

Recherche de marqueurs moléculaires liés à l'embryogenèse somatique chez le pois (*Pisum sativum* L.)

BENCHEIKH M. (1,2)

1-Centre universitaire de Chlef BP 151 2000 Chlef, Algérie

2-Station de génétique végétale, INRA-UPS, Ferme du moulon
91190 Gif/Yvette FRANCE

RESUME :

L'identification de marqueurs RFLP corrélés aux événements séquentiels de l'embryogenèse somatique a d'abord permis de révéler un polymorphisme important entre lignée CL830, connue par sa performance embryogène et l'action de ses gènes récessifs, et la lignée CATION où nous avons mis en évidence l'action défavorable de gènes dominants sur l'aptitude à induire des structures embryonnaires. Ensuite, ces analyses moléculaires ont permis de mettre en évidence 3 marqueurs RFLP liés faiblement à des QTL du caractère en question. Cependant, le passage par la régression multiple permet d'expliquer 44% de la variance de l'embryogenèse somatique. Dans l'hypothèse d'un déterminisme assez simple, ces résultats ne semblent donc pas contradictoires; le marquage a été trop lâche et les gènes impliqués, s'ils sont à effets forts, peuvent se trouver loin des marqueurs.

Mots clés : *Pisum sativum*, embryogenèse somatique, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), QTL (Quantitative Trait Loci).

ABSTRACT :

The identification of the RFLP markers which are correlated to some sequential events of the somatic embryogenesis has first allowed to reveal an important polymorphism between the CL830 line, known by its embryogenic performance and recessive genes and the CATION line which has seen as unfavourable action of the dominant genes on the aptitude to induce embryogenic structures.

Furthermore, these molecular analysis have underscored three RFLP markers weakly linked to the QTL of somatic embryogenesis. However, the use of the progressively multiple regression explains the variance of 44 % in somatic embryogenesis.

If the genetic determination of somatic embryogenesis is not too complex, these results are not in contradictory ; the labeling were very loose and the involved genes, if they are with high effects, can however be far from the markers.

Key words : *Pisum sativum*, somatic embryogenesis, RFLP, QTL.

INTRODUCTION

En amélioration des plantes, l'intérêt de l'embryogenèse somatique comme voie de régénération serait la création de semences artificielles permettant l'exploitation maximale de la variabilité génétique et l'utilisation de l'hétérosis.

Plusieurs facteurs tels que la composition du milieu de base, les régulateurs de croissance, l'explant affectent l'expression morphogénétique *in vitro*. Cependant, beaucoup d'auteurs ont montré que seuls quelques génotypes possèderaient la capacité à induire des embryons. Cette capacité, chez beaucoup d'espèces, serait génétiquement contrôlée (George et Sherrington, 1984).

Chez les légumineuses, et plus particulièrement chez *Medicago sativa* Bingham et al., (1975) et Ray et Bingham (1989) ont réussi à augmenter la fréquence embryogène de 10 à 67% et de 33 à 66% respectivement après deux cycles de sélection récurrente. Brown et Atanassov (1985) mettent en évidence un nombre plus élevé de gènes dans le contrôle de l'embryogenèse somatique.

Chez le pois, l'étude de la ségrégation d'une génération F₂, issue d'un croisement entre deux lignées extrêmes (fort et faible aptitude embryogène), semble confirmer l'hypothèse d'un déterminisme génétique relativement simple avec peu de locus en jeu (Bencheikh et Gallais, 1996).

Le développement récent des techniques RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) permet l'iden-

tification de marqueurs moléculaires par analyse des variations de longueur des fragments de restriction.

Cette technique a été utilisée pour la première fois comme outil moléculaire par Grodzicker et al., (1974) sur l'adénovirus et a été ensuite largement décrite par Bottstein et al., (1980). Ces variations peuvent être dûes soit à une mutation ponctuelle dans un site de restriction, soit à une délétion/addition d'une petite séquence d'ADN. Des cartes de liaisons génétiques ont été établies grâce à l'utilisation de cette technique moléculaire et on peut espérer trouver des marqueurs liés à n'importe quel gène étudié.

De plus, les marqueurs RFLP sont souvent codominants et fournissent donc une information particulièrement intéressante dans le cas de sélection pour un gène récessif.

