

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie et Génomique Végétale

Intitulé :

**La sélection assistée par marqueurs moléculaires de type
SSR pour l'amélioration du blé tendre (*Triticum aestivum*)
vis-à-vis la résistance aux rouilles.**

Présenté et soutenu par : GRINE Nour El Houda.

Le : 16/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. BENBELKACEM Abdelkader. M.R. « A » INRAA

Rapporteur : Mr. KELLOU Kamel. M.A.A U.F.M Constantine

Mme. DJENADI Chafika Attachée de Recherche INRA Algérie

Examineurs : Mme. KACEM Nadia Sandra M.A.A U.F.M Constantine

*Année universitaire
2014 – 2015*

Dédicace

*A Papy et Mamie,
A mes très chers parents,*

A mon frère Billel,

A mes sœurs Lamis et Chahd,

A ma grande famille,

Nour.

Remerciement

Je tiens à remercier en tout premier lieu mes promoteurs qui ont dirigé cette thèse,

Mr. KELLOU K. pour avoir encadrer ma thèse, vos orientations et suggestions m'ont été très utile.

Mme. DJENNADI C. pour avoir m'orienter dans mes travaux et me faire découvrir le monde de la recherche. J'ai beaucoup appris à votre côté tant scientifiquement que personnellement.

Pour tout cela je les remercie vivement. «C'était très agréable de bosser avec vous» Et grand merci d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie également,

Mr. BENBELKACEM A. d'avoir accepté de présider le jury.

Mme. KACEM N. S. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements sont adressés pareillement à tous mes enseignants et à toute l'équipe BTGV y compris mes amis de la promo.

Une pensée également pour mes collègues de l'INRAA, mes tantes et mes amis.

Résumé

Afin d'optimiser la gestion des résistances aux maladies du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) dans les programmes d'amélioration variétale, il est devenu nécessaire d'utiliser la sélection assistée par marqueur (SAM) pour l'amélioration de cette espèce vis-à-vis les maladies fongiques, plus précisément les rouilles (jaune, brune et noir). Notre étude a été réalisée sur population F₂ issue du croisement entre *Nesse rdwarf* et *Dharwar dry /Nesser* par des marqueurs moléculaires de type SSR ; *Xwmc432*, *Xwmc89*, *Xwmc44*, *Xwmc140*, *Xgdm33*, *Xgwm261*, *Xgwm136*, *Xpsp2992* et *Stb2 Xgwm389*, liés à des caractères d'intérêt pour le blé tendre (résistance à la rouille brune et jaune (*Lr46-Yr29*), résistance à la cécidomyie (*Stb2*), au nanisme (*Rht*), allèles de qualité technologique (*Glu3*) et tolérance à la sécheresse) dans des fonds génétiques différents des variétés témoins *Annuelot*, *Stylet*, *Dahrawar* et *Rojo Yoko* et sur les variétés parentales. Les résultats ont montrés un polymorphisme entre les deux variétés pour *Xgwm261*, *Xwmc44*, *Xgwm140*, *Xpsp2999* et *Xwmc89* soit pour les gènes : *Lr46*, *Rht* et *Glu*. L'analyse des F₂ pour *Lr34* « slow rusting gene » n'a montré aucune ségrégation hétérozygotie entre les individus.

Mots clés : *Triticum aestivum*, F₂, SAM, Marqueurs moléculaires, SSR, Rouilles.

Abstract

To optimize the management of resistance to wheat diseases (*Triticum aestivum* L.) in breeding programs, it has become necessary to use marker assisted selection (MAS) for the improvement of this species, facing fungal diseases, specifically the rusts (Yellow, Brown and Black). Our study was carried out on F₂ population derived from the cross between *Nesserdwarf* and *Dharwar dry /Nesser* by SSR molecular markers ; *Xwmc432*, *Xwmc89*, *Xwmc44*, *Xwmc140*, *Xgdm33*, *Xgwm261*, *Xgwm136*, *Xpsp2992* and *Stb2 Xgwm389*, linked to interest traits (brown and yellow rust resistance (Lr46-Yr29), midge resistance (STB2), dwarfism (Rht), alleles of technological quality (Glu 3) and drought tolerance) in different genetic backgrounds of witnesses varieties ; *Annuelot*, *Stylet*, *Dahrawar* et *Rojo Yoko* and parent varieties. The results showed polymorphism between the two varieties for *Xgwm261*, *Xwmc44*, *Xgwm140*, *Xpsp2999* and *Xwmc89* either for the genes: Lr46, Rht and Glu. Analysis of F₂ to Lr34 "slow rusting gene" showed no segregation heterozygosity between individuals.

Key words: *Triticum aestivum*, F₂, MAS, Molecular markers, SSR, Rusts.

الملخص

لتحقيق أقصى قدر من المقاومة لإمراض القمح اللين في برامج تحسين الأصناف, أصبح من الضروري الاختيار بمساعدة الواسمات (SAM) لتطوير هذه الأنواع ضد الأمراض الفطرية, على وجه التحديد الصدأ (الأصفر و البني و الأسود). وقد أجريت دراستنا على عينة من أفراد الجيل الثاني الناتجة عن التهجين بين *Nesserdwar* و *Dharwar Dry/Nesser* بواسطة الواسمات من نوع SSR ; *Stb2* و *Xwmc432*, *Xwmc89*, *Xwmc44*, *Xwmc140*, *Xgdm33*, *Xgwm261*, *Xgwm136*, *Xpsp2992* و *Xgwm389* ترتبط بالصفات التي تهم القمح اللين مقاومة الصدأ (البني و الأصفر) (Lr46-Yr29) مقاومة الدبابة (RHT) التقزم (GLU3) النوعية التكنولوجية و تحمل الجفاف في خلفيات وراثية مختلفة من الشهود *Rojo Yoko* و *Annuelot*, *Stylet*, *Dahrawar* .

أظهرت النتائج التعدد بين الصنفين من اجل *Xgwm261*, *Xwmc44*, *Xgwm140*, *Xpsp2999* و *Xwmc89* عن الجينات LR46, RHT و GLU تحليل F2 من اجل LR34 (جين الصدأ البطيء) لم تظهر أي تغاير بين الأفراد .

الكلمات المفتاحية : القمح اللين, الجيل الثاني, الاختيار بمساعدة الواسمات, صدأ الحبوب, الواسمات.

Liste des abréviations

ADN: L'Acide Désoxyribonucléique.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism; Polymorphisme de longueur de fragments d'amplification.

Amorce F : Amorce Forward; Amorce sens.

Amorce R : Amorce Reverse; Amorce anti-sens.

APR : Adult Plant Resistance gene ; Gène de résistance adulte.

ARN : L'Acide Ribonucléique.

BC : Les populations issues de rétrocroisements ou backcross.

BET : Bromide Ethidium.

CIMMYT : International Maize and Wheat Improvement Center.

CTAB : Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide.

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

F₂ : Deuxième génération du croisement.

FAO: Food and Agriculture Organization.

Glu: Gène de qualité.

Gnis : Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants.

H₂O UP : Eau ultra pure.

Ha: Hectare.

HD : Les haploïdes doublés.

ICARDA: International Center for Agricultural Research in the Dry Area.

INRAA: Institut Nationale de la Recherche Agronomique d'Algérie.

ITGC: Institut Technique des Grandes Cultures.

Liso : Lignées quasi-isogéniques.

LR : Les populations de lignées recombinantes.

Lr: Leaf Rust ; La Rouille brune.

Mha: Million d'hectare.

OS: Station ITGC d'Oued Smar.

Pb : Paire de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction; La Réaction de Polymérisation en Chaîne.

Pm: Mildiou.

PNAB: Programme National d'Amélioration des Blés.

QTL : Quantitative Trait Loci ; un locus de caractère quantitatif.

Qtx: Quintaux.

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA; l'amplification aléatoire d'un ADN polymorphe.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism; Polymorphisme de longueur de fragments de restriction.

RGA : Resistance Gene Analogues ; la résistance des gènes analogues

Rht: Gène de nanisme.

SAM: La sélection assistée par marqueurs.

Sr: Stum Rust ; La Rouille noire.

SSR: Simple Sequence Repeat; Répétition de séquence simple ou Microsatellites.

Stb : Septoria.

STS : Sequence Tagged Site ; Site de séquence étiqueté

TBE : Tris-Hcl, Boric acid et EDTA.

Yr: Yellow Rust ; La Rouille jaune.

Liste des figures

Figure1. Phylogénie du Blé tendre (Salamini <i>et al.</i> , 2002).....	4
Figure2. Carte du centre d'origine et de la diffusion de la culture du blé (Bonjean, 2001).....	5
Figure3. Evolution de la production des céréales en Algérie 2008-2013.....	8
Figure4. Comparaison des principales techniques de marquage moléculaire.....	18
Figure 5. Analyse d'extraction d'ADN génomique totale des lignées F ₂ (de 1 à 62) sur gel d'Agarose a 1%, 120 volts pour migration pendant 60min, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 1KB.....	32
Figure 6. Analyse d'extraction d'ADN génomique totale des lignées parentales, des témoins et le reste des F ₂ (de 63 à 151) sur gel d'Agarose a 1%, 120 volts pour migration pendant 60min, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 1KB.....	33
Figure 7. Polymorphisme des lignées parentales avec 9 SSRs, analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.....	35
Figure 8. Analyse des lignées parentales et des témoins avec les marqueurs SSR <i>Sr24</i> et <i>Lr34</i> analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.....	40
Figure 9. Criblage des lignées F ₂ (de 1 à 66) avec le marqueur SSR <i>Lr34</i> analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.....	42
Figure 10. Criblage des lignées F ₂ (de 78 à 151) avec le marqueur SSR <i>Lr34</i> analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.....	42

Liste des tableaux

Tableau1. Importation des blés en Algérie en 2013(DRDPA, 2013).....	9
Tableau2. Tableau représentant les caractéristiques des principaux marqueurs.....	17
Tableau 3. Exemples de gènes majeurs de résistance aux maladies des rouilles cartographiés.....	23
Tableau4. Présentation des variétés utilisées.....	25
Tableau5. Composition du mélange réactionnel de la PCR.....	29
Tableau 6. Les Microsatellites utilisés pour l'analyse des lignées parentales du Blé tendre.....	30
Tableau 7. Les SSRs utilisés pour l'analyse de la population F ₂ pour les allèles <i>Lr34</i> et <i>Sr24</i>	31
Tableau 8. Quantités d'ADN extraits obtenues par spectrophotomètre.....	33
Tableau9. Polymorphisme des deux lignées parentales vis-à-vis les microsatellites étudiés.....	35

Chapitre 1. Synthèse Bibliographique.

I. Blé tendre (*Triticum aestivum*)

Introduction	1
1. Origine et évolution botanique des blés.....	3
1.1 Origine génétique	3
1.1.1 L'origine du génome A	4
1.1.2 L'origine du génome B.....	4
1.1.3 L'origine du génome D.....	5
1.2 Origine géographique	5
2. La plante	6
2.1 Classification botanique	6
2.2 Morphologie de la plante	6
2.3 Particularité et Conséquence du Système de Reproduction du Blé.....	6
2.3.1 La 1 ^{ère} conséquence	6
2.3.2 La 2 ^{ème} conséquence.....	7
3. Importance de la culture du blé.....	7
3.1 Importance de la culture du blé dans le monde.....	7
3.2 La production blé tendre en Algérie.....	8
3.3 L'importance et l'utilisation du blé en Algérie.....	9
4. Les principales contraintes lie à la production du blé en Algérie.....	9
4.1. Contraintes abiotique.....	10
4.2. Contraintes Biotique.....	10
5. Amélioration génétique du blé	11
5.1. Adaptation au milieu abiotique.....	11
5.2. Adaptation au milieu biotique	11
5.3. Le choix de programme de la sélection.....	11

II. Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'amélioration du blé tendre

1. Principaux types de marqueurs moléculaires appliqués pour l'amélioration du blé..	13
1.1 Définition des marqueurs moléculaire :	13
1.2 Présentation d'un "Bon" marqueur	14
2. Types de marqueurs moléculaires.....	14
2.1 Marqueurs RFLP.....	15
2.2 Marqueurs de type PCR.....	15
2.2.1 Les microsatellites ou SSRs	15
2.2.2 La technique AFLP	16
2.2.3. La technique RAPD.....	17
3. Sélection assisté par marqueur « SAM » en amélioration du blé.....	19
3.1. Définition et utilisation de la SAM.....	19
3.2. Apport des marqueurs moléculaires à l'amélioration du blé.....	20
3.3. Intérêt des marqueurs moléculaires en sélection.....	21
3.3.1 Les principaux gènes de résistance aux Rouilles.....	21

3.3.2 Les principaux gènes de résistance aux Stress abiotique et agronomiques...	24
3.3.3 Les principaux gènes de qualité agronomique: Gluten.....	24

Chapitre 2. Matériel et Methodes

1. Matériel végétal	25
2. <i>Mise en place d'essai</i>	26
3. Extraction d'ADN génomique.....	27
3.1 Prélèvement des feuilles.....	27
3.2 Broyage des échantillons.....	27
3.3 Extraction de l'ADN	27
3.3.1. Précipitation d'ADN.....	27
3.3.2. Rinçage du culot d'ADN.....	28
4. Quantification d'ADN	8
4.1 <i>Qualité d'extraction sur gel d'agarose</i>	28
4.2 <i>Quantification par spectrophotométrie « Biophotomètre »</i>	28
5. La réaction de polymérisation en chaine PCR	28
6. Analyse de produit PCR.....	31

Chapitre 3. Résultats et Discussion

1. Analyse de la quantification d'ADN.....	32
1.1. Analyse des échantillons sur gel d'agarose.....	32
1.2. Analyse des échantillons par spectrophotométrie « Biophotomètre »	33
2. Analyse du polymorphisme des parents avec 9 SSRs.....	34
2.1. Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de nanisme « Rht »	36
2.2. Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de résistance à la rouille brune Lr46 (Lr46 - Yr29).....	37
2.3. Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène liés à la qualité technologique du blé GLU-3.....	37
2.4. Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène liés à la tolérance à la sécheresse	38
2.5. Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de résistance à Septoria	38
2.6. Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de résistance à la cécidomyie	39
3. Analyse des F ₂ pour la résistance aux rouilles.....	39
3.1. SAM des parents et témoins avec le gène Lr34 et le gène Sr.....	39
3.1.1. Analyse des lignées pour le gène <i>Lr</i>	40
3.1.2. Analyse des lignées pour le gène Sr 24.....	41
3.2. Screening des F ₂ pour la résistance aux rouilles Lr34.....	41
CONCLUSION.....	44
Références bibliographiques.....	46

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Introduction

Introduction

La production de blé et son utilisation ont été fortement liées au développement de l'agriculture et des civilisations sur au moins les 12000 dernières années. La domestication du blé, plus que n'importe quelle autre culture a permis la production de vivre en quantité suffisante pour supporter l'essor des communautés, le développement des religions et de la culture, ainsi qu'une croissance continue des populations.

En Algérie, le plus grand pays de l'Afrique (2,3 millions de km²), seulement un cinquième de la surface totale est utilisée pour l'agriculture soit 7 millions d'hectares et 3,5 millions sont annuellement emblavés par les céréales (Madr, 2011):

- Blé dur 1,5 million d'hectares
- Blé tendre 0,8 million d'hectares
- Orge 1 million d'hectares
- Autres 0,2 million d'hectares.

Le blé tendre (*Triticum aestivum* ; 2n= 42) est employé généralement pour la panification, est cultivé dans beaucoup de régions du monde. En Algérie, et en 2009 la production céréalière, particulièrement celle des blés varie de 1,6 à 1,8 millions de tonnes en moyenne. L'Algérie est un des principaux importateurs de blé dans le monde 4 millions de tonalités, pour couvrir la demande de la démographie croissante (32 millions de personnes) En effet la consommation annuelle de céréale est d'approximativement de 220 kilogrammes par habitant. Le coût de l'importation excède 1 milliard d'US\$ chaque année. (Madr, 2011)

A cause de ce déficit en production de blé qui ne couvre pas les besoins des populations, les chercheurs ont mis au point des programmes d'amélioration visant en premier lieu, la sélection de variétés bien adaptées aux conditions climatiques. Le sélectionneur doit choisir une stratégie d'action qui peut maximiser ses chances de création d'une bonne variété en utilisant, les ressources génétiques, les méthodes de sélection classiques, les nouvelles techniques de biologie moléculaire en intégrant au mieux les outils de la biotechnologie tels les marqueurs moléculaires en sélection assistée par marqueurs

L'objectif de notre travail a porté sur deux étapes :

- Caractérisation des lignées parentales (*Nesser et Dharwar dry*) par des SSR liées aux gènes de résistance aux maladies, au nanisme et de qualité afin d'identifier les microsatellites polymorphes chez le descendant F₂
- Sélection des génotypes résistants aux Rouilles chez la population en ségrégation (F₂) du blé tendre (*Triticum aestivum*) par l'utilisation des marqueurs moléculaires liées aux gènes de résistance aux maladies.

