids Res.*, **6**, 1175-1193.
- Weil J., Cunningham R., Martin R., Mitchell B., Bolling B., 1973. Characteristics of λ p4, a λ derivative containing 9 % excess DNA. *Virology*, **50**, 373.
- Wensink P. C., Finnegan D. J., Donelson J. E., Hogness D. S., 1974. A system for mapping DNA sequences in the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, **3**, 315.
- Williams J. G., 1981. The preparation and screening of a cDNA clone bank. In « *Genetic Engineering 2* », Ed. R. Williamson, Vol. 1, 2-55. Academic Press, New York.
- Williams B. G., Blattner F. R., 1980. Bacteriophage lambda vectors for DNA cloning. In « *Genetic Engineering* », Eds. J. K. Setlow & A. Mullaender, Vol. 2, Plenum, N. Y.
- Wimber D. E., Steffensen D. M., 1973. Localization of gene function. *Annu. Rev. Genetics*, **7**, 205-223.
- Wobus U., 1976. Hybridisierung von Nucleinsäuren *in situ*. *Biol. Zbl.*, **95**, 1-24.