Enfin, la technique RFLP peut être utilisée pour obtenir des marqueurs liés à des locus affectant des caractères quantitatifs ou QTL (Quantitative Trait Loci). Le principe de la détection de QTL est simple : les individus d'une descendance caractérisée par RFLP sont mesurés pour les caractères étudiés, puis des corrélations sont recherchées entre les marqueurs et les caractères.

Il apparaît donc particulièrement intéressant de voir sur des populations en ségrégation (F₂), issues du croisement entre deux lignées très différentes, si avec des techniques de marquage de l'ADN nucléaire (RFLP), il serait possible d'identifier les gènes en

cause. Dans cet article nous présentons les premiers résultats d'une étude sur la recherche de marqueurs moléculaires (RFLP) en liaison avec des locus impliqués dans la variation du caractère embryogénèse somatique chez le pois.

MATERIEL ET METHODES

1 - Recherche de marqueurs génomiques :

a) *Matériel végétal :*

Les analyses RFLP ont été réalisées sur une descendance en ségrégation de type F₂ issue du croisement entre deux lignées CL830, à fort pouvoir embryogène, et CATION à faible pouvoir embryogène.

Des morceaux de tige et des feuilles âgées de 3 semaines ont été prélevés sur des plantes dont les apex avaient préalablement servi à l'évaluation de l'aptitude de l'embryogénèse somatique. Ils ont ensuite été placés dans du papier d'aluminium puis conservés dans l'azote liquide.

68 familles ou plantes F₂ ont servi dans cette étude. Chaque famille F₂ est représentée par 18 plantes F₃ en moyenne.

b) *Extraction de l'ADN :*

Les feuilles sont broyées très finement dans un mortier (préalablement refroidi) contenant de l'azote liquide. La poudre obtenue est récupérée dans un tube Falcon de 50 ml contenant 18

ml de tampon d'extraction, puis mis à incuber à 65°C pendant 15 à 30 minutes avec agitation lente.

Les protéines et les pigments sont séparés des acides nucléiques par action de NaCl (solution saturée > 6N). Après centrifugation à 3500 rpm (20 minutes) le surnageant est filtré dans un tube de 50 ml. A la phase aqueuse on ajoute un volume de 2/3 d'isopropanol froid (conservé à -20°C) afin de précipiter les acides nucléiques. Si la précipitation n'est pas perceptible, on conserve les tubes à 4°C pendant une nuit.

Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3500 rpm, puis le culot, légèrement séché, est resuspendu dans 2 ml de TEN contenant 1 mg/ml de RNaseA. La solution est placée à 37°C pendant une heure. L'ADN est précipité par 5 ml d'éthanol absolu et mélangé par inversion. Il est ensuite prélevé et placé dans un tube de 15 ml contenant 10 ml d'un tampon de lavage I : on incube pendant 20 minutes à température ambiante. Après élimination du surnageant, le culot est lavé à nouveau par 2 ml de tampon de lavage II, puis centrifugé à 3500 rpm. L'ADN, après élimination du surnageant et évaporation de l'éthanol, est resuspendu dans 0,5 à 1 ml de tampon TE.

c) *Digestion de l'ADN :*

Pour les hybridations, les enzymes de restriction EcoRI et HindIII ont été utilisées pour digérer l'ADN des deux parents et celui de la descendance.

d) Electrophorèse sur gel d'agarose :

La séparation des fragments d'ADN est réalisée dans un gel d'agarose à 0,7% dans le tampon TPE.

e) Transfert de l'ADN de type Southern (1975) :

L'ADN est dépuriné partiellement dans un titre d'HCL à 0,25 N, pendant 10 minutes, puis le gel est rincé à l'eau distillée. Le transfert de type alcalin est réalisé dans une solution NaOH, 0,4 M qui dénature l'ADN. Celui-ci est entraîné par capillarité entre une éponge saturée en soude et une éponge à peine humide.

Les sondes utilisées pour les analyses RFLP sont des fragments d'ADN génomiques de pois obtenus par digestion de l'ADN par l'enzyme PstI puis clonage dans le plasmide pUc ou le phage M13 (P. Issac, Nickerson society, Cambridge). Les fragments ont été multipliés par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction).

f) Dénucléotidisation des sondes :

Les nucléotides et les amorces, en excès, non incorporés lors de la polymérisation, sont éliminés sur colonne de Sephadex G 50 en microtubes. Cette opération évite l'incorporation de nucléotides froids lors de la réaction de marquage.

g) Marquage des sondes :

La technique de marquage par élongation d'amorce aléatoire ("random priming") décrite par Feinberg et Vogelstein (1984) et Hodgson et Fisk (1987) a été retenue.

h) Préhydratation, hybridation :

La méthode utilisée est celle mise au point par Church et Gilbert (1984).