Le manuscrit est présenté en 3 chapitres ; le 1^{er} chapitre traite de l'origine et de l'importance du blé dans le monde en général et en Algérie en particulier ainsi que l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs moléculaires (SAM) pour son amélioration. Le 2^{ème} chapitre du matériel et méthode utilisées et enfin, le 3^{ème} chapitre met en exergue les résultats obtenus et leurs discussions.

I. Le Blé Tendre (*Triticum aestivum*)

Le blé est une plante herbacée monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* des graminées. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec indéhiscent appelé caryopse constitué d'une graine et de téguments (Feillet., 2000).

Le blé est une céréale importante vu que c'est l'aliment de base du monde entier. Le rendement du blé varie largement en raison de son interaction avec l'environnement, car le rendement en grain de blé est un trait polygénique hérité et c'est le produit de plusieurs facteurs affectant le rendement directement ou indirectement (Akram et al., 2008).

1. Origine et évolution botanique des blés :

Depuis plus de 10 000 ans, à partir des plaines du croissant fertile, l'histoire de la civilisation humaine et celle de la culture des blés ont évolués conjointement (Bonjean et Picard, 1990).

Dès le début du siècle, Sakamura (1918) a montré que les blés formaient une série polyploïde. Ensuite, par l'analyse génomique, il a été clairement démontré que l'haploïdie a eu un rôle essentiel dans l'apparition du blé dur et du blé tendre (Auriau et al. 1992).

1.1 Origine génétique :

La grande variabilité de *T. aestivum* laisse à penser qu'un nombre indéfini de croisements indépendants entre divers génotypes de blés tétraploïdes et plusieurs formes d'*A. squarrosa*. *T. aestivum* seraient apparus entre 7 000 et 8 000 avant JC dans les zones de culture des blés tétraploïdes communes avec l'aire de distribution d'*A. squarrosa* qui comprendrait le croissant fertile de la Turquie, à l'ouest, jusqu'aux confins de la Chine, à l'est (Bonjean, 2001).

Le blé tendre, *T. aestivum*, est un allohexaploïde ($2n = 42$) avec trois génomes A, B et D provenant d'espèces diploïdes différentes (Sears, 1954) (Fig.1) L'identification de ces espèces a été rendue possible par l'étude d'hybrides entre les différents blés puis entre ces blés et des espèces voisines appartenant au genre *Aegilops*, Kerby et Kuspira (1987).

Selon Mackey (1966) Le genre *Triticum* est divisé en cinq espèces :

- *T. monococcum* (L.) MK $2n = 14$, génomes AA
- *T. turgidum* (L.) Thell $2n = 28$, génomes AABB
- *T. timopheevi* (Zuhk) MK $2n = 28$, génomes AAGG
- *T. aestivum* (L.) Thell $2n = 42$, génomes AABBDD
- *T. zhukovski* (Men et Er.) $2n = 42$, génomes AAAAGG

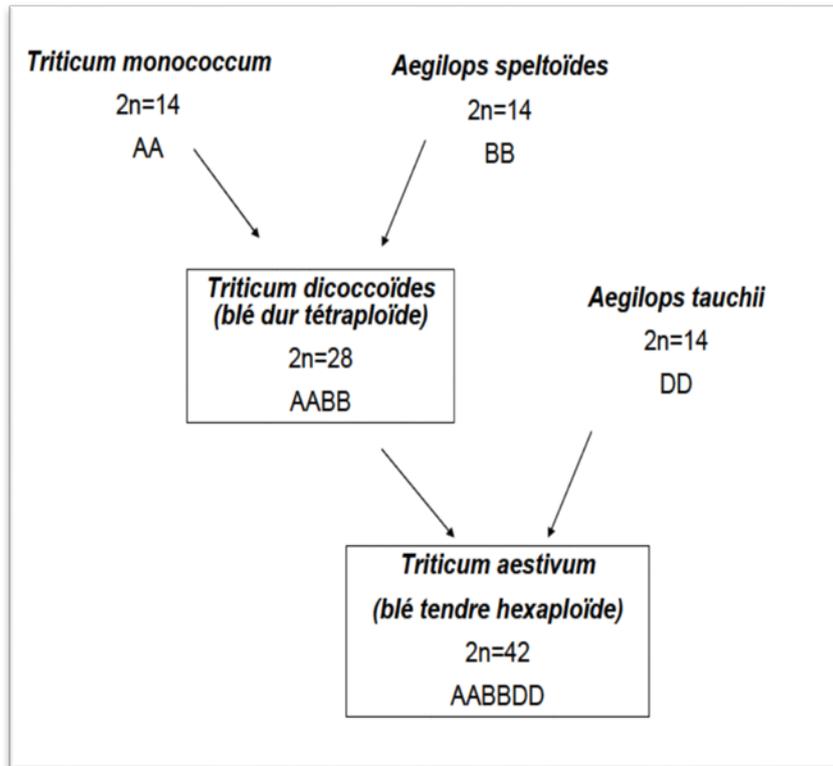


Figure1. Phylogénie du Blé tendre (d'après Salamini *et al.*, 2002)

5.1.1 L'origine du génome A:

Est l'espèce diploïde *Triticum urartu* ou *T. monococcum* ($2n = 14$, AA) cette espèce a été le donneur du génome A, sauf de la paire chromosomique 4A (Dovrak, 1988).

5.1.2 L'origine du génome B :

Au moins six espèces diploïdes différentes d'*Aegilops* de la section Sitopsis ont été proposées comme source possible du génome B. La plus probable d'entre-elles d'après les données les plus récentes serait *Aegilops searsii*. En fin, il n'est pas impossible que le donneur du génome B soit une espèce éteinte ou une espèce pas encore découverte (Gallais et Bannerot, 1992).

1.1.3 L'origine du génome D:

Est l'*Aegilops squarrosa*, selon Dovrak, 1988. Cet *Aegilops* se serait hybridé avec *Triticum dicoccum* pour donner naissance au premier blé hexaploïde.

1.2 Origine géographique :

Le blé est l'une des premières espèces cueillies et cultivées par l'Homme, 7000 à 10000 ans (Feldman., 1976 in Doussinault *et al.*, 1992). la plupart des recherches archéologiques ont confirmé que les origines du blé et de l'orge se situent dans les zones du croissant fertile, zone couvrant la Palestine, la Jordanie, la Syrie, la Turquie, le Liban, l'Irak (Harlan., 1976 ; Badr *et al.*, 2000; Bonjean., 2001) et une grande partie de l'Iran (Crostan et Williams, 1981)

Des restes de blé, diploïdes et tétraploïdes, remontant au VII^{ème} millénaire avant J.C ont été découverts sur des sites archéologiques au Proche Orient (Harlan, 1975).

Selon Doussinault *et al.*, (2001) le Croissant Fertile est le centre d'origine de blé qui diffusait vers le Nord-Ouest par les plaines côtières du bassin méditerranéen et à travers des Balkans, puis en suivant la vallée du Danube pour arriver à la vallée du Rhin, entre environ 5000 et 6000 ans avant J.C. Les restes archéologiques montrent que le blé atteint l'Ouest de l'Europe 5000 ans environ avant J.C. (Fig.2)

D'après Feldman (2001), en l'Afrique, la route la plus ancienne gagna l'Égypte depuis 6 000 ans et se poursuivit vers le Soudan et l'Éthiopie au sud, et vers la Libye à l'Est. D'autres voies à partir de la Grèce et de la Crète, certains blés rejoignirent également la Libye, d'autres en provenance du sud de la péninsule Italienne et de la Sicile vers la Tunisie, l'Algérie et le Maroc.

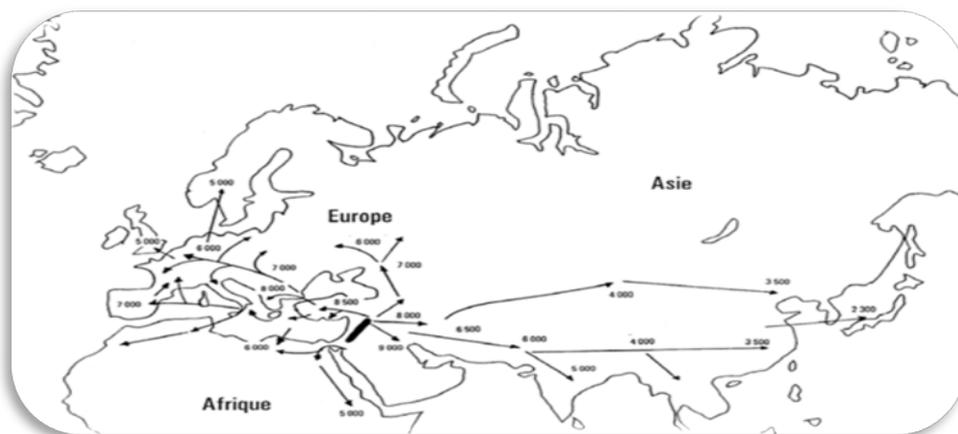


Figure 2 : Carte du centre d'origine et de la diffusion de la culture du blé. Bonjean (2001)

2. La plante :

2.1 Classification botanique :

Le blé est une plante autogame, monocotylédone appartenant à l'ordre des *poales*, famille des *poacés*, genre *Triticum*. Deux espèces de *Triticum*, dominent actuellement les cultures de blé, le « Blé tendre » *T. aestivum* L. Thell et le « Blé dur » *T. durum* (Bousnane., 2003). D'après Dekhil (1998) qui a indiqué que Dahlgren et Clifford (1985) ont proposé la classification suivante :

2.2 Morphologie de la plante :

Les blés sont des plantes herbacées annuelles, monocotylédones, à feuilles alternes formées d'un chaume portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplaties. Les fleurs sont nombreuses, petites et peu visibles. Elles sont groupées en épis situés à l'extrémité de chaumes (Henry et De Buyser, 2000). La fleur du blé est dite cléistogame, c'est-à-dire, le plus souvent, le pollen est relâché avant que les étamines ne sortent de la fleur, il s'attache alors au stigma, ou peut se produire la fécondation. A cause de ce caractère l'autofécondation est le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés. Après fécondation, l'ovaire donnera le grain de blé, qui dans ce cas représente à la fois le fruit et la graine (caryopse). (Gate et *al.*, 2003)

2.3 Particularité et Conséquence du Système de Reproduction du Blé:

Les peuplements autogames, sont homogènes et tendent vers l'homozygotie pour tous les caractères. Ces plantes sont très adaptées à un milieu précis. L'autogamie représente alors une défense contre l'apport de gènes extérieurs qui contrarierait son adaptation. Inversement, la modification d'un caractère du milieu peut entraîner la disparition de la population devenue inadaptée (Lafon et *al.*, 1996).

Cette autogamie a deux conséquences importantes (Boutouchent, 2000):

2.3.1 La 1^{ère} conséquence :

Du point de vue ressources génétiques de l'espèce ; les populations naturelles ou les variétés de pays sont principalement constituées de lignées pures, le brassage génétique naturel entre populations est de ce fait limité.

2.3.2 La 2^{ème} conséquence

Du point de vue amélioration génétique de l'espèce, l'échange génétique naturel est provoqué par des fécondations croisées. L'hybridation intra spécifique permet de regrouper dans un même génotype le potentiel génétique de plusieurs lignées pures. Les autofécondations successives permettent de mettre à profit de combinaisons nouvelles et de fixer les meilleures d'entre elles.

3. Importance de la culture du blé :

Le blé tendre représente 95% des blés cultivés au niveau mondial (Shewry, 2009). Le blé est la 3^{ème} production agricole mondiale et la 2^{ème} production céréalière après le maïs et avant le riz. Les principaux pays producteurs sont la Chine, l'Inde, les Etats-Unis d'Amérique, la Russie, la France et le Canada. (Henry et al, 2000)

Selon Benalia (2014), l'Asie du Sud est la première région mondiale productrice de blé, avec 124 Mt en 2013/2014 dont 92 Mt localisés en Inde et 24 Mt au Pakistan et avec 122 Mt, l'Asie de l'Est serait le second producteur mondial de blé. La totalité de la production est assurée par la Chine.

3.1 Importance de la culture du blé dans le monde

Les céréales, le blé en particulier occupe une place importante dans la production agricole et constitue la nourriture de base pour 35% de la production mondiale (Mebarkia et al., 2005). De toutes les plantes cultivées, le blé est celle qui a pris le plus d'importance dans l'alimentation de l'être humain, (Glenn Lennox, 2003).

L'importance de la culture du blé réside dans la rénovation considérable de la production mondiale depuis les années 1960 qui est estimé grossièrement 2,4% par an (CNUCED., 2011). Ce progrès de la production de blé est principalement dû à un accroissement constant des rendements à l'hectare (multiplié par 2,8 sur les cinquante dernières années) plutôt qu'une augmentation des surfaces mondiales cultivées en blé (Terrones Gavira et Burny., 2012). Presque la totalité de l'alimentation de la population mondiale est fournie par les aliments en grains, 96 % sont produits par les cultures céréalières. Ces dernières apportent 31% des calories et 33 % des protéines de la ration journalière par habitant (Mechara et Acila., 1999).

3.2 La production blé tendre en Algérie

L'Algérie recouvre environ 237.806.620 hectares (ha) dont seulement 3% représentent des terres arables, 0.6 Million d'hectare (Mha) des superficies arables totales conduites sous irrigation. Les céréales sont les cultures annuelles les plus importantes pour l'agriculture algérienne. En effet, elles occupent 60% des terres cultivées et représentent l'activité d'une masse importante de la population (Alais et *al.*, 2003).

En 2012, la production céréalière Algérienne a été estimée à près de 55 millions quintaux (Benaissa., 2013) et en 2013 la quantité record était de 61 millions de quintaux, d'où un recours aux importations de l'ordre de 69% (Benalia, 2014). En termes de performance, l'Algérie a produit un volume record de céréale, en 2009, dépassant le seuil de 61 millions de quintaux. D'autre part, les stress environnementaux nés de la fluctuation des facteurs abiotiques (sécheresse, salinité, température) affectent les conditions de croissance, le développement et le rendement des plantes (Madhava Rao *et al.*, 2006)

L'évolution de la production Algérienne des céréales et dont le blé tendre entre 2008-2013 se représente dans la figure 3 (unités qtx). Selon l'Office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC, 2014).

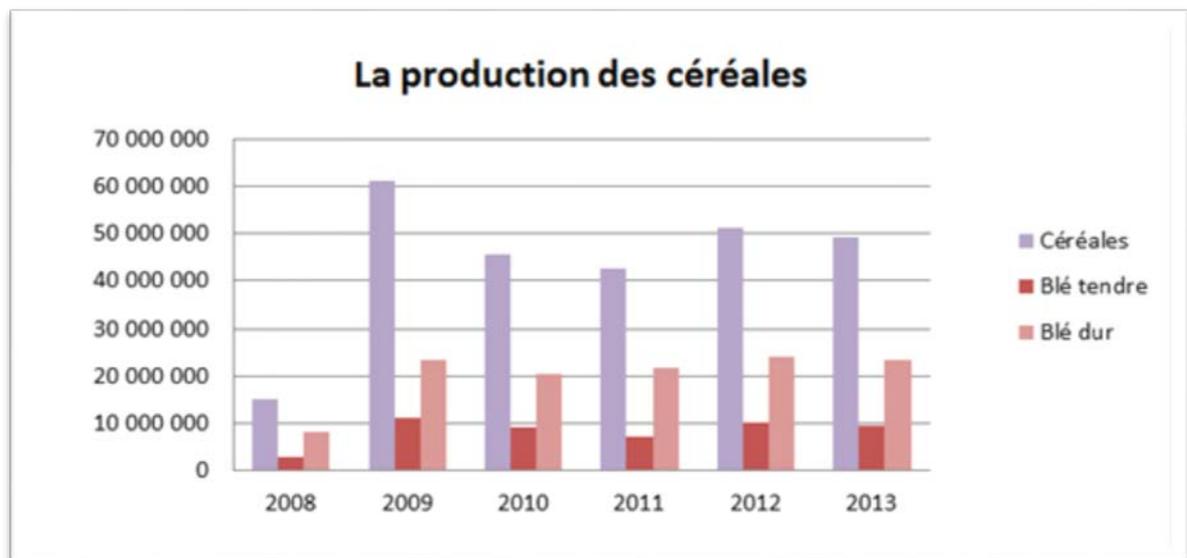


Figure 3: Evolution de la production des céréales en Algérie 2008-2013.

Mais comme cette production n'est pas suffisante pour la consommation, le gouvernement a été obligé d'importer du blé pour couvrir leurs besoins. (Tab.1)

Tableau 1: Importation des blés en Algérie en 2013. **Source :** Importations Céréales (DRDPA, 2013)

LIBELLE	POIDS (Kg)	VALEUR (DA)
Blé dur	1 095 618	34 626 133 759
Blé tendre	5 209 116	133 747 163 328
Total Blés	6 304 734	1683 297 087

3.3 L'importance et l'utilisation du blé en Algérie

En Algérie, les céréales constituent la base de l'alimentation, elles présentent 73.6% de l'apport calorique globale et fournissent en moyenne 80% des protéines totales consommées Godon et Williém (1991). Aussi la semoule issue du blé dur serait à l'origine de produits alimentaires de très divers plats et aliments traditionnels: couscous, pain, galette, pâtisserie, (Feillet, 2000, Jeantet et *al.*, 2007); frik et pattes divers, gâteaux traditionnels

Le blé tendre est utilisé à des fins diverses: blés fourragers pour l'alimentation animale, blés pour panification et la biscuiterie, et depuis 1993, blé pour la fabrication de carburant « blé éthanol ». (Selmi, 2000).

4. Les principales contraintes lie à la production du blé en Algérie

La faiblesse de la production céréalière et particulièrement celle des blés et des orges est due à plusieurs facteurs dont les plus importants sont considérés être : les pratiques culturales, les aléas climatiques et les variétés anciennes à faible rendement (Sayoud et Benbelkacem., 1996).Un autre élément parmi les plus contraignant de la production céréalière et non des moindres est le parasitisme du essentiellement aux maladies et insectes. Les maladies fongiques du blé causent des pertes de rendement pouvant atteindre 30% en cas de développement épidémique (Eyal *et al.*, 1987).

4.1. Contraintes abiotiques

Les principales contraintes abiotiques des zones céréalières sont

- Une succession de périodes sèches de durées et de fréquences variables;
- Des gelées hivernales et printanières;
- Des températures élevées et siroccos;

Ces contraintes impliquent la mise au point de variétés suffisamment tardives pour éviter les effets de gels tardifs et assez précoces pour échapper aux effets des hautes températures.

En effet le programme de sélection et d'amélioration vise essentiellement à développer des variétés précoces avec la perspective d'éviter les gelées tardives et en conséquence d'éviter également les sécheresses terminales.

4.2. Contraintes Biotique

Comme toutes les autres plantes cultivées par l'homme, le blé à paille peut être attaqué par un grand nombre d'organismes parasites macroscopiques et microscopiques. Les maladies se manifestent successivement au cours du développement de la plante, Il existe plusieurs contraintes pour la céréaliculture des stress biotique et abiotique. (Benbelkacem, 2000).

La forte présence de bios agresseurs peu affecté jusqu'à 30% des rendements. Et s'aggravent en raison des changements climatiques que connaît notre planète. Dépendant des conditions d'humidité, de température ainsi que de la présence des pathogènes plusieurs maladies cryptogamiques attaquent les blés et provoquent ainsi différents dégâts (Benbelkacem, 2000).

Dix années d'enquêtes et de recherche sur les maladies des céréales ont résulté en un capital de données fiables. C'est ainsi que sur les blés, les maladies les plus importantes ont été : la tache helminthosporienne (*Pyrenophoratrifici-repentis*), la septoriose (*Mycosphaerellagraminicola*), la rouille jaune (*Puccinia striiformis*), la rouille brune (*Puccinia recondita*) et le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (VJNO). (Sayoud., 2004)

5. Amélioration génétique du blé

L'objectif des sélectionneurs est de rassembler dans une plante d'une espèce donnée, le maximum des caractères favorables (Goacolou et Perdrizet, 1988) qu'on pourra nommer à la fin une plante élite. L'amélioration des plantes vise à créer des variétés qui répondent aux besoins de l'agriculteur, mais aussi à ceux de tous les utilisateurs du produit récolté : consommateur, industriel, intermédiaires de la commercialisation, du stockage, de la transformation...etc.

L'évolution permanente des conditions climatiques, écologiques, sociales et économiques conduit à un ajustement continu des objectifs (Feldmann et Feyt, 1998). Deux types d'objectifs sont le plus souvent recherchés : le rendement (La productivité) et la qualité (Gallais et Bannerot, 1992). La productivité qui est la capacité potentielle d'une variété à produire des rendements élevés quand les conditions optimales sont réalisées, la productivité est donc étroitement dépendante du milieu, elle est sous la dépendance de plusieurs gènes (Lafon et *al.*, 1998).

5.1. Adaptation au milieu abiotique:

On recherche la résistance au gelé, à la sécheresse, pour atténuer les conséquences agro-climatiques «l'effet d'année», ainsi que la précocité, la tolérance à la salinité.(Rousset M., 1990.)

5.2. Adaptation au milieu biotique :

La création des variétés résistantes aux parasites et aux agents pathogènes est une solution à certains problèmes de pathologie face auxquels aucun traitement chimique n'existe, moins polluante que la lutte chimique. La résistance variétale est une méthode de protection rarement durable, en raison de l'adaptation des parasites aux gènes de résistance (Lafon et *al.*, 1998).

5.3. Le choix de programme de la sélection:

D'après Bonjean et Picard (1990), il faut choisir les méthodes de sélection les plus adéquates en fonction des différents objectifs. Elles se déroulent, cependant, toutes de la manière suivante:

- Elargissement de la variabilité constituée par des hybridations ou croisements de départ. Ces croisements se font entre les géniteurs de l'espèce que l'on veut améliorer.
- Autofécondation des hybrides pour mettre à profit la recombinaison et exploiter la variabilité potentielle des croisements.

- Suivi de l'application du programme de sélection des meilleures plantes, puis des meilleures lignées issues de la phase d'autofécondation.
- Enfin, la phase d'évaluation des meilleures lignées et de choix définitif de celles qui seront candidates au dépôt pour l'inscription.

Ces quatre étapes stratégiques de l'amélioration des plantes comportent toutefois des contraintes et des limitations. Il est intéressant de faire l'inventaire des outils récemment disponibles apportés par les biotechnologies, afin de les doter du maximum d'efficacité (Demarly et Chalbi, 1991).

II. Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'amélioration du blé tendre

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) compte parmi les espèces les plus anciennement cultivées et constitue la base de l'alimentation d'une grande partie de l'humanité, d'où son importance économique.

Cependant, cette culture est très sensible aux insectes nuisibles dont la mouche de Hesse et le puceron (qui peut en outre, transmettre au blé des maladies virales), et aux maladies causées principalement par les champignons parasites dont la rouille jaune, la rouille brune, la rouille noire, le piétin-verse, l'oïdium et le charbon. L'amélioration de la production du blé passe donc par un meilleur contrôle de ces parasites. En effet, le développement de variétés à grande production avec une qualité adéquate du grain reste le principal objectif du sélectionneur. Toutefois, à ces besoins classiques s'ajoutent aujourd'hui des exigences découlant d'une grande prise de conscience sociale en matière de protection de l'environnement, menant à la limitation des traitements phytosanitaires et de la fertilisation chimique. Les techniques nouvelles, en particulier les marqueurs moléculaires, apparaissent comme des outils indispensables d'appui aux programmes classiques d'amélioration. En effet, contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. Ces marqueurs moléculaires deviennent aujourd'hui un outil essentiel d'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur. La recherche de marqueurs moléculaires étroitement liés aux gènes de résistance est une étape importante avant leur exploitation pratique pour accélérer et améliorer l'efficacité des programmes de sélection (Hospital, 2001 ; Moreau *et al.*, 2001 ; Eagles *et al.*, 2001 ; Dekkers, Hospital, 2002).

1. Principaux types de marqueurs moléculaires appliqués pour l'amélioration du blé

1.2 Définition des marqueurs moléculaire :

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est

indépendante des conditions de l'environnement (Langridge *et al.*, 2001). En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN (Eagles *et al.*, 2001). Ces marqueurs seront d'une grande importance dans l'amélioration des cultures à valeur agronomique et dans les programmes de sélection assistée par marqueurs chez les céréales (Dekkers, Hospital, 2002).

1.2 Présentation d'un "Bon" marqueur

Selon De vienne (1999) un marqueur génétique "idéal" est :

- **Polymorphe** : la matière première du généticien est la variabilité,
- **Multi-allélique** : c'est-à-dire possédant plusieurs allèles (donc des séquences d'ADN différentes) sur un même locus (Plomion, 2003)
- **Co-dominant** : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes, il peut être distingué de chacun des homozygotes parentaux.
- **Non épistasique** : son génotype peut être "lu" à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus. La codominance et la non épistasie peuvent être respectivement définies comme l'absence d'interaction intra et interlocus.
- **Neutre** : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc éventuellement sélectifs) que ceux qui permettent de déterminer son génotype. Dans leur très grande majorité les polymorphismes moléculaires sont neutres.
- **Insensible au milieu** : le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu.

2. Types de marqueurs moléculaires

De nombreuses techniques de marquage moléculaire sont aujourd'hui disponibles, et de nouvelles sont régulièrement publiées (Gupta *et al.*, 2001 ; Langridge *et al.*, 2001 ; Rafalski, 2002a, b). Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les marqueurs basés sur la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction). Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire. (Gupta *et al.*, 1999 ; Santoni *et al.*, 2000 ; Langridge *et al.*, 2001).

2.1 Marqueurs RFLP

La technique RFLP développée par Botstein *et al.* (1980) repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Une multitude de fragments d'ADN de tailles variables est générée par digestion enzymatique, puis séparée sur gel d'agarose et transférée par capillarité sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. Cette membrane est mise en contact avec une solution contenant un fragment d'ADN ou sonde qui permet de repérer, par hybridation moléculaire, des fragments d'ADN génomique qui lui sont homologues. La différence entre deux génotypes est révélée par autoradiographie si la sonde est marquée par le phosphore radioactif ou par réaction colorée si elle est associée à un conjugué enzymatique. Le polymorphisme détecté est dû à des mutations au niveau des sites de restriction de l'enzyme (polymorphisme de site de restriction) et/ou à des délétions/insertions d'un fragment d'ADN au voisinage de la zone génomique reconnue par la sonde. C'est le couple enzyme/sonde qui constitue le marqueur.

2.2 Marqueurs de type PCR

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, iso-enzymatiques et RFLP) et deviennent très nombreux. Les plus largement utilisés chez le blé sont les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat) ; l'AFLP, (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).

2.2.1 Les microsatellites ou SSRs

Ils sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. Les séquences flanquant ces éléments répétés permettent de définir les amorces qui seront utilisées pour l'amplification PCR. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur. (Morgante et Olivieri, 1993).

Si les SSRs constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, co-dominants et aisés d'utilisation), leur caractérisation initiale est toutefois assez lourde. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage de ces éléments répétés. (Parker, Langridge, 2000)

2.2.2 La technique AFLP

Elle est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR.

L'ADN génomique est clivé par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification. Une première amplification, dite pré-amplification, est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3 nucléotides). Ainsi, seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de l'amplification sélective. C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus et constitue donc le marqueur AFLP (Prins *et al.*, 2001).

Cette technique est puissante, stable et rapide. En outre, l'AFLP ne nécessite aucune connaissance préalable de séquences du génome de la plante étudiée ni la construction des banques génomiques ou cDNA, à l'encontre des SSR ou des RFLP. Elle connaît une large application dans le fingerprinting, l'identification des cultivars et la détermination de leur relation phylogénétique, la cartographie des génomes et le clonage. Toutefois, la dominance, le coût élevé et les difficultés techniques liées au marquage par AFLP limitent son utilisation à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs. (Vos *et al.*, 1995)

2.2.3. La technique RAPD

Elle consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments correspondant à des locus dominants. Les produits d'amplification sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce, il est dû à des mutations soit dans les régions amplifiées soit au niveau des sites de fixation des amorces, et il se traduit par la présence ou l'absence de bande chez les différents génotypes. (Santoni et *al.*, 2000). Les amorces constituent donc les marqueurs.

Cette technique est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, la RAPD manque de reproductibilité puisqu'elle est très sensible à la concentration de l'ADN et aux conditions d'amplification. (Williamset *al.*, 1990)

En résumé, les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus, co-dominants et sont utilisés généralement pour la cartographie et la détection de QTL (Quantitative Trait Loci) tandis que les marqueurs RAPD et AFLP sont dominants, non spécifiques de locus et servent essentiellement à la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène d'intérêt en vue de son clonage. (Hernandez et *al.*, 1999).

Selon Daniel et *al.*, (2006) et d'après De vienne, (1999) le tableau suivant nous synthétisera les caractéristiques des principaux marqueurs

Tableau2 : Tableau représentant les caractéristiques des principaux marqueurs

Marqueurs	Neutralité	Nombre	Codo-minance	Spécificité du locus	Poly-morphisme	technicité	Séquence codante
RFLP	Oui	≈illimité	Oui	Oui	Elevé	Elevée	Oui ou non
SSR	Oui /Non	Quelques milliers	Oui	Oui	Très élevé	Elevée	Non
AFLP	Oui	≈illimité	Non	Non	Très élevé	Moyenne	Oui ou non
STS	Oui	limité	Oui	Oui	Modéré	Elevée	Oui

La figure 4 récapitule les principales techniques de marquage (RFLP, RAPD, AFLP et SSR)

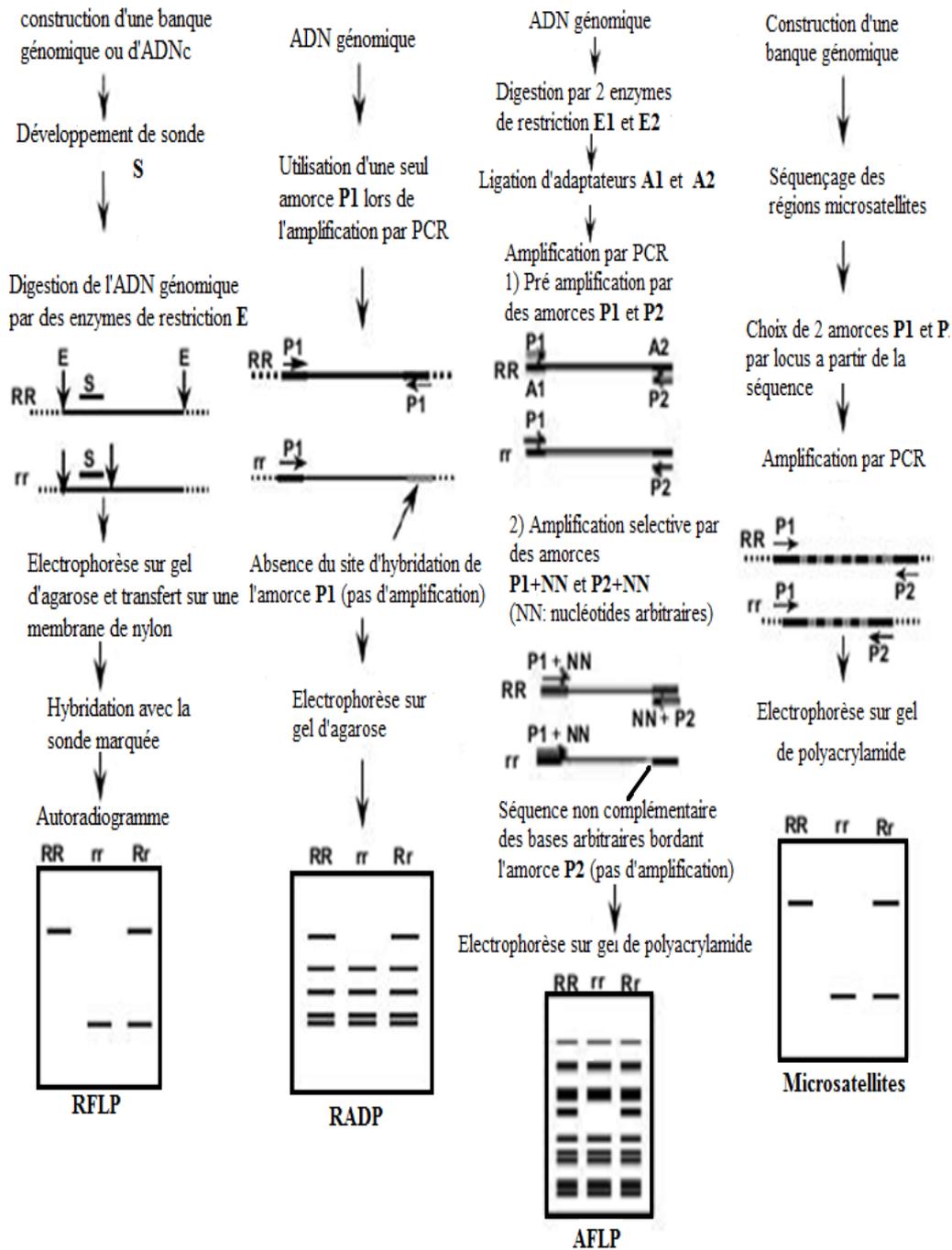


Figure4 : Comparaison des principales techniques de marquage moléculaire.