2-Analyse des données :

a) Réalisation de cartes de liaisons génétiques entre marqueurs RFLP :

Les données obtenues par la méthode de RFLP ont été analysées à l'aide du logiciel Mapmaker. Celui-ci permet d'effectuer une analyse multipoints sur plusieurs marqueurs. Pour déterminer les marqueurs liés entre eux, une analyse deux points est entreprise sur l'ensemble des marqueurs. Pour chaque couple de marqueurs, le pourcentage de recombinaison, la distance en cM et la valeur du LOD* score sont estimés. La distance entre marqueurs est calculée à partir du pourcentage de recombinaison en utilisant la transformation de Kosambi (1944) qui a l'avantage de faire un meilleur ajustement des données (Crow et Dove, 1991).

LOD score = Log 10

Probabilité d'observer les résultats
en présence d'une liaison

Probabilité d'observer les résultats
en l'absence d'une liaison

A partir de l'analyse deux points, des groupes de liaisons peuvent être établis suivant le pourcentage de recombinaison maximal que l'on impose et un LOD minimal que l'on détermine.

Par ailleurs, on peut déterminer des groupes de liaisons présentant le maximum de vraisemblance sur un

groupe de marqueurs préalablement déterminés. Les marqueurs non proches et présentant un LOD score élevé seront sélectionnés. Une carte de liaison génétique effectuée de proche en proche peut ainsi être établie entre les différents marqueurs. Une vérification de l'ordre des marqueurs doit toutefois être réalisée avec des tests trois points.

b) Recherche de QTL :

Deux méthodes peuvent être utilisées pour la recherche de QTL : l'une statistique et l'autre probabiliste. Seule la première méthode, qui consiste à effectuer des analyses de variance, a été retenue. Pour chaque marqueur, les individus F₂ sont répartis en trois classes génotypiques A1A1 (génotype de CL830), A1A2 (génotype de l'hybride) et A2A2 (génotype de CATION). On observe ensuite si les moyennes pour un même caractère sont statistiquement différentes. Dans ce cas, on conclura sur l'existence d'un QTL en ségrégation au voisinage du marqueur considéré : une des formes alléliques du QTL est liée à A1, l'autre à A2. Les calculs ont été entrepris à l'aide du programme SAS (proc GLM).

RESULTATS :

1-Analyse du polymorphisme entre les deux lignées parentales CL830 et CATION :

Sur les 29 sondes informatives parmi les 31 testées, 18 ont révélé du poly-

morphisme, soit plus de 62% en regroupant les résultats des 2 enzymes. Avec l'enzyme EcoRI, 14 sondes polymorphes sur les 29 ont été révélées, soit 48%. Des proportions légèrement différentes sont obtenues avec l'enzyme HindIII où l'on dénombre 15 sondes polymorphes, soit 52%. Parmi les 29 sondes informatives, 10 révèlent un polymorphisme avec les deux enzymes (Tableau I).

Les profils obtenus sont très différents d'une sonde à l'autre et plusieurs types de polymorphisme sont observés :

- une bande est présente chez les deux parents mais avec des intensités différentes : les fragments homologues à la sonde sont probablement présents en nombre différent chez les deux lignées parentales,
- présence d'une bande spécifique à l'un des deux parents : le polymorphisme résulte de la délétion d'un fragment comprenant la région homologue à la sonde chez l'autre parent,
- présence d'une bande chez l'une des deux lignées et absence chez l'autre et inversement : le polymorphisme est dû, soit à une substitution dans le site de restriction de l'enzyme, soit à une insertion ou une délétion à l'intérieur d'un fragment de restriction,
- présence de nombreuses bandes dont une ou plusieurs d'entre elles sont polymorphes : la sonde s'hybride avec plusieurs fragments de différentes tailles, le polymorphisme observé peut résulter des différentes situations décrites précédemment (figure 1).

On teste l'hypothèse d'indépendance entre le polymorphisme révélé par les 2 enzymes avec le X^2 à un degré de liberté (Tableau I). La valeur du X^2 étant de 4,21 au seuil de 5% est rejetée, ce qui indique une liaison entre le polymorphisme révélé avec l'un et l'autre enzyme. Le polymorphisme détecté est donc dû, à la fois à des phénomènes d'insertion ou de délétion ainsi qu'à la présence de mutations au niveau du site de restriction de l'enzyme.

2-Analyse de la descendance F₂ :

a) Analyse des profils :

Différents types de profils obtenus sont représentés dans la fig. 2.

- Profils présentant une bande polymorphe spécifique à l'un des deux parents.
- Profils comprenant 2 bandes polymorphes avec l'une présente chez CL830 et l'autre chez CATION.
- Profils multibandes.

b) Test de ségrégation monogénétique pour chacun des marqueurs :

Pour chacun des 30 marqueurs RFLP révélés, nous avons recherché si la ségrégation était de type monogénétique, avec les proportions 1:2:1 pour les marqueurs codominants et 1:3 pour les marqueurs dominants. Les résultats (Tableau III) montrent une distorsion de ségrégation chez 10 des 24

marqueurs dominants; le X^2 étant significatif pour les marqueurs 35-2 et 35-3, 48-1, 75-2, 94-1 et 94-3, 252, 254-1 et 254-4 et 265-4. Pour les marqueurs RFLP codominants, seul le marqueur 131-2 montre une distorsion de ségrégation qui serait probablement liée à des problèmes de lecture. En effet, lorsque l'intensité des bandes révélées est faible, les individus pour lesquels on ne distingue pas de bande, sont notés comme des individus manquants, on ne peut pas conclure entre l'absence de la bande ou sa non détection. Pour les marqueurs dominants, les distorsions mises en évidence ont souvent dans le sens d'un excès de génotypes récessifs, c'est à dire absence de bandes.

c) Distance entre marqueurs liés :

Avec un LOD de 3 et un taux de recombinaison de 0.2, on distingue :
-12 marqueurs indépendants dont 11 molécules (48-1, 75-1, 2,94-3 et 4,131-2, 257,263, 265-2 et 3,299),
-4 couples de marqueurs (48-2,96), (51,94-2), (94-1,166) et (284,269) avec des distances respectives de l'ordre de 9,27,28 et 11cM,

-1 groupe de liaison composé de 11 marqueurs (35-1,2 et 3,131-1,252,254-1,2,3 et 4 et 265-1 et 4). L'ordre des marqueurs n'a pu être établi avec certitude (différence de LOD entre 2 ordres) probablement

à cause du nombre élevé des marqueurs dominants et des distances relativement importantes. Néanmoins, plusieurs tests multipoints ont été effectués et ont permis l'établissement d'un ordre approximatif avec les distances respectives entre marqueurs de ce groupe.

d) Recherche de QTL (*Quantitative Trait Loci*) :

Les valeurs de F et de R^2 pour les différents couples embryogenèse somatique-marqueur moléculaire, significatives à un risque de 5% sont consignés dans le tableau II. Au niveau des effets génétiques, les résultats obtenus ne vont pas dans le sens de l'analyse quantitative menée par Bencheikh et Gallais (1996) et ceci peut s'expliquer par le nombre faible de marqueurs utilisé dans la recherche de QTL. En effet, le marqueur 75-2 indique la présence d'allèles positifs chez le parent

CATION mais à la limite de la signification. Le marqueur 75-1 confirme la supériorité du parent CL830 par rapport au génotype faiblement régénérant. Enfin, chez le marqueur 131-1 l'hybride est supérieur aux deux génotypes parentaux.

Pour la variable embryogenèse somatique, 3 marqueurs liés à des QTL ont été mis en évidence; il s'agit des marqueurs indépendants 75-1, 75-2 et du marqueur 131-2 lié aux marqueurs 252 et 265-1 mais de façon non significative. Cependant, le passage par une régression multiple progressive apporte d'autres résultats. En effet, en établissant un nouveau fichier, avec l'élimination des marqueurs (8) et des individus (8) présentant des données manquantes, on arrive à mettre en évidence 6 marqueurs qui interviennent dans la régression, ils expliquent au total 44% de la variance de l'embryogenèse somatique.