3. Sélection assisté par marqueur « SAM » en amélioration du blé

3.1 Définition et utilisation de la SAM

L'utilisation de variétés résistantes constitue une composante essentielle pour la majorité des programmes de sélection et un moyen de contrôle efficace qui prend en considération l'aspect écologique aussi bien qu'économique. Cependant, la pression de sélection exercée par les variétés à résistance monogénique favorise le développement de nouveaux biotypes capables de contourner cette résistance, ce qui nécessite la recherche continue et rapide de nouvelles sources de résistance. Cette recherche a été largement facilitée par l'avènement des techniques de marquage moléculaire durant ces dernières années. En effet, plusieurs gènes de résistance aux insectes et aux maladies ont été récemment localisés dans le génome du blé tendre par l'établissement de liaisons entre ces derniers et des marqueurs moléculaires sur les différentes cartes génétiques (Gupta *et al.*, 1999 ; Yencho *et al.*, 2000 ; Langridge *et al.*, 2001).

La sélection assistée par marqueurs (MAS) est particulièrement avantageuse dans le cas de l'amélioration des résistances aux maladies et aux insectes (Michelmore RW., 1995 ; Yencho *et al.*, 2000 ; Langridge *et al.*, 2001). Elle peut se faire sans avoir recours aux tests d'inoculation, permettant ainsi d'éviter les erreurs associées à l'utilisation de ces procédures et de mener à l'amélioration de la résistance même dans les aires où le pathogène n'existe pas. De même, les marqueurs moléculaires permettent le cumul rapide de plusieurs gènes dans une seule variété élite en vue d'une résistance plus efficace, et la maîtrise de la taille des fragments chromosomiques introduits par rétrocroisements, ce qui élimine les effets défavorables susceptibles d'être transmis avec les gènes cibles introgressés (Hospital, 2001). Ainsi, les schémas de sélection seront accélérés puisque le sélectionneur peut inférer la présence du gène par la présence du marqueur avant même l'expression du phénotype.

Cette sélection assistée par marqueurs est donc d'un intérêt certain pour le sélectionneur puisqu'elle offre l'avantage d'une sélection efficace, rapide et précoce, et devient alors un complément nécessaire aux méthodes traditionnelles d'amélioration génétique des céréales.

Outre leur intérêt dans le domaine de la sélection, les marqueurs moléculaires constituent des outils puissants pour la caractérisation moléculaire des gènes de résistance *via* la cartographie fine des régions contenant ces gènes menant à leur clonage (Tanksley *et al.*, 1989). L'approche de cartographie des RGA (Resistance Gene Analogs)/ gènes candidats ouvre potentiellement la voie à l'identification de gènes de résistance chez le blé. Cette

caractérisation devrait permettre de comprendre les mécanismes de défense mis en place par la plante lors de l'interaction avec le pathogène ou l'insecte.

Les récents développements du génie génétique et des biotechnologies constituent de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. La sélection assistée par marqueurs (SAM) est basée sur la possibilité de détecter la présence d'un gène ou d'une caractéristique agronomique intéressante (QTL) par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié. La SAM est non destructif, elle nécessite peu de tissu végétal et elle n'est pas influencée par des facteurs environnementaux. Les perspectives d'application des marqueurs moléculaires en sélection sont nombreuses. Ce type de sélection est particulièrement avantageux lorsque le caractère étudié est difficile ou coûteux à évaluer ou influencé par les conditions climatiques ou pédologiques (résistance au stress hydrique, résistance au stress biotique...). La SAM présente un grand intérêt dans les programmes d'introggression destinées à modifier de manière ciblée un matériel génétique existant en remplaçant un segment chromosomique initial par un segment porteur de caractéristiques favorables apportées par un autre matériel. Cette approche suppose de croiser deux lignées, l'une considérée comme le parent donneur, l'autre comme le parent receveur. La SAM peut également aider à accumuler dans une plante des gènes de résistance complémentaires pour une même maladie, de façon à obtenir une résistance multigénique qui sera potentiellement plus stable car plus difficile à contourner par le pathogène. (Michelmore RW., 1995)

3.2. Apport des marqueurs moléculaires à l'amélioration du blé

L'essor des techniques de marquage moléculaires au cours des dernières années a induit des changements considérables dans plusieurs branches de la biotechnologie, notamment la biologie moléculaire (clonage positionnel), la génétique évolutive (cartographie comparative), la génétique quantitative (détection et identification des locus contrôlant les caractères quantitatifs -QTL-) et l'amélioration des espèces (sélection assistée par marqueurs). Les marqueurs de l'ADN ont des applications importantes en sélection, ils permettent d'une part, de positionner sur une carte génétique des gènes/ QTL codant pour des caractères d'intérêt et d'autre part, de les suivre dans un schéma de sélection. (Michelmore, 1995)

La taille du génome de blé est estimée à environ 17 000 millions de bases (Mb); chacun des 21 chromosomes a une taille supérieure au génome entier du riz. Une cellule de blé contient approximativement cinq fois plus d'ADN qu'une cellule humaine. Bien que les connaissances sur cette espèce soient moins avancées que sur les plantes modèles (Arabette,

Riz), principalement à cause de la taille de son génome, de nombreuses populations ont été cartographiées. Le développement considérable des marqueurs moléculaires au cours de la dernière décennie a permis une meilleure compréhension du génome des céréales et la cartographie de plusieurs dizaines de locus liés à divers gènes ou QTL d'intérêt agronomique. (McIntosh *et al.* 1995, 2005).

L'utilisation des marqueurs moléculaires, aujourd'hui largement répandue, intervient dans divers programmes axés sur l'amélioration de la résistance aux maladies. Les marqueurs moléculaires aident le sélectionneur à mieux connaître la génétique des caractères importants afin d'optimiser l'efficacité des programmes de sélection. Jusqu'à l'heure actuelle, environ 55 Lr gènes de résistance contre le *Puccinia triticina* ont été identifiés dont 25 Lr introduit à partir d'espèces sauvages. Au moins 33 Yr gènes conférant une résistance à la rouille jaune ont été identifiés et intégrés dans les variétés de blé commercial (Pathan *et al.*, 2007).

3.3. Intérêt des marqueurs moléculaires en sélection

Outre leurs intérêts fondamentaux, les marqueurs moléculaires suscitent un grand intérêt dans le domaine de la sélection (Eagles *et al.*, 2001). Le développement considérable des marqueurs moléculaires au cours des dernières décennies a permis une meilleure compréhension du génome de blé et la cartographie de plusieurs dizaines de locus liés aux résistances aux maladies et insectes (Hernandez, 1999). Le prochain défi auquel seront confrontés les sélectionneurs est l'application de ces marqueurs dans des programmes de sélection. L'utilisation d'un marqueur moléculaire dans un programme de sélection doit passer d'abord par sa validation, en examinant le polymorphisme détecté dans différents fonds génétiques et par l'évaluation du rapport efficacité attendue/coûts occasionnés. (Moreau *et al.*, 2001)

La sélection assistée par marqueurs est basée sur la possibilité d'inférer la présence d'un gène par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié. Cette sélection est particulièrement avantageuse lorsque le gène cible est récessif et/ou lorsque son expression est tardive ou influencée par les conditions de l'environnement. (Dekkers, Hospital, 2002)

3.3.1 Les principaux gènes de résistance aux Rouilles

Au moins trois désignés gènes de résistance « slow rusting » Lr34 / Yr18, Lr46 / Yr29 et Lr67 / Yr46 ont conféré une résistance partielle mais durable pour une longue période de temps (Tab.3) (Singh *et al.* 2000). Ces gènes confèrent un type lent rouille de la résistance en dépit d'une réaction de l'hôte compatible et sont efficaces dans toutes les races de l'agent pathogène. (Ravi *et al.*, 2011)

a. Lr34/Yr18/Pm38

Lr34 a été décrite pour la première dans le cultivar Frontana, il est situé sur le bras court du chromosome 7D, près de locus Xgwm295. Le phénotype de résistance affichée par ce gène comprend la période de latence plus longue, moins urédina et une plus petite taille de uredina (Suenaga *al.*, 2003)

b. Lr46/Yr29

Lr46 est un gène de résistance de la rouille brune, il a été décrit en premier cultivar Pavon 76, et situé à l'extrémité distale du chromosome 1BL. Lr46 peut retarder le processus d'infection ou réduire le développement de symptômes causés par un large éventail de la rouille sur les plantes adultes. (Singh et *al.*, 1998), (Martínez et *al.*, 2001)

c. Lr67/Yr46

Le gène Lr67 de la résistance des plantes adultes (APR) à la rouille brune a été identifié dans le blé tendre Pakistanais et transféré dans Thatcher pour produire la ligne rétrocroisement (Thatcher * 6 / PI250413). Lr67 est situé sur le chromosome 4D et phénotypique similaire à Lr34. (Hiebert et *al.*, 2010)

d. Sr2/YR30

Sr2 est un gène de résistance à la rouille noire qui a été utilisé en amélioration 60 ans comme une source de résistance de la plante adulte durable et à large spectre, qui comprend la résistance à la souche Ug99 (Spielmeyer et *al.*, 2005)

e. Sr24

Sr24 offre une résistance à la plupart des races de rouille noire, y compris la race virulente Ug99 (TTKSK) accepté pour récente variante de UG99, TTKST désigné. Smith et *al.*, (1968) d'abord déterminé Sr24 de résider sur le chromosome 3DL. (Mago et *al.*, 2005)

Tableau3 : Exemples de gènes majeurs de résistance aux maladies des rouilles cartographiés

Caractère	Gene de Résistance	Nombre et type de marqueurs	Type de Population	Références
Résistance à la rouille jaune	Yr10	RFLP	(Liso)	Spielmeyer <i>et al.</i> , 2000
	Yr15	1 RFLP	(Liso)	Sun <i>et al.</i> , 1997
		1 RAPD	(Liso)	Sun <i>et al.</i> , 1997
		1 SSR	(Liso)	Fahima <i>et al.</i> , 1997
		SSR/RAPD	(Liso)	Chague <i>et al.</i> , 1999
	Yr17	1 RAPD/1SCAR	(Liso)	Robert <i>et al.</i> , 1999
	Yr18 (APR)	RFLP	(LR)	Singh <i>et al.</i> , 2000
	Yr26	3 SSR	(F2)	Ma <i>et al.</i> , 2001
	Yr28 (APR)	RFLP	(LR)	Singh <i>et al.</i> , 2000
YrH52	SSR	(F2)	Peng <i>et al.</i> , 1999, 2000	
	1 RFLP	(F2)	Peng <i>et al.</i> , 1999	
Yrns-B1 (APR)	SSR	(F3)	Börner <i>et al.</i> , 2000	
Résistance à la rouille brune	Lr3	1 RFLP	(F2)	Sacco <i>et al.</i> , 1998
	Lr10	1 RFLP	cartographie	Nelson <i>et al.</i> , 1997
		1 STS	(Liso)	Schachermayr <i>et al.</i> , 1997
	Lr13 (APR)	3RFLP,3SSR	(F2)	Seyfarth <i>et al.</i> , 1998
	Lr19	AFLP/1STS	délétion/	Prins <i>et al.</i> , 2001
		RFLP	recombinaison	Spielmeyer <i>et al.</i> , 2000
	Lr21	2 RFLP	(Liso)	Nelson <i>et al.</i> , 1997
	Lr23	2 RFLP	(Liso)	Nelson <i>et al.</i> , 1997
	Lr27	1RAPD/1STS	(F2)	Naik <i>et al.</i> , 1998
	Lr28	2 RFLP	(F3)	Nelson <i>et al.</i> , 1997
	Lr31	1 RFLP	(F3)	Nelson <i>et al.</i> , 1997
	Lr34 (APR)	3RFLP,RAPD	cartographie	William <i>et al.</i> , 1997
		3RFLP/1STS	(LR)	Seyfarth <i>et al.</i> , 1999
		3 SSR	(F2)	Raupp <i>et al.</i> , 2001
	Lr35 (APR)	1 PCR	(F2)	Helguera <i>et al.</i> , 2000
Lr39	SSR	(BC)	Aghaee-Sarbarzeh <i>et al.</i> , 2001	
Lr47		(F2)		
LrTr				
Résistance durable à la rouille noire	Sr2	1 STS	lignées en sélection	Bariana <i>et al.</i> , 1998
	(APR)	2 RFLP	(LR)	Johnston <i>et al.</i> , 1998

(Liso)=Lignées quasi-isogéniques, (F2) et (F3)=Les descendances F2 et F3 respectivement, (HD) =Les haploïdes doublés , (LR) =Les populations de lignées recombinante,(BC)=Les populations issues de rétrocroisements ou backcross. (APR) =Gène de résistance adulte (Adult plant resistance gene).

3.3.2 Les principaux gènes de résistance aux Stress abiotique et agronomiques

a. Gène de nanisme et semi-nanisme Rht

La plupart des lignées de blés nains et semi-nains ont la variété japonaise Akakomugi parmi leurs ancêtres. Cette variété était le donneur du gène de hauteur réduite Rht8 et le gène de la lumière du jour insensible Ppd-D1, les deux gènes sont étroitement liés et situés sur le chromosome 2D. (Ahmad et Sorrells 2002) (Borojevic, 2005).

b. Gène régulateur de Floraison et photopériodisme (Ppd)

La période de floraison des céréales est contrôlée par trois voies de signalisation différentes: la vernalisation (VRN), la photopériode (PPD) et la précocité (Eps) voie. Photopériode (PPD) loci génétiquement contrôlent la réponse à la photopériode, avec photopériode allèles insensibles induisant la floraison indépendamment de la longueur du jour. Dans le blé gènes les plus importants régissant sensibilité à la photopériode sont PPD-A1, B1 et PPD PPD-D1 (Beales et al., 2007)

c. Liaison élément protéines (DREB) de déshydratation sensible DREB-B1:

Dreb1 gènes ont été localisés sur les chromosomes 3A, 3B et 3D. Dreb1 groupe représenté un groupe de gènes candidats potentiellement important en fonction de leur implication dans la réponse au stress osmotique et de température. (Wei et al., 2009)

3.3.3 Les principaux gènes de qualité agronomique: Force Gluten

HMW-GS, avec les sous-unités à faible poids moléculaire (LMW gluténines-ESG) et les gliadines, sont les principaux facteurs conférant des propriétés viscoélastiques à pâte de blé de (Lafiandra et al., 1995). Dans le blé hexaploïde, les gènes codant pour HMW-GS sont contenus dans homéologue loci Glu-1 (Glu-A1, B1, et D1), qui sont situés 1A, 1B et 1D chromosomes, respectivement. (Liu et al., 2008)

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée au niveau de la Division Biotechnologie et Amélioration des Plantes au Laboratoire Biotechnologie à l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA). Mehdi Boualem (Baraki, Alger) dans le cadre d'un projet national de recherche.

Notre expérimentation a été déroulée sur deux étapes :

- Evaluation du polymorphisme des parents par rapport aux témoins vis-à-vis la résistance aux maladies.
- Le criblage d'une population en ségrégation (F₂) en utilisant les marqueurs de type SSR liés à la résistance aux Rouilles.