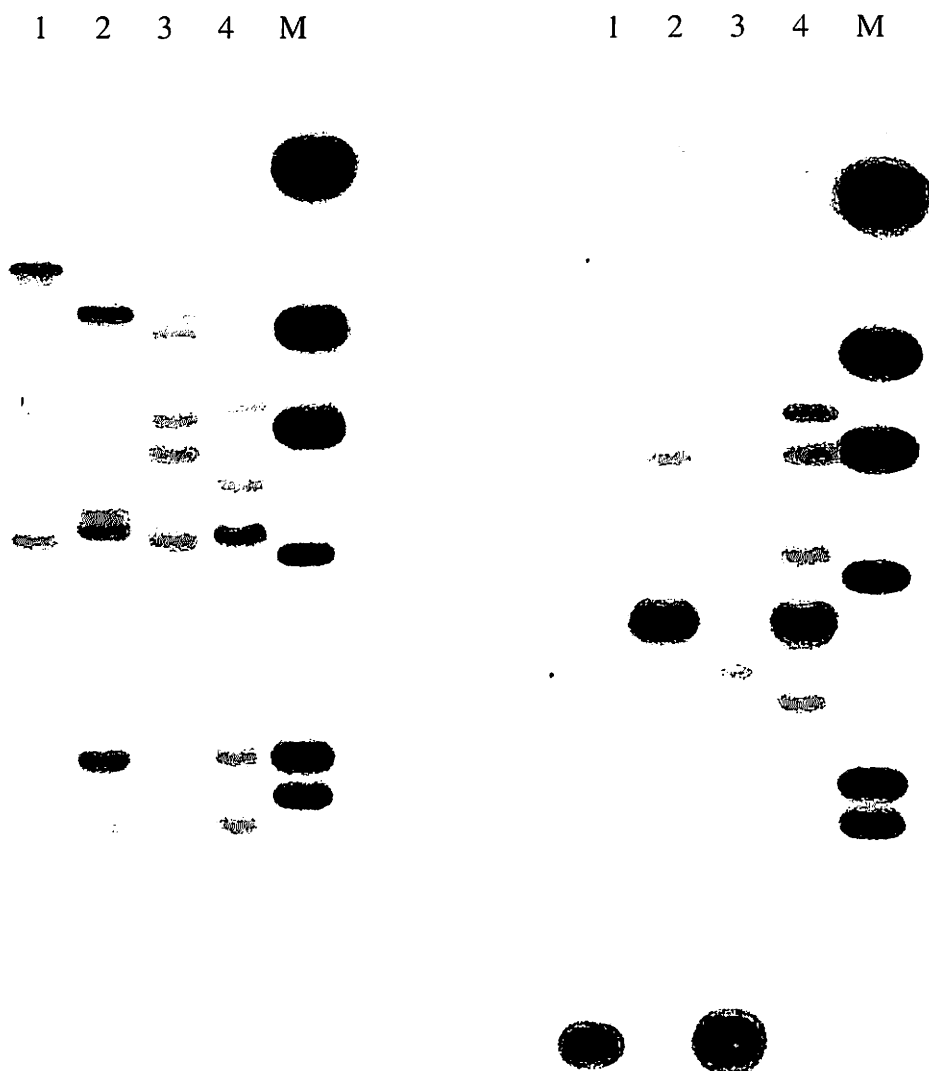


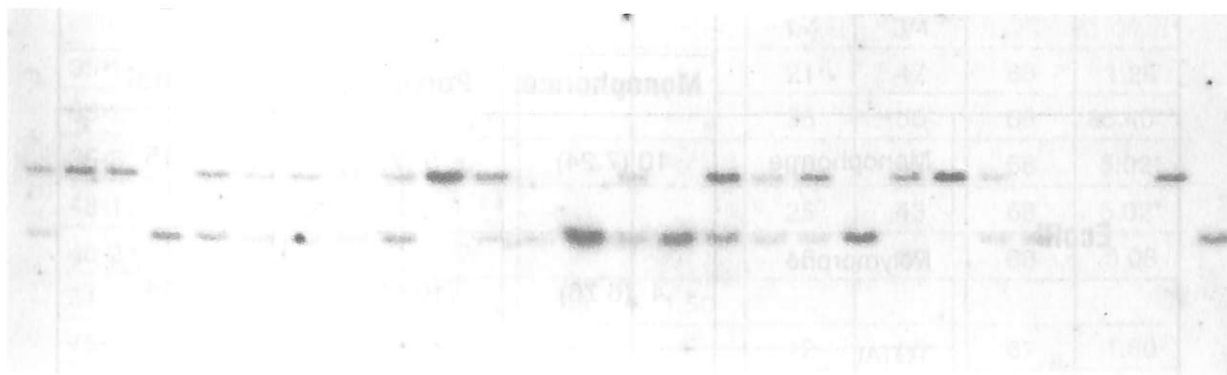
Figure 1 : Profils RFLP obtenus avec les sondes 265 (A) et 254 (B) sur les parents CL830 et CATION.

1 et 2 : CL830 digéré par EcoRI (1) HindIII (2)

3 et 4 : CATION digéré par EcoRI (3) et HindIII (4)

(M) : Marqueur de poids moléculaire.

CL830
CATION



CL830
CATION

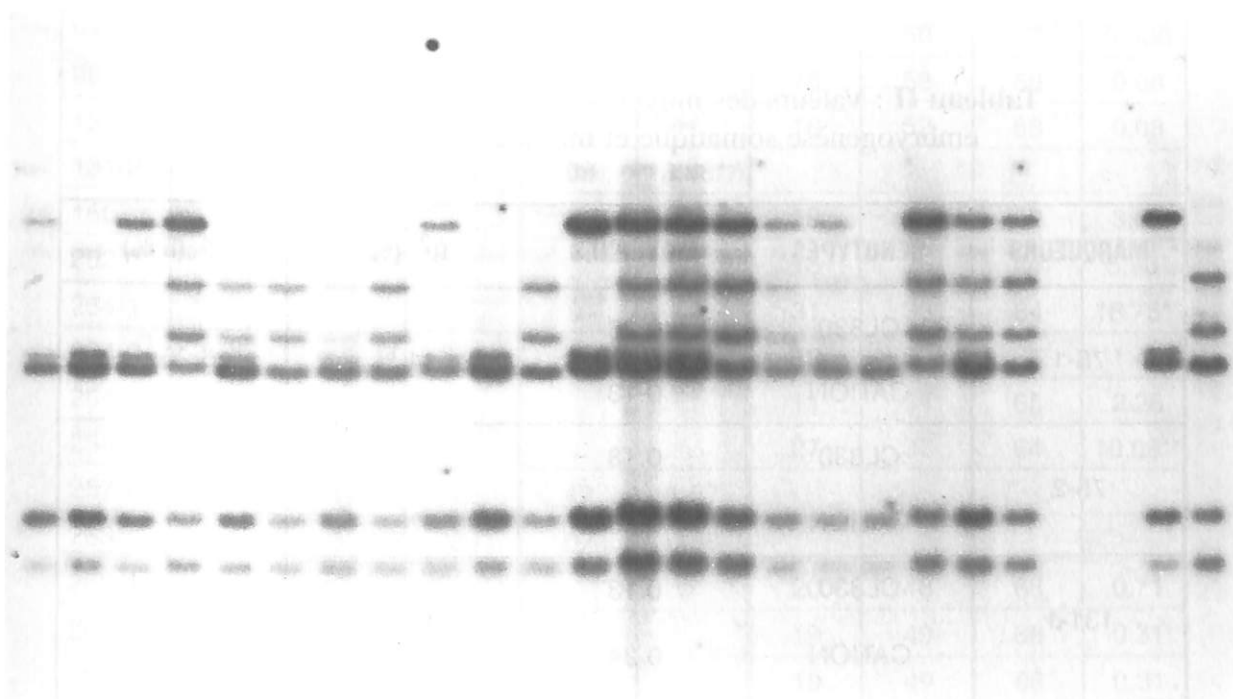


Figure 2 : Profils RFLP observés sur la descendance F2
 'A' : Profil comprenant 2 bandes polymorphes, l'une présente chez CL830, l'autre chez CATION
 'B' : Profil multibande

Tableau I : Nombre de sondes monophormes et polymorphes révélées par les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* chez les parents CL830 et CATION.

		HindIII		
		Monophorme	Polymorphe	Total
EcoRI	Monophorme	10 (7.24)	5 (7.76)	15
	Polymorphe	4 (6.76)	10 (7.24)	14
	TOTAL	14	15	29

Tableau II : Valeurs des moyennes, R^2 et F pour les couples embryogénèse somatique et marqueur moléculaire.