1. Matériel végétal :

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé une population F₂ du blé tendre, issue du croisement *Nesserdwarf* // *Dharwar dry* / *Nesser*, réalisé en 2012 à la station ITGC de Oued Smar (OS), et développé par l'équipe responsable du programme national du blé (PNAB, INRA et ITGC), les lignées parentales *Nesser dwarf*, *Dharwar dry*, et quatre variétés témoins. L'origine et les caractéristiques de ces variétés sont présentées dans le tableau suivant (Tab.4)

Tableau4. Présentation des variétés utilisées

Variétés		Origine	Caractéristiques	
F ₂	P₁ Nesser dwarf	CIMMYT	• Résistance à la sécheresse, Haut rendement, Sensibilité modérée aux maladies (Rouilles)	
	P₂ Dharwar / Nesser	CIMMYT	• Résistance aux maladies (Rouilles), Taille moyenne, Haut rendement.	
Témoins	T₁ Annuelot	Australie	<ul style="list-style-type: none"> • Résistance aux maladies • Les gènes Phénologique : • Les gènes de qualité : 	<ul style="list-style-type: none"> • Lr34/Yr18/Pm38, Lr46/Yr29 • Sr24/Yr29 • Rht (Dwarfing gene) • Glu A3, Glu B3, Glu D1

	T₂ Stylet	Australie	<ul style="list-style-type: none"> • résistance aux maladies : • Les gènes morphologiques : • Les gènes de qualité : 	<ul style="list-style-type: none"> • Lr37/Sr38/Yr17, Lr46/Yr29 • Rht (Short) • Glu A3, Glu B3, Glu D1
	T₃ Dahrawar	CIMMYT	<ul style="list-style-type: none"> • Les gènes de la résistance aux maladies : • Les gènes morphologiques 	<ul style="list-style-type: none"> • Lr34/Yr18/Pm38 • Rht (Tall),
	T₄ YOKO	CIMMYT	<ul style="list-style-type: none"> • Les gènes morphologiques : • Bonne qualité technologique : • Sensibilité modérer aux maladies (Rouilles), Haut rendement. 	<ul style="list-style-type: none"> • Rht (Drawing gene) • (Glu A1, D1)

2. Mise en place d'essai:

Le semis des graines de la population F₂ a été réalisé la mi-décembre dans des alvéoles en serre contrôlé (T°, H), soit une graine par descendant (250 graines). (Annexe.8)

La mise en germination des lignées parentales et des témoins a été effectuée au laboratoire de Physiologie Végétale. Les graines sont stérilisées à l'hypochlorite de calcium dilué à 12° (Annexe.1) dans des Erlen puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile trois fois (3X). Une fois stérilisées, les graines sont placées dans des boîtes de Pétri stériles tapissées d'un papier humide.

Les boîtes de Pétris sont mises dans des étuves à 23°C pendant 24h afin d'accélérer la germination, puis elles sont transférées sur la paillasse, l'arrosage est assuré régulièrement avec de l'eau de robinet. (Annexe.8)

3. Extraction d'ADN génomique

3.1 Prélèvement des feuilles :

Les feuilles sont prélevés au stade juvénile (stade 3 feuilles) (Annexe.8) La feuille est coupée avec un ciseau stérile et placée dans des tubes Eppendorff stériles (2 ml) puis numérotés selon l'emplacement de chaque échantillon. Ensuite les tubes sont placés dans une étuve ventilée à 60°C pendant 24h.

3.2. Broyage des échantillons :

Les feuilles séchées sont broyées dans un mortier en présence de sable stérile jusqu'à l'obtention d'une poudre puis conserver au congélateur – 80 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN. (Annexe.8)

3.3 Extraction de l'ADN

La méthode CTAB (CetylTrimethyl Ammonium Bromide), modifiée par Udupa et *al.* (1999) (Annexe.2) a été utilisée pour l'extraction de l'ADN. Pour 100 ml de la solution CTAB on rajoute 0,2% de β -Mercaptophénol. Cette solution est préchauffée au bain Marie pendant 10 min à 60°C. Sous hotte, 1400 μ l de CTAB sont apporté en deux fois (soit 700 μ l puis 700 μ l) à chaque échantillon. Cette étape sert à réduire les liaisons disulfures (S-S), à dénaturer les protéines et à isoler l'ARN pour éliminer la ribonucléase libérée lors de la lyse. Les échantillons sont mixés pendant 1min puis incubés pendant 1h à 60°C au bain Marie et agiter chaque 15 min.

3.3.1. Précipitation d'ADN

500 μ l de Chloroforme isoamyle (24:1) sont ajouté à chaque tube et mixé pendant 15min puis centrifugé à 1300 g pendant 15 min. 1 ml du surnageant est prélevé et placé dans un nouveau tube Eppendorff de 2 ml.

Pour la précipitation d'ADN dans la phase aqueuse, 600 μ l d'isopropanol sont rajouté à chaque échantillon puis mixer doucement. Les tubes sont placés au congélateur à -4°C pendant 1h. (Annexe.8)Après 1h d'incubation les échantillons sont centrifugés à 1300g à 4°C pendant 10min puis le surnageant est soigneusement jeter.

3.3.2. Rinçage du culot d'ADN

Pour le rinçage du culot, 1ml d'Ethanol 70% pré-refroidi est rajouté à chaque tube puis centrifugé à 1300g à 4°C pendant 5min. On répète l'opération 2 à 3 fois jusqu'à l'obtention d'un culot blanc.

Le surnageant est éliminé soigneusement sans décoller le culot d'ADN. Les tubes sont séchés sous hotte. Enfin, l'ADN est suspendu dans 100 µl d'eau ultra pure et conserve au réfrigérateur à 4°C (Annexe.8)

4. Quantification d'ADN

La quantification de l'ADN ainsi que les tests de qualité ont été réalisé sur gel d'agarose à 1% (Annexe.6) puis par spectrophotométrie.

4.1. Qualité d'extraction sur gel d'agarose

Le test a été réalisé sur un gel d'agarose à 1% en présence d'un marqueur de taille 1 Kb dans une solution 1X TBE (89 mM Tris-Hcl, 89 mM Boricacid and 2 mM EDTA pH -8) (Annexe.3 et 4.). 3 µl d'ADN rajoutée de 4 µl H₂O UP et 3 µl de bleu de dépôt sont déposés dans chaque puit. La migration est effectuée en deux étapes ; à 80volte, une fois l'ADN sort des puits on augmente le voltage à 120volte. Et pour le marqueur de taille on utilise 7 µl de 1 KB + 3 µl de tampon de charge (Annexe.5).

La révélation des bandes a été réalisée avec le BET (Bromide Ethidium) puis visualiser sur une lampe UV Trans-illuminateur.

4.2 Quantification par spectrophotométrie « Biophotomètre »

Une dilution de 1/9^{ème} de l'ADN a été réalisé pour effectuer une lecture de la concentration a une longueur d'onde de $\lambda = 260/280$ nm.

Suite à cette lecture, des dilutions ont été effectuées (Annexe.9) pour obtenir une concentration final de 20 ng/µl nécessaire pour un bon déroulement de la PCR.

5 La réaction de polymérisation en chaine PCR :

La PCR a été réalisé sur un termocycleur applied biosysteme. Le mixte réactionnel pour chaque amplifia a été préparé selon Udupa et *al.*, (1999). le mix PCR est composé de,

tampon 5X, dNTPs (0,2 mM) et MgCl₂ (2 mM). A ce mix on rajoute les amorces (F et R), l'ADN matrice et la Taq DNA polymérase, le volume final est ajusté à 10 µl par l'eau ultra pure selon le tableau suivant (Tab.5) :

Tableau5. Composition du mélange réactionnel de la PCR.

	Pour 1 échantillon	Pour 100 échantillons
Eau ultra pure	4,975 µl	497,5 µl
5X Buffer (Mix)	2 µl	200 µl
Amorce F	1 µl	100 µl
Amorce R	1 µl	100 µl
Taq Polymérase	0,025 µl	2,5 µl
ADN	1 µl	/

L'introduction des différents programmes de la PCR a été basé sur la température ainsi que sur le temps, le principe est le suivant:

- Pré-dénaturation à 95°C
- Dénaturation :
 - Dénaturation 94°C
 - Hybridation d'amorce*
 - Elongation a 72°C
- Finalisation d'élongation 72°C

* La Température d'hybridation de chaque SSR dépend des T_m des paires d'amorces (Tab.6 et Tab.7) et le temps de chaque étape dépend de la taille de l'amplifia.

Un set de 9 paires d'amorce SSR ont été testées pour l'évaluation du polymorphisme des lignées F₂ représentés au tableau suivant (Tab.6):

Tableau 6 : Les Microsatellites utilisés pour l'analyse des lignées parentales du Blé tendre.

	Locus	Location sur chromosome	Amorce gauche 5'3' Amorce droite 5'3'	T° PCR d'hybridation °C	Gène d'intérêt
M ₁	Xwmc432	1D	ATGACACCAGATCTAGCAC AATATTGGCATGATTACACA	51	H9
M ₂	Xwmc89	4A 4B 4D	ATGTCCACGTGCTAGGGAGGT A TTGCCTCCCAAGACGAAATAAC	61	Drought
M ₃	Xwmc44	1B	GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG TGTTGCTAGGGACCCGTAGTG G	61	Lr46
M ₄	Xwmc140	1B	ATGGAGATATTTGGCCTACAAC CTTGACTTCAAGGCGTGACA	60	Lr46
M ₅	Xgdm33	1A 1B 1D	GGCTCAATTCAACCGTTCTT TACGTTCTGGTGGCTGCTC	55	H9
M ₆	Xgwm261	1A	CTCCCTGTACGCCTAAGGC CTCGCGCTACTAGCCATTG	55	Rht
M ₇	Xgwm136	1A	GACAGCACCTTGCCCTTTG CATCGGCAACATGCTCATC	60	H9
M ₈	Xpsp2992	D1	TTTGGGAATACCTGCACTACTAAA AATTGTCTGGCTGCAGCTGCGA	60	Glu3
M ₉	Xgwmw389	3B	ATCATGTCGATCTCCTTGACG TGCCATGCACATTAGCAGAT	60	Stb2

L'évaluation de la population F₂ a été effectuée pour les microsatellites *Lr34* et *Sr24*. et le tableau suivant (Tab.7) représente ces allèles.

Tableau 7 : Les SSRs utilisés pour l'analyse de la population F₂ pour les allèles *Lr34* et *Sr24*.

Locus	Location sur chromosome	Amorce gauche 5'3' Amorce droite 5'3'	T° d'hybridation PCR
Lr34	7DS	AGCTCTGCTTCACGAGGAAG CTCCTCTTTATATCGCGTCCC	55° C
Sr24	3DL	GCGCTTGTTCTCACCTGCTCATA GCGTATATTCTCTCGTCTTCTTGTTGGTT	56° C

6 Analyse de produit PCR

Au produit PCR 5 µl de bleu d'acrylamide ont été ajoutés, puis déposés sur un gel d'acrylamide (29:1) à 40% pour une meilleure résolution des bandes (Annexe.7). Cette étape est initiée par le traitement des plaques de verre, il faut qu'elles soient bien propres en les lavant avec le détergent puis les rinçant avec l'eau de robinet, ensuite les traitées par le NaOH 1N pendant 2min suivie d'un rinçage. Le coulage du gel est effectué après un bon serrage des plaques. Une fois le gel est polymérisé, le peigne est hôté et les échantillons sont déposés (Annexe.8). La migration s'est déroulée sous une tension de 200 volts pendant 3heures.

La visualisation des bandes a été réalisée dans des bains de BET (Bromide d'ethidium). L'appareil Trans-illuminateur « Bio Rad » a été utilisé pour la visualisation des amplifias SSRs.

Chapitre 3. Résultats et discussion

Résultats et Discussion

1. Analyse de la quantification d'ADN

1.1 Analyse des échantillons sur gel d'agarose:

L'ADN extrait des différents échantillons des lignées parentales et des F₂ a été quantifié en premier sur gel d'Agarose à 1%. L'objectif est la confirmation de la qualité et la quantité d'ADN. La visualisation des gels (Fig.5 et Fig.6) montre la présence d'ADN de bonne qualité et en quantité suffisante pour les prochaines analyses, en revanche ces gels (Fig.5 et Fig.6) montrent l'absence totale de contamination protéique (ça sera confirmé par les résultats de quantification par spectro), en revanche, nous avons observé la présence d'ARN (smear) ceci s'explique par le fait que nous n'avons pas éliminé les ARN par l'ARNase lors de l'extraction, selon le protocole (Annexe.2) modifié par Udupa et *al.*, (1999)

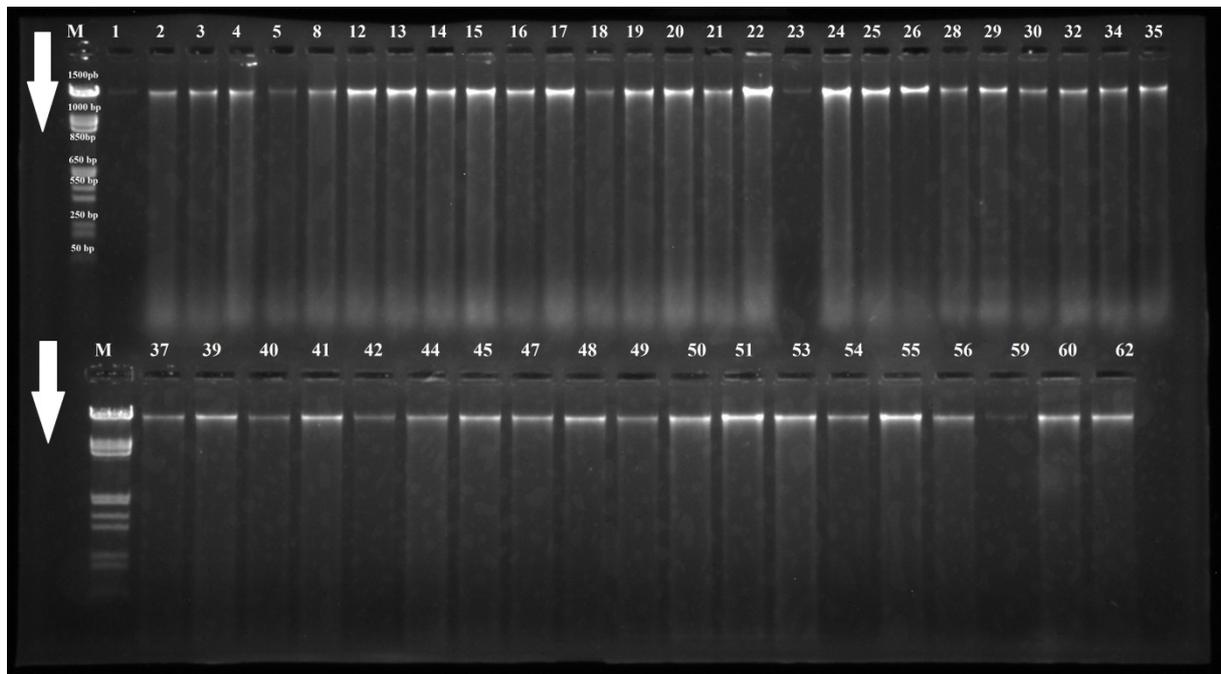


Figure 5. Analyse d'extraction d'ADN génomique totale des lignées F₂ (de 1 à 62) sur gel d'Agarose a 1%, 120 volts pour migration pendant 60min, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 1KB.

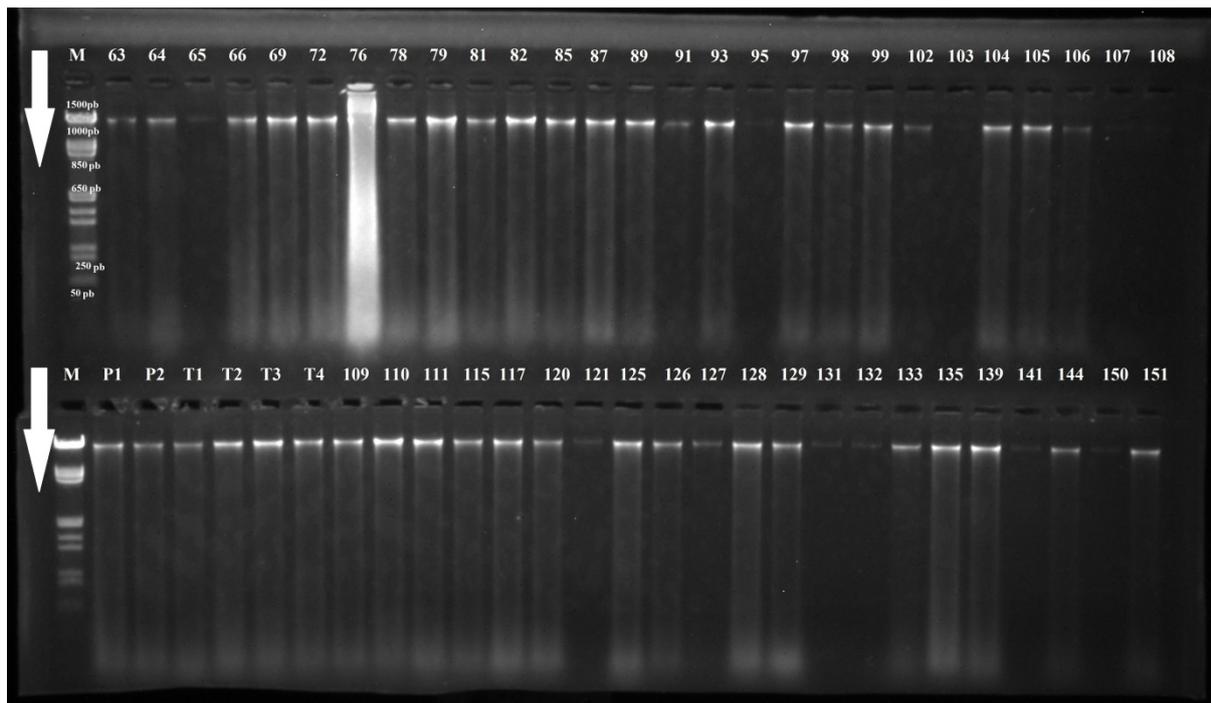


Figure 6. Analyse d'extraction d'ADN génomique totale des lignées parentales, des témoins et le reste des F₂ (de 63 à 151) sur gel d'Agarose à 1%, 120 volts pour migration pendant 60min, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 1KB.

1.2. Analyse des échantillons par spectrophotométrie « Biophotomètre » :

Le tableau suivant (Tab.8) représente la quantification au spectrophotomètre des extraits d'ADN des lignées parentales ainsi que des témoins. Les résultats des 151 échantillons de F₂ est présente en (Annexe.9).

Tableau 8. Quantités d'ADN extraits obtenues par spectrophotomètre.

Echantillon	[ADN] ng/μl	Dilution a 20 ng/μl	260/280	260/230
P ₁	330	6,1	1,72	1,35
P ₂	997	2,0	1,16	0,98
T ₁	228	8,8	1,68	1,02
T ₂	254	7,9	1,4	0,91
T ₃	413	4,8	1,2	0,84
T ₄	622	3,2	1,23	0,79

Dans l'ensemble, il est noté que les quantités d'ADN obtenues après extraction sont comprises entre 35 ng/μl et 1993 ng/μl avec un rapport 260/280 nm inférieur à 1,8 pour la majorité des échantillons, ce qui reflète la présence des ARN dans nos échantillons, puisqu'on

n'a pas utilisé de l'ARNase lors de l'extraction. La présence des ARN dans nos échantillons ne va pas agir sur le bon déroulement de l'amplification des SSRs.

L'analyse du rapport $\lambda = 260/280$ nm et $\lambda = 260/280$ nm montre la pureté d'ADN en protéine et en ARN respectivement, pour cette évaluation nous avons utilisé les normes suivantes (Nolan et *al.*, 2006):

- $1,7 <$ Contamination protéique.
- $1,8 \sim 2$ ADN pure.
- $2 >$ Présence d'ARN.

L'analyse des échantillons d'ADN au spectrophotomètre montre une concentration assez élevée d'ADN à une dilution de 1/9 pour la majorité des échantillons d'où la nécessité d'une dilution, pour une concentration finale de 20 ng/μl pour la PCR. Ces résultats affirment les observations réalisés sur gel d'Agarose.

2. Analyse du polymorphisme des parents avec 9 SSRs

Pour cette analyse les lignées parentales ont été semées en boîte de pétris et les feuilles ont été prélevées au stade juvénile, l'extraction de l'ADN a été réalisée au CTAB selon Udupa et *al.*, (1999). Les deux lignées parentales (*Nesserdwarf* et *Dharwar dry*) ont été analysées avec 9 SSRs afin d'identifier leur polymorphisme, et ceux pour une meilleure comparaison de l'état hybride des F₂ dans les analyses ultérieures.

L'utilisation de ces 9 SSRs est pour caractériser les parents, c'est un travail préliminaire de notre étude en vue d'analyser les lignées parentales afin de confirmer les génotypes des F₂, les résultats de cette amplification sont présentés au profil électrophorétique suivant (Fig.7)

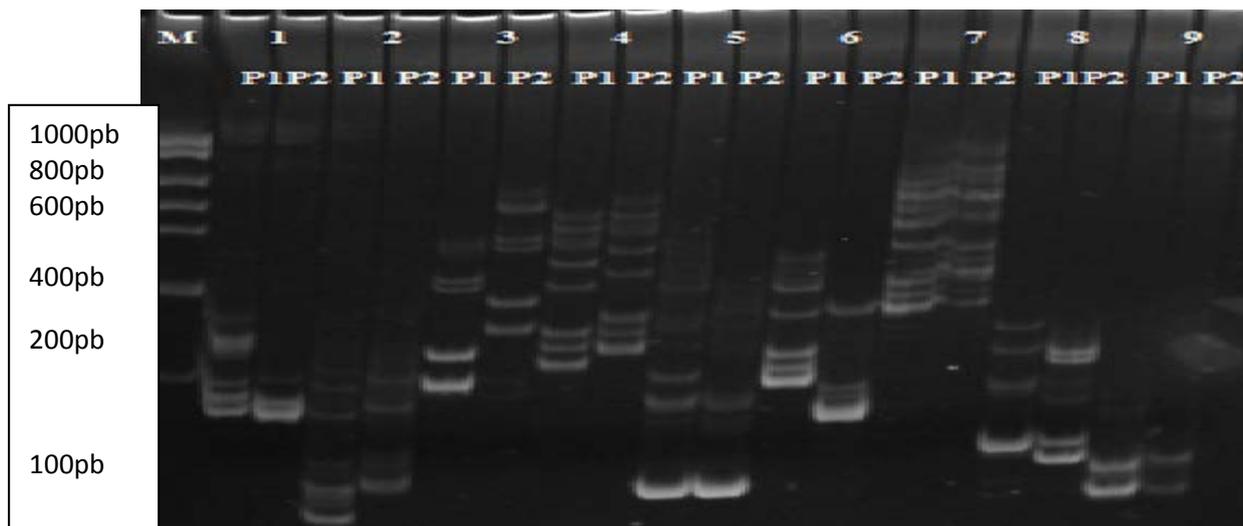


Figure 7. Polymorphisme des lignées parentales avec 9 SSRs ; 1:Xwmc432, 2:Xwmc89, 3:Xwmc44, 4: Xwmc140, 5:Xgdm33, 6:Xgwm261, 7:Xgwm136, 8:Xpsp2992, 9:Stb2 Xgwmw389, analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.

L'analyse du gel d'acrylamide (Fig.7) montre la présence d'un polymorphisme entre les parents pour certains SSRs et l'absence avec d'autres. Le tableau suivant (Tab.9) représente la synthèse du profil électrophorétique (Fig.7)

Tableau 9. Polymorphisme des deux lignées parentales vis-à-vis les microsatellites étudiés.

Marqueurs SSRs	P ₁	P ₂	Polymorphisme
Xwmc432	-	-	-
Xwmc89	+	-	+
Xwmc44	-	+	+
Xwmc140	-	+	+
Xgdm33	-	-	-
Xgwm261	+	-	+
Xgwm136	-	-	-
Xpsp2992	-	+	+
Stb2 Xgwmw389	-	-	-

(+) Présence du polymorphisme, (-) Absence du polymorphisme.

2.1 Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de nanisme « Rht » :

Le marqueur SSR *Xgwm261* a été testé pour l'analyse du polymorphisme des deux parents pour le gène du nanisme Rht. L'analyse du gel (Fig.7) révèle un polymorphisme entre les deux parents, elle montre que P₁ présente le type nain (dwarf) avec une bande de 264bp alors que le P₂ présente le type sauvage (wild) avec une bande de taille 140bp. Ces résultats sont en accord avec le phénotype des variétés, en effet *Nesser dwarf* est une variété à paille courte alors *Nesser/Dahrawar dry* est une variété à paille moyenne.

L'intérêt des améliorateurs pour les plantes à paille courte a commencé avant le début de la révolution verte, principalement pour améliorer la tolérance à la verse. A la révolution verte un intérêt particulier a été porté sur le gène du nanisme pour répondre à l'apport intensif d'engrais sur des plantes à paille haute sujet à la verse et à utiliser les assimilés pour la production de biomasse. En outre les tiges des plantes hautes ne pouvaient pas supporter le poids du grain obtenu dans les conditions de culture intensif.

Les gènes Rht-B1 et Rht-D1 ont pour origine la variété japonaise Norin10, qui a été d'abord transféré dans les cultivars américains, puis dans les lignées du CIMMYT puis plus tard à de nombreux autres pays. (Borojevic, 2005).

Ces gènes (Rht-B1 et Rht-D1) sont des gènes GA-insensitives (Gibbérellines gènes), les allèles conférant le phénotype nain sont Rht-B1b et Rht-D1b et les allèles de type sauvage sont Rht-B1a et Rht-D1a (Ellis et al., 2002)

Butler et al., (2005) ont évalués les performances agronomiques de gènes Rht-B1 et Rht-D1 dans une série de 140 lignées recombinantes (LR) dérivées d'un croisement Kauz X MTRWA116 dans quatre environnements: sous irrigation, partiellement irriguée et sous régime pluviale sur deux ans. Le rendement en grain élevé a été obtenu sous le régime irrigué avec la combinaison de semi dwarf (Rht-B1b + Rht-D1a).

2.2 Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de résistance à la rouille brune *Lr46* (*Lr46* - *Yr29*):

Deux marqueurs SSR Xwmc44 et Xgwm140 ont été testés pour l'analyse du polymorphisme des parents pour le gène de résistance à la rouille brune chez les deux lignées. L'analyse du gel montre la présence d'un polymorphisme entre les des deux parents vis-à-vis la résistance à la rouille. Ce résultat supposera que la variété P₁ serait susceptible à la rouille et que le parent P₂ serait résistant à la rouille (ça s'amplifie à environs 250 pb) (Fig.7). Ces résultats semblent en adéquations avec les caractéristiques des deux lignées parentales, en effet P₂ issue du croisement de *Nesser* avec *Dahrawer* qui sont des lignées résistante aux rouilles.

Lr46 est un gène de résistance à la rouille « slow rusting ». Ce gène ne confère pas à la plante une résistance a toutes les race de rouille brune (*Puccinia triticina*), mais permet de retarder le processus de l'infection ou de réduire le développement de symptômes causés par un large éventail de race de rouilles sur des plantes adultes. (Martínez et al., 2001)

Lr46 a été décrit pour la première fois en 1998 par Singh et al., dans cultivar Pavon76, En 2003, William et al. (ont utilisé des marqueurs AFLP pour cartographier le gène Lr46 sur l'extrémité distale de 1BL. Les auteurs ont également constaté que Lr46 a été étroitement liée ou pléiotropique à un gène de résistance à la rouille jaune Yr29. Martinez et al. (2001) ont montré que la période de latence de plantes adultes infectés était significativement plus faible chez les plantes portant Lr46 par rapport aux témoins sans le gène.

2.3 Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène liés à la qualité technologique du blé *GLU-3*

Le marqueur SSR Xpsp2999 a été testé pour l'analyse du polymorphisme des deux parents pour le gène lié à la qualité Glu 3. L'analyse du gel montre un polymorphisme entre les deux parents, elle montre que P₁ l'absence du gène (1 seul bande) alors le P₂ présence du gène (2 bandes à environ 150 bp) (Fig.7).

Six chromosomes portent les gènes des protéines de réserve. Les locus Glu-1, Glu-3 codant respectivement pour les SG-HPM et SG-FPM, et Gli-1 pour les ω-gliadines, sont situés sur les chromosomes 1A, 1B et 1D. (Weegels et al., 1996)

La variation sur la qualité entre les variétés ne peut être expliquée que par la variation de la composition HMW-GS. Le LMW-GS, dans une moindre proportion, et leurs interactions avec l'HMW-GS jouent également un rôle important dans la détermination de la force du gluten et de la qualité de la panification. (Payne PI 1987)

2.4 Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène liés à la tolérance à la sécheresse

Le marqueur SSR Xwmc89 a été utilisé pour l'analyse du gène de tolérance à la sécheresse. L'analyse du gel montre un polymorphisme entre les deux parents. Le SSR Xwmc89 est un marqueur étroitement associé au QTL pour le rendement en grains, le remplissage du grain, le nombre d'épis, la biomasse et la sensibilité à la sécheresse (Foulkes *al.*, 2002). L'analyse montre que P₁ a amplifié Xwmc89 à 110bp qui serait liée à la sensibilité à la sécheresse. Beaucoup de gènes sont impliqués dans la tolérance à la sécheresse d'où la complexité de ce stress (Quarrie et *al.*, 2005). Pour le reste des amorces aucun polymorphisme n'a été observé.

2.5 Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de résistance à Septoria :

Le marqueur SSR *Stb2 Xgwm389* a été utilisé pour l'analyse du gène de résistance à *Septoria*. L'analyse du gel montre l'absence de polymorphisme entre les deux parents (bandes de la même taille) Ce résultat supposerai que les deux parents serai susceptible à *Septoria* car le gène de résistance s'amplifie a 210-bp et susceptible a 220-bp (Fig.7).

Septoria tritici (Stb) est un facteur limitant majeur pour la production de blé affectant à la fois la qualité et le rendement. L'agent causal est le champignon *Mycosphaerella graminicola* (de la phase asexuée: *Septoria tritici*). L'infection se produit préférentiellement au cours de temps humide et froid (Brading *al.*, 2002)

Huit gènes majeurs de résistance à la Stb ont été identifiés dans le blé jusqu'à présent. STB1, Stb2 et Stb3 ont été découverts dans les variétés Bulgarie88, Veranopolis et Israël493, respectivement. Les autres gènes Stb, Stb4-8 ont été trouvés dans les variétés Tadinia, synthétique 6x, Flamme, Estanzuela fédéral et le blé W7984 synthétique respectivement, en utilisant des isolats définis de l'agent pathogène (Chartrain *al.*, 2004)

2.6 Analyse du polymorphisme entre les deux parents pour le gène de résistance à la cécidomyie :

Trois marqueurs SSRs Xwmc432, Xgdm33 et Xgwm136 ont été utilisés pour l'analyse du gène de résistance à la cécidomyie chez les deux lignées parentales. L'analyse du gel montre l'absence d'un polymorphisme entre les deux parents (Fig.7). Ce résultat supposera que les deux variétés seront susceptibles à la mouche.

Mouche de Hesse (*Mayetiola destructor*) est l'un des principaux insectes ravageurs du blé tendre dans le monde. Il existe seize biotypes de la mouche de Hesse en fonction de leur réponse à un ensemble de gènes de résistance de blé (H3, H5, H6, et H7H8). Actuellement, le biotype le plus répandu et virulent est "L". Trente-deux gènes de résistance à la mouche de hesse, H1 à H31 ainsi *H. dicoccum* ont été identifiés dans le blé (McIntosh *al.*, 1988). Parmi ceux-ci, H9, H13, H25 et *Hdicoccum* sont résistants biotype "L".

Huit marqueurs microsatellites Xbarc263, Xcfa2153, Xpsp2999, Xgwm136, Xgdm33, Xcni176, Xcni117 et Xwmc24 près du locus H9 sur la région distale du bras court du chromosome 1A. Très peu de variétés de blé tendre résistante à la Mouche de Hesse ont été développé les plus connues sont ; Iris (H9), Molly (H13), KS92WGRC20 (H25) and P921696 (H31) (Patterson *al.*, 1994).

A la fin de cet étape préliminaire, on a pu démontré l'existence de polymorphisme entre les deux parents (Nesser et Dharawar dry) pour les marqueurs (SSR de polymorphe) ce qui nous a permis de décider le criblage de tous les descendants de ce croisement (F₂) pour ces mêmes marqueurs.