MARQUEURS	GENOTYPES	MOYENNES	R^2 (%)	F (5 %)
75-1	CL830	0.28	11 %	6.25 ns
	CATION	0.13		
75-2	CL830	0.18	7 %	4.04 ns
	CATION	0.28		
131-1	CL830	0.13	15 %	4.40 ns
	CATION	0.24		
	HYBRIDE	0.31		

Tableau III : Analyse des ségrégations pour les différents marqueurs RFLP

	MARQUEURS CODOMINANTS					MARQUEURS DOMINANTS			
	a/a	a/b	b/b	TOTAL	X ²	a/a	A/a+A/A	TOTAL	X ²
	1/4	1/2	1/4			1/4	3/4		
35-1						21	47	68	1.25
35-2						35	33	68	25.40**
35-3						25	43	68	5.02*
48-1						25	43	68	5.02*
48-2						18	50	68	0.08
51	14	39	15	68	1.50				
75-1						12	55	67	1.80
75-2						27	41	68	7.84**
94-1						25	43	68	5.02*
94-2						15	50	65	0.13
94-3						41	24	65	50.27**
94-4						17	50	67	0.005
96						18	58	68	0.08
131-1						16	52	68	0.08
131-2	14	30	24	68	3.88*				
166						19	33	52	3.69
252						18	26	44	5.93*
254-1						31	33	64	18.75**
254-2						12	53	65	1.48
254-3						11	54	65	2.26
254-4						27	37	64	10.08**
257	13	17	12	42	1.57				
263	16	31	20	67	0.85				
265-1						20	48	68	0.71
265-2						19	49	68	0.31
265-3						19	49	68	0.31
265-4						24	43	67	4.18*
269						14	29	43	1.31
284	17	32	19	68	0.35				
299	16	29	16	61	0.15				

DISCUSSION

Bien que le nombre de sondes testées soit réduit, il a été possible de mettre en évidence un polymorphisme important entre les lignées parentales CL830 et CATION. En effet, avec les 2 endonucléases de restriction EcoRI et HindIII 61% des sondes homologues se sont avérées polymorphes.

Ce résultat s'explique par les différences morphologiques et biologiques qui caractérisent les 2 parents et démontre la diversité génétique présente dans l'espèce *Pisum sativum*. En effet, CL830 est une lignée fasciée, possédant un feuillage de type afila et est utilisée comme pois protéagineux alors que la lignée CATION, faiblement régénérante, est caractérisée par un feuillage normal, une sensibilité aux maladies cryptogamiques (anthracnose, fusariose et mildiou) et est utilisée comme pois potager.

La variabilité révélée est d'autant plus inattendue que le pois, plante autogame, est connu comme étant moins polymorphe que les plantes allogames. En effet, l'autogamie induisant l'homozygotie, les individus renfermant des allèles défavorables, contribuant à la diversité génétique, sont éliminés par sélection naturelle. Chez la lentille (*Lens culinaris*), autogame, très peu de variations génétiques ont pu être détectées par RFLP (Havey et Muehlbauer, 1989).

Le polymorphisme détecté grâce à l'utilisation de ces deux enzymes de restriction serait, non seulement dû à

des mutations de type insertion-délétion de fragments d'ADN, mais peut aussi correspondre à une fréquence élevée de variations dues à des mutations ponctuelles. Chez *Triticum tauschii*, Gill et al., (1991) ont mis en évidence des variations résultant d'insertion-délétion et de mutations ponctuelles, dans des proportions similaires.

Les 30 marqueurs moléculaires ont été mis en évidence avec seulement 16 sondes : 5 correspondent à des marqueurs codominants, 4 à des marqueurs dominants et 7 sont des sondes révélant plusieurs locus. Ces marqueurs ont permis d'identifier un grand groupe de liaisons composé de 11 marqueurs et 4 couples de marqueurs liés; 12 marqueurs restent indépendants. Le nombre de marqueurs est insuffisant pour saturer le génome de pois. Selon Ellis et al., (1992), la taille du génome de pois serait de l'ordre de 1700 cM et les distances entre les 30 marqueurs révélés serait d'autant plus grande qu'elle explique ainsi le grand nombre de marqueurs indépendants.