3. Analyse des F2 pour la résistance aux rouilles

3.1. SAM des parents et témoins avec le gène Lr34 et le gène Sr24

Pour cette analyse les lignées parentales (*Dahrawar/Nesser et Nesser dwarf*) et les quatre témoins (*Annuelot, Stylet, Dahrawar et Yoko*) ont été semées en boîte de pétris et les feuilles ont été prélevé au stade juvénile, l'extraction de l'ADN a été réalisé au CTAB selon Udupa *et al.*, (1999). Les échantillons ont été analysé pour deux gènes Lr 34 et Sr24.(Fig.8)

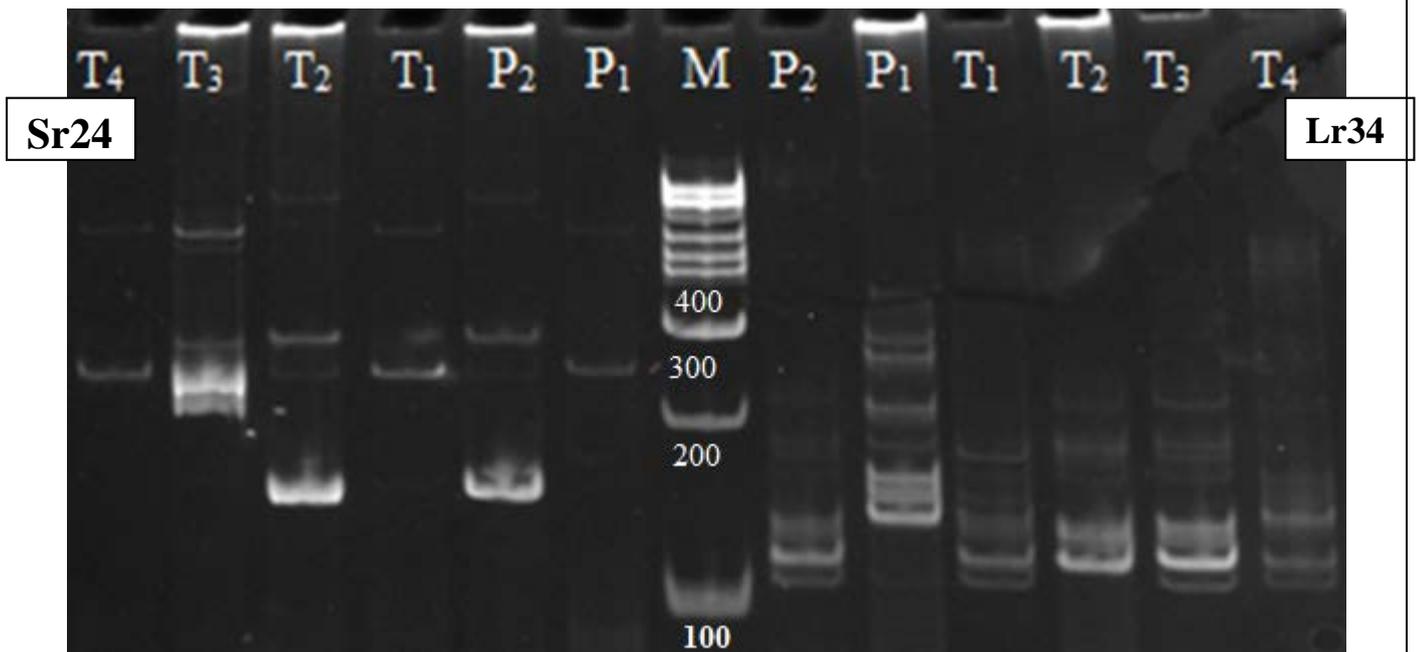


Figure 8. Analyse des lignées parentales et des témoins avec les marqueurs SSR *Sr24* et *Lr34* analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.

3.1.1. Analyse des lignées pour le gène *Lr 34*

La lecture du gel d'acrylamide du gène *Lr34*, gène de résistance à la rouille brune, par le marqueur SSR Xgwm130 montre la présence de ce dernier au niveau de la lignée parentale 1 (P₁) ainsi que chez certains témoins (125-bp) (Fig.8). Nous pouvons supposer que ce gène est dominant pour le parent 1 alors qu'il semble récessif au niveau de la lignée parentale 2 (P₂). Les SSRs Xgwm130 et Xbarc352 flanquent le locus *Lr34*. Cette paire de marqueurs a été testé dans plusieurs lignées: Sunvale, Janz, Annuello, Mulgara, Lang, Babblers, Cook, Sunland, Oxley, Sunco, Cunnincham et Anza.

Plus de 60 *Lr* gènes et QTL ont été décrites dans le blé (McIntosh et al., 2005). Toutefois beaucoup d'entre eux sont des gènes spécifiques à la race (gène pour gène) et actuellement plusieurs sont utilisés par les améliorateurs. Cependant, la résistance fournie par ces gènes peut être de courte durée car les rouilles sont en constante évolution (mutation) et d'acquérir la virulence contre ces gènes, d'où la nécessité de pyramider dans les nouveaux cultivars des « slow rusting » gènes.

Lr34 est un slow rusting genes (Singh RP et Huerta-Espino, 2003) tout comme *Lr46*. Ce gène offre une résistance des plantes adultes durables et non-spécifique. Les travaux de Suenaga et *al.*, 2003 et Krattinger et *al.*, 2009 ont montré que *Lr 34* est le même gène que Yr18 (résistance à la rouille jaune), la résistance à l'oïdium (PM38) et la nécrose des feuilles (Ltn1)..

3.1.2. Analyse des lignées pour le gène Sr 24

La lecture du gel d'Acrylamide du gène *Sr 24*, gène de résistance à la rouille noire, montre la présence de ce dernier au niveau du témoin T₃ (amplification à environ 200pb).

Sr24 offre une résistance à la plupart des races de rouille noire, y compris la race virulente Ug99 (TTKSK) mais pas à la nouvelle variante de UG99 TTKST. Smith et *al.*, (1968) ont déterminé que *Sr24* été localise sur le chromosome 3DL, au niveau d'une translocation spontanée du chromosome 3Ag d'*Agropyron elongatum*. Sears 1977 a développé dans les variétés Agent et Amigo le gène *Sr24* qui est lié respectivement à la couleur du grain rouge et grain blanc.

3.2. Screening des F₂ pour la résistance aux rouilles Lr34

Pour le screening des F₂ issue du croisement entre *Nesserdwarf* et *Dahrawar /Nesser*, 150 graines ont été semées en serre et les feuilles ont été prélevé au stade juvénile, l'extraction de l'ADN a été réalisé au CTAB selon Udupa et *al.*, (1999). Les échantillons ont été amplifiés et migrés sur gel d'acrylamide à 15%. (Fig.9 et Fig.10)

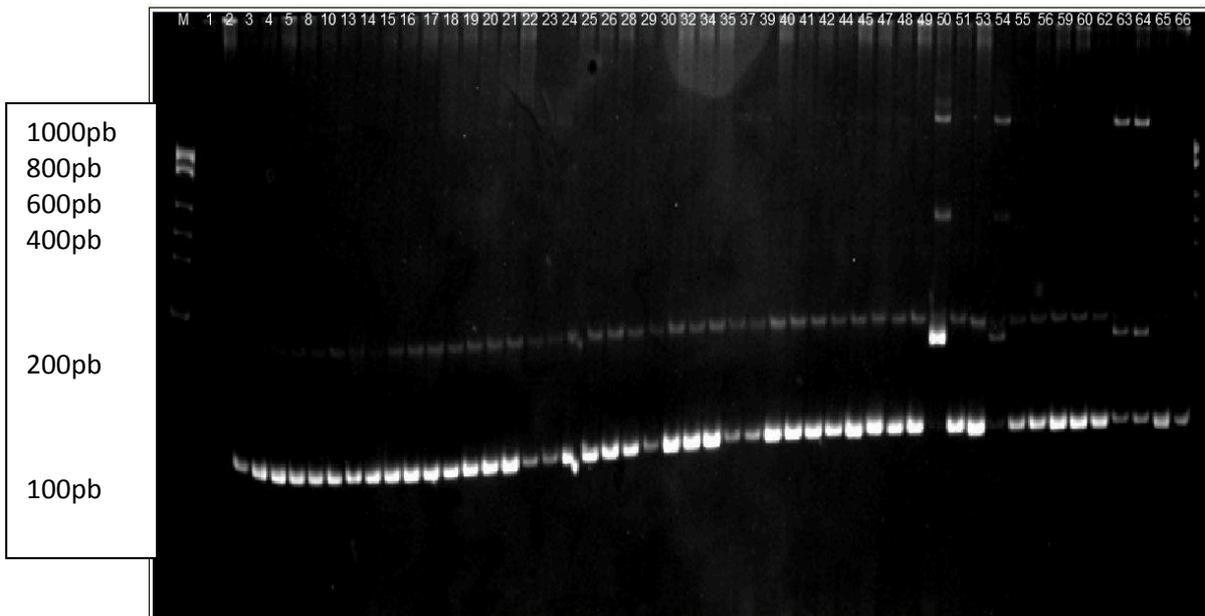


Figure 9. Criblage des lignées F₂ (de 1 à 66) avec le marqueur SSR *Lr34* analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.

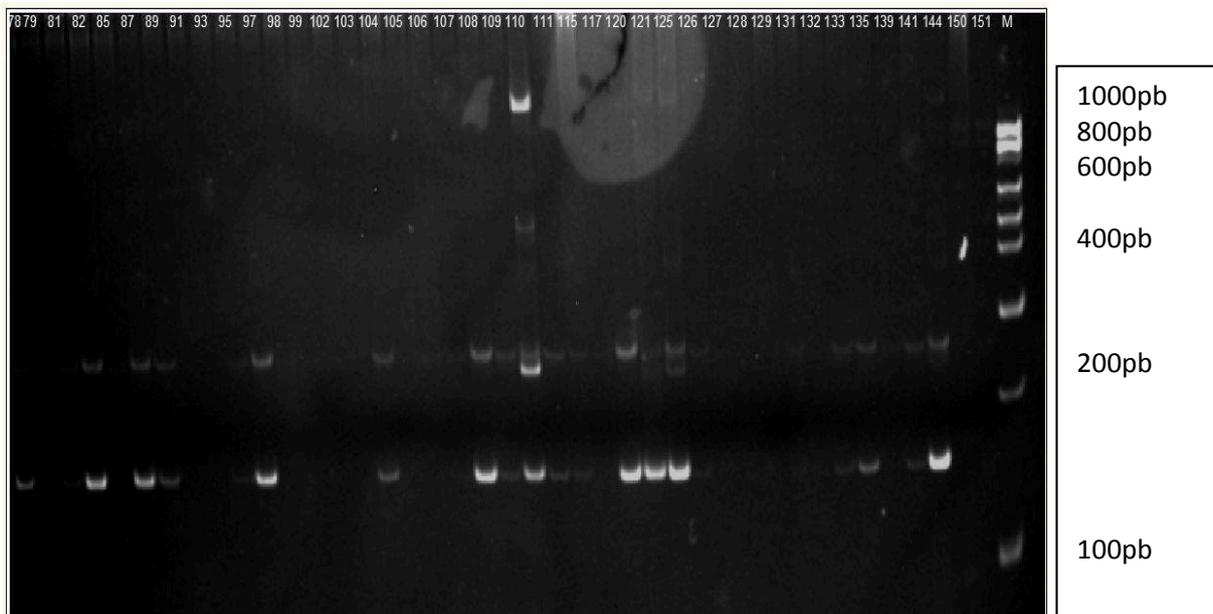


Figure 10. Criblage des lignées F₂ (de 78 à 151) avec le marqueur SSR *Lr34* analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%), 200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille de 100pb.

L'analyse des gels (Fig.9 et Fig.10) montre une amplification du *Lr34* à environ 125pb pour la majorité des descendants ce qui montre que ces génotypes présentent l'allèle dominant et donc des lignées homozygote pour ce caractère. L'absence d'amplification à 125pb pour d'autres lignées supposera que nous sommes en présence de lignées avec le gène récessif et donc de lignées homozygote pour ce caractère.

Toutefois nous n'avons pas observé de lignées à état hétérozygote, qui pourrait être expliqué soit par la taille de la population ou l'état hybride de la population. En effet, pour cartographier une population, les populations bi-alléliques spécifiques, résultant de croisements entre des lignées pures qui correspondent à la situation génétique simple, sont développés. La taille de la population est importante car elle détermine la puissance de détection du QTL. Le génotypage d'une population nécessite habituellement 200 familles lors de la sélection, ce qui est probablement un bon compromis entre la puissance de détection et de charge de travail (Hôpital et al.1997) La seconde explication possible sera un taux élevée d'autofécondation des F_1 ou un mélange de la population.

Conclusion

Conclusion

Les efforts de la recherche sur le blé tendre sont à la mesure de l'importance économique de cette culture. En effet, malgré le faible polymorphisme observé, la taille et la complexité du génome du blé tendre, des cartes génétiques ont été élaborées et plusieurs caractères ont été étiquetés en utilisant les différentes techniques de marquage moléculaire.

Aujourd'hui, avec le marquage moléculaire, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour le sélectionneur. La disponibilité de marqueurs moléculaires permettant de suivre les gènes influençant les performances, a ouvert la voie à une amélioration des évaluations. Ainsi, la sélection assistée par marqueurs (SAM) n'est possible que si les marqueurs moléculaires sont facilement utilisables et informatifs.

Cependant, les variétés traditionnelles de blé nécessitent actuellement de très nombreux traitements phytosanitaires pour lutter contre les maladies cryptogamiques, comme les rouilles. La création de nouvelles variétés portant des facteurs de résistance à ces maladies issus de variétés résistantes cultivées ou apparentées au blé présente une alternative prometteuse pour limiter les intrants à la culture du blé.

Ce modeste travail, est une initiation à la sélection assistée par marqueurs des lignées F₂ de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) vis-à-vis des maladies, principalement la rouille brune et la rouille jaune.

Notre démarche a été, d'une part, de tester des marqueurs moléculaires, déjà publiés, liés à des caractères d'intérêt pour le blé tendre (résistance à la rouille brune et jaune (*Lr46-Yr29*), résistance à la cécidomyie (*Stb2*), au nanisme (*Rht*), allèles de qualité technologique (*Glu3*) et tolérance à la sécheresse) dans des fonds génétiques différents (variétés témoins) et, d'autre part, de rechercher des marqueurs moléculaires à partir de populations en ségrégation F₂ et de tester leur transférabilité. Pour ce faire, 9 marqueurs flanquant les traits précités ont été utilisés, les SSRs ; *Xwmc432*, *Xwmc89*, *Xwmc44*, *Xwmc140*, *Xgdm33*, *Xgwm261*, *Xgwm136*, *Xpsp2992* et *Stb2 Xgwm389*.

Le résultat préliminaire de cette analyse a montré un polymorphisme pour les caractères de la résistance à la rouille brune et jaune (*Lr46-Yr29*), au nanisme (*Rht*) et la

qualité technologique (*Glu3*). Bien que ce test a été initié pour analyser ultérieurement les génotypes des hybrides F₂, il nous a néanmoins permis de caractériser les deux variétés parentales par rapport à plusieurs gènes d'intérêt qui pourrai être introduit dans les programmes d'améliorations.

L'utilisation des marqueurs moléculaires associés a permis un screening des F₂ pour les rouilles brune et jaune (*Lr34* - *Yr18* respectivement), gène de résistance à la race de rouille brune la plus commune dans le bassin méditerranéen. Nous n'avons pas observé de ségrégation au niveau de notre population, absence d'individus hétérozygote dans la population testée, et à cela plusieurs explications seront possibles, en premier un mélange ou une autofécondation au niveau de la F₁ et la deuxième est la taille de notre population qui était trop petite (environ 100 individus) non représentatif de la population. Néanmoins ces suppositions devraient être confirmé par des tests de la population par d'autre marqueurs, principalement par ceux ayant montré un polymorphisme.

Au terme de ce travail, on pourrait donc dire que cette étude constitue un essai préliminaire qui nous a toutefois permis de caractériser deux variétés (*Nesserdwarf//Dharwar dry/Nesser*) pour plusieurs caractères agronomiques et d'évaluer une population F₂ pour la résistance au rouilles. Il serait nécessaire et intéressant de poursuivre ce travail par une étude d'une population F₂ plus large en augmentant le nombre d'individus étudiés. Ces essais devront être répétés et confirmés, mais ils sont néanmoins très encourageants quant à la validité de leurs résultats.

Ces résultats ouvrent bien sûr la voie aussi à l'utilisation d'autres marqueurs dans les programmes de la sélection assistée par marqueurs chez le blé tendre.

Dans le cadre d'une réduction de la quantité d'intrants phytosanitaires apportée aux cultures du blé et de la création de variétés naturellement résistantes, il serait donc également important d'intégrer aux nouvelles variétés des facteurs de résistance aux maladies.

Références Bibliographiques.

Références bibliographiques

- Ahmad, M., et Sorrells, M.E. (2002).** Distribution of microsatellite alleles linked to *Rht8* dwarfing gene in wheat.. In: Euphytica, 123:235-240
- Akram, Z., Ajmal, S.U., et Munir, M. (2008).** Estimation of correlation coefficient among some yield parameters of wheat under rainfed conditions. Pakistan J. Bot., 40 (4): 1777 - 1781.
- Alais, C., Linden G., Micho. (2003).** Biochimie Alimentaire. 5^{ème} .Ed. Dunod. 131p
- Auriau, P., Doussinault, G., Jahier, J., Lecomte, C., Pierre J., Pluchard P., Rousset, M., Saur, L. et Trottet, M., (1992).** Le blé tendre. In : Gallais A. et Bannerot H. (Eds.), Amélioration des espèces végétales cultivées. Ed. INRA, Paris, pp. 22- 38.
- Badr, A., Muller, K., Schafer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohdi, W. et Salamini, F. (2000).** On the origin and domestication history of barley (*Hordeumvulgare*). Mol. Biol. Evol. 17 (4) : pp 499-510.
- Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, JW., Laurie, DA., (2007).** A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiodinsensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 115:721–733.
- Benaissa, R., (2013).** Production de blé : Des prévisions optimistes. In “Conférence de presse sur l’agriculture,23 JUIL 2013”. Eds. L’ECONEWS. Algérie.
- Benalia, S., (2014).** Journal de L’expression. [http : //www.lexpressiondz.com/actualite/187165-la-facture-s-est-emballee-en-2013.html](http://www.lexpressiondz.com/actualite/187165-la-facture-s-est-emballee-en-2013.html)
- Benbelkacem, A., (2000).** Évaluation du progrès génétique chez quelques variétés de blé dur (*Triticum turgidum*L. var. *durum*) cultivées en Algérie. Options méditerranéennes;6.pp: 105-10.
- Benseddik, B., (1983).** Intégration céréaliculture élevage en zone subsonique : cas de Saida. Thèse Doctorat 3^{ème} cycle, Montpellier III. American Society of Agronomy, Madison, WI. Pp. 154-164
- Bonjean, A., (2001).** Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). In S. Le Perchec, P. Guy, A. Fraval : Agriculture et biodiversité des plantes. Dossier de l’environnement de l’INRA, n°21, 29-37
- Bonjean, A., Picard, E., (1990).** Les Céréales à paille: origine-histoire-économie-sélection Softword, 205 pages

- Borojevic K, (2005).** The transfer and history of 'reduced height genes (*Rht*) in wheat from Japan to Europe. In: Journal of Heredity, 96:455-459).
- Botstein D., White RL., Skolnick M., Dvies RW. (1980).** Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum.Genet.* 32, p. 314–331.
- Bousnane M., (2003).** Etude des effets de la mouche de Hesse sur le blé. Mémoire d'ingénieur. ISN. Univ. Constantine. 39 p Bulletin/80/59. 37p.
- Boutouchent A. (2000).** Essai d'obtention de plantes haploïdes à partir de la culture d'anthèses et ovaires de *Triticum* in vitro. Thèse de Magister, Institut National d'Agriculture. pp.71
- Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ, Brown JKM. (2002).** A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. In: Phytopathology, 92(4):439-445.
- Butler JD, Byrne PF, Mohammadi V, Chapman PL, Haley SD. (2005).** Agronomic performance of *Rht* alleles in a spring wheat population across a range of moisture levels. In: Crop Science, 45:939-947
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM. (2004).** Sources of resistance to *Septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. In: Plant Pathology, 53:454–460.
- CNUCED., (2011).** Bulletin des prix produits de base.
- Crostan R., Williams J., (1981).** A world survey of wheat genetic resources. IBRGR
- Daniel Prat, Patricia Faivre Rampant, Emilce Prado. (2006).** Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières pp. 73-81, éd. Quae, 456 p
- De Vienne D., (1998).** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales, Ed. INRA, 195 p.
- Dekhil S., (1998).** Les principales maladies cryptogamiques des feuilles du blé dans le Nord-Est de l'Algérie. 75 pp.
- DekkersJCM., Hospital F. (2002).** The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations [Review]. *Natl. Rev. Genet.* 3 (1), p. 22–32.
- Demarly Y., Chalbi N. (1991).** L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Paris: JohnlibbeyEurotext/Aupelf-Uref, pp 165-86.
- DONINI P., LAW J.R., KOEBNER R.M.D., REEVES J.C., COOKE R.J., (2000).** Temporal trends in diversity of U K wheat. *Theor Appl. Genet.*, 100, 912-917.

- Doussinault G., Kaan F., Lecomte C et Monneveux P., (1992).** Les céréales à paille ; présentation générale. In “Amélioration des espèces végétales cultivées” ; A. Gallais et H. Bannerot, ed. INRA (eds), pp 13-21.
- Doussinault G., Pavoine M., Jaudean B., Jahier J.,(2001).** Evolution de la variabilité génétique chez le blé. Dossier de l’environnement de l’INRA, N° 21. Station d’amélioration des plantes.pp : 91-103.
- Dovrak J., (1988).** The origin of wheat chromosomes 4A and 4B and their genome reallocation *Triticum aestivum* L., Can, Genet, Cytol; 25. pp : 210- 214.
- Eagles HA., Bariana HS., Ogonnaya FC., Rebetzke GJ., H o l l a m b y GJ., Henry RJ., Henschke PH., Carter M . (2001).** Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 52 (11–12), p. 1349–1356.
- Ellis MH, Spielmeyer W, Gale KR, Rebetzke GJ, Richards RA. (2002).** 'Perfect' markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. In: Theoretical and Applied Genetics, 105:1038-1042
- Eyal Z., Scharen A. L., Prescott J. M. et Ginkel V. M., (1987).** The septoria diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico. 52 p.
- Feillet P., (2000).** Le grain de blé. Composition et utilisation. Mieux comprendre. INRA. ISSN: 1144- 7605. ISBN: 2- 73806 0896- 8. 308 p.
- Feldman M., (2001).** Origin of cultivated wheat. in Bonjean A.P. et Angus W.J. (ed). The world wheat Book: a history of wheat breeding. Intercept limited, Andover, Angle Terre. pp : 3-58.
- Feldmann P., Feyt H., (1998).** L’amélioration des plantes et la production de matériel végétal. CIRAD.
- Foulkes MJ, Scott RK, Sylvester-Bradley R.(2002).** The ability of wheat cultivars to withstand drought in UK conditions: formation of grain yield. In:Journal of Agricultural Science, 138:153–169
- Gallais A., Bannerot H., (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Ed: INRA, Paris.768p.
- Gate Ph., Giban M., Blondlot A., Braun Ph., Couleaud G., Jouy L., Laurent F., Lutton A., Vignier L. (2003).** Stades du blé. Editions ITCF. 68 p.
- Glenn Lennox., (2003).** L’importance du blé dans le monde. Sur le site : ([http:// pst.chezalice. fr/svtiufm/ble.htm](http://pst.chezalice.fr/svtiufm/ble.htm)). Food Lipids, 9.pp : 201-210.

- Goacolou J., Perdrizet E., (1988).** Les Biotechnologies au Service de la Production végétale. INRA.
- Godon B., Williem C., (1991).** Les industries de première transformation des céréales. Coll. Agro. Alimentaire. Lavoisier. pp : 78-91.
- GRAMA A., GERECHTER-AMITAI Z.K., BLUM A., (1983).** Wild emmer as a donor of genes for resistance to stripe rust and for high protein content. *Proc. 6eme*
- Gupta PK., Roy JK., Prasad M. (2001).** Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants [Review]. *Curr. Sci.* **80** (4), p. 524–535.
- Gupta PK., Varshney RK., Sharma PC., Ramesh B. (1999).** Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed.* **118**, p. 369–390.
- Harlan J. R., (1976).** Barley. In "Evolution of crop plants" NW. Simmonds, ed. Longmaninc., New York. Pp 93-98.
- Harlan J., (1975).** Crops and man. Eds John Wiley and Sons. NY. 350p.
- Henry Y., De Buyser J. (2000).** L'origine des blés. Pour la Science, Hors-série n°26, pp 60-62.
- Hernandez P., Martin A., Dorado G. (1999).** Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. *Mol. Breed.* **5** (3), p. 245–253.
- Hiebert CW, Thomas JB, McCallum BD, Humphreys DG, DePauw RM, Hayden MJ, Mago R, Schnippenkoetter W, Spielmeyer W. (2010).** An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). In: TAG Theoretical and Applied Genetics, 121:1083–1091
- Hospital F, Chevalet C and Mulsant P (1992).** Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132:1199-1210).
- Hospital F. (2001).** Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. *Genetics* 158 (3), p. 1363–1379.
- Jeanet R., Croguennec T., PSchuck P., Gerard Brulé., (2007).** Science des aliments: Biochimie Microbiologie, procédés produits. pp :138-159
- KERBY K., KUSPIRA J., (1987).** The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*, 29, 722-737.

- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, Singh RP, Huerta-Espino J, Mc Fadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B. (2009).** A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. In: *Science*, 323:1360-1363.
- Lafiandra D, Masci S, D'Ovidio R, Turchetta T, Margiotta B, Mac Ritchie F. (1995).** Structural differences in allelic glutenin subunits of high and low Mr and their relationships with flour technological properties. In: *Wheat structure: biochemistry and functionality*. J.P. Schofield (ed.), The Royal Society of Chemistry. Special publication n° 212. pp. 117-127.
- Lafon J.P., Tharaud Prayer C., et Levy G. (1996).** *Biologie des plantes cultivées, T1, Organisation/Physiologie de la nutrition*. 2^{ème} Edition, Editions Techniques et Documentations Lavoisier, Paris., 233 P.
- Lafon J.P., Tharaud Prayer C., et Levy G. (1998).** *biologie des plantes cultivées, 2^{ème} édition*. Technique & documentation Lavoisier. pp : 113-134.
- Langridge P., Lagudah ES., Holton TA., Appels R . , Sharp PJ., Chalmers KJ. (2001).** Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 52, p. 1043–1077.
- Liu SX, Chao SM, Anderson JA. (2008).** New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. *Theor Appl Genet* 118:177–183
- MACKEY J., (1966).** Species relationship in *Triticum*. Proc. 2nd Int. Wheat Genet. Symp., Lund 1965. *Hereditas*, suppl. 2, 237-276.
- Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S. & Janardhan Reddy K. (2006).** Printed in the Netherlands. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer: 1-14 p.
- Madr. (2011).** Bulletin statistiques de la campagne 2009-2010. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. 23 pages.
- Mago R, Bariana HS, Dundas IS, Spielmeyer W, Lawrence GJ, Pryor AJ, Ellis JG. (2005).** Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 111:496-504.
- Martínez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D. (2001).** Characterization of Lr46, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. In: *Hereditas*, 135:111-114
- McIntosh RA, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris CF, Appels R, Anderson OA (2005).** Catalogue of gene symbols for wheat. *Annu Wheat Newsl* 51:250–285

- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995).** Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Publications, Victoria
- McIntosh, R.A. In: Miller TE and Koebner RMD, (1988).** Catalogue of gene symbols for wheat. (eds), Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. Bath Press, Bath, UK, pp 1225-1323.).
- Mechara R. E et Acila S., (1999).** Etude de l'efficacité de quelques fongicides sur la carie du blé (*Tilletia caries*). Mémoire d'ingénieur. IST. Univ. Tebessa. 70p.
- Michelmore RW. (1995).** Isolation of disease resistance genes from crop plants. *Curr. Opin. Biol.* **6**, p. 145–152.
- Moreau L., Charcosset A., Gallais A. (2001).** Efficiency of marker-assisted selection compared with conventional selection. *OCL-Ol. Corps Gras Lipides* **8** (5), p. 496–501.
- Morgante M., Olivieri AM. (1993).** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* **3** (1), p. 175–182
- Nolan, T., Hands, R.E., et Bustin, S.A. (2006).** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols.* **1**(3):1559-82.
- Ouattar S. et T.E. Ameziane. (1989).** Les céréales au Maghreb: de la recherche à l'amélioration des techniques de production. Les éditions Toubkal, 123 pages.
- Oussible M. et E.H. Bourarach. (1998).** Projet de Développement et amélioration de l'installation des céréales d'automne en bour favorable. Volume IV. Synthèse et recommandations. 41 pages.
- Parker GD., Langridge P. (2000).** Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Bre e d.* **6**, p. 169–174.
- Pathan MS, Lee JD, Shannon JG, Nguyen HT. (2007).** Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM, editors. *Advances in molecular-breeding toward drought and salt tolerant crops.* Dordrecht (the Netherlands): Springer. p. 739–773.
- Patterson FL, Mass III FB, Foster JE, Ratcliffe RH, Cambron S, Safanski G, Taylor PL, Ohm HW. (1994).** Registration of eight Hessian fly resistant common winter wheat germplasm lines (Carol, Erin, Flynn, Iris, Joy, Karen, Lola, and Molly). In: *Crop Science*, **34**(1):315-316
- Payne PI, (1987).** Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. In: *Annual Reviews of Plant Physiology*, **38**: 141-153.

- Plomion C., (2003).** SSR : Microsatellites. Répétition de séquences simples : (Simple Sequence Repeats). Principes des techniques de biologie moléculaire ; Ed. INRA; pp143.-146.
- Prins R., Groenewald JZ., Marais G F., Snape J W. , Koebner RMD. (2001).** AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 103 (4), p. 618–624.
- Quarrie SA, Steed A, Calestani C, Semikhodskii A, Lebreton C, Chinoy C, Steele N, Pljevljakusic D, Waterman E, Weyen J, Schondelmaier J, Habash DZ, Farmer P, Saker L, Clarkson DT, Abugalieva A, Yessimbekova M, Turuspekov Y, Abugalieva S, Tuberosa R, Sanguineti M-C, Hollington PA, Aragués R, Royo A, Dodig D. (2005).** A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring x SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. **In:** Theoretical and Applied Genetics, 110:865-880
- Rafalski JA. (2002a).** Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches [Review]. *Plant Sci.* 162(3), p. 329–333.
- Rafalski JA. (2002b).** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [Review]. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2), p. 94–100.
- Rapilly F. et al, (1971).** Les principales maladies cryptogamiques des céréales. INRA et ITCF, Paris 189 p.
- Ravi P. Singh, David P. Hodson, Julio Huerta-Espino, Yue Jin, Sridhar Bhavani, Peter Njau, Sybil Herrera-Foessel, Pawan K. Singh, Sukhwinder Singh, and Velu Govindan. (2011).** The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. *Annual Review of Phytopathology*; Vol. 49: 465-481
- Rousset M., (1990).** Amélioration du blé tendre pour sa valeur d'utilisation. 69p.
- Sakamura, T. (1918).** Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der *Triticum*-Arten. *Bot. Mag.*, 32: 151-154
- Salamini, F., Heun, M., Brandolini, A., Özkan, H., and Wunder, J. (2004).** Comment on “AFLP data and the origins of domesticated crops”. *Genome*, 47: this issue.
- Santoni S., Faivre- Rampant P., Prado E. et Prat D. (2000).** Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cah. Agri.* 9(4): 3311-3327.

- Sayoud R et Benbelkacem A., (1996).** Situation des maladies des céréales en Algérie. In “proceeding du symposium régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires”. 11-14 novembre 1996. Rabat, Maroc. pp 69-70.
- Sayoud R, (2004)** Exploitation et synthèse des résultats d’enquêtes -1992-2004- Projets PNUD et MERS (actualisés jusqu’en 2008)
- SEARS E.R., (1954).** The aneuploids of common wheat. *Missouri Agri. Exp. Sta. Res. Bull.*, 572, 1-59.
- SEARS E.R., (1977).** An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19, 585-593.
- Selmi R., (2000).** Fin du mythe de l’autosuffisance alimentaire et place aux avantages comparatifs. *Revue Afrique Agriculture*. N° 280. pp : 23-30.
- Shewry P., 2009.** Wheat. *Journal of experimental botany*, 60(6).1537p.
- SIMON M., (1999).** Les variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* (L.) Thell. ssp. *vulgare* Mackey) cultivées en France au cours du XXe siècle et leurs origines génétiques. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 85(8), 5-26.
- Singh RP, Huerta-Espino J. (2003).** Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. In: *Euphytica*, 129:371-376
- Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J. (1998).** Lr46: A Gene Conferring Slow-Rusting Resistance to Leaf Rust in Wheat. In: *Phytopathology*, 88(9):890-894.
- Singh, R.P., J. Huerta-Espino, and S. Rajaram. (2000).** Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *ActaPhytopathol. Entomol.Hung.* 35:133–