Néanmoins et comparativement aux résultats obtenus par Dirlwanger (1991), les sondes répertoriées polymorphes pour la recherche de marqueurs moléculaires liés à des gènes de résistance à 4 maladies, le sont aussi en majorité dans notre cas.

Cette partie de l'expérimentation a permis de mettre en évidence 3 marqueurs liés au caractère embryogénèse

somatique. Cependant les coefficients R^2 des QTL mis en évidence demeureraient très faibles avec des valeurs respectives de 11, 7 et 15%. Cependant, avec 6 marqueurs 44% de la variation est expliquée par l'embryogenèse somatique.

La faible densité de marquage ne nous permet pas de faire la distinction entre un marqueur fortement lié au QTL de l'embryogenèse somatique mais à effet faible et un marqueur distant d'un QTL, mais ayant un effet fort. Seule la saturation du génome, pour tenter de localiser le ou les gènes à effets forts détectés au niveau de l'analyse quantitative, qui passe par la cartographie d'un nombre élevé de marqueurs pourrait améliorer les coefficients R^2 . En effet, Ellis et al., (1989) estiment que la carte saturée du pois peut être obtenue avec 125 marqueurs répartis aléatoirement. Une fois la carte saturée, il serait préférable de sélectionner les sondes permettant de localiser les marqueurs **codominants** pour pouvoir estimer les effets d'additivité et de dominance et détecter ensuite d'éventuels QTL liés à la régénération *in vitro*.

Dans l'hypothèse d'un déterminisme génétique assez simple, par exemple deux locus à effets forts, avec un assez faible nombre de marqueurs, la probabilité de passer à côté de ces deux locus est assez forte. Les résultats obtenus ne sont donc pas contradictoires avec notre hypothèse d'un déterminisme génétique relativement

simple (Bencheikh et Gallais, 1996). On peut aussi conclure que les locus recherchés ne sont pas sur le groupe de liaison où 11 marqueurs ont été répertoriés. Un marquage plus dense devrait permettre de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Références bibliographiques :

Bencheikh, M et Gallais, A. 1996.

Somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L. and *Pisum arvense* L.) : Diallel analysis and genetic control. *Euphytica*. 90:257-264

Bingham, E.T., Hurley, L.V, Kaatz, D.M, et Sauders, J.W. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop. Sci.* 15:719-721.

Bottstein, D., White, G.F., Skolnick, M., et Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.

Brown, D.C.W., et Anatasov, A. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in medicago. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:111-122.

Crow, J.F., et Dove, W.F. 1990.

Perspectives. Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. Mapping function. *genetics*. 125:669-671.

Dirlwanger, E. 1991. Recherche de marqueurs moléculaires liés à des gènes de résistance à quatre maladies du pois (*Pisum sativum* L.) : fusariose, oidium, anthracnose et mosaïque commune du pois. Thèse de l'université de Paris XI Orsay. 132p.

- Ellis, T.H.N., Turner, L., Lee, D., Ceary, W., Hellens, R., et Davies, D.R. 1989.** Genetic mapping in wheat and peas. IPSR. Annual. Report. 4-5.
- Ellis, T.H.N., Turner, R.P., Lee, D., Harker, C.L., Enard, C., Domoney, C., et Davies, D.R. 1992.** Linkage maps in pea. *Genetics*: 649-663.
- Feinberg, A.P., et Vogelstein, B. 1984.** Addendum. *Anal Biochem.* 137:266-267.
- George, E.F., et Sherrington, P.D. 1984.** Plant propagation by tissue culture. *Exegetics Ltd, England*. pp. 125-129.
- Gills, K.S., Lubbers, E.L., Gill, B.S., Raupp, W.J., et Cox, T.S. 1991.** A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD). *Genome*. 34:362-374.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P., et Sambrook, J. 1974.** Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Gold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.* 39:439-446.
- Havey, M.J., et Muehlbauer, F.J. 1989.** Variability for restriction fragment lengths and phylogenies in lentil. *Theor. Appl. Genet.* 77:839-843.
- Hodgson, C.P., et Fisk, R.Z. 1987.** Hybridization probe size control: optimized oligolabelling. *Nucleic. Acids Res.* 15:6295.
- Kosambi, D.D 1944.** The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175.
- Ray, I.M., et Bingham, E.T. 1989.** Breeding diploid alfalfa for regeneration from tissue culture. *Crop. Sci.* 29:1545-48.
- Southern, E.M. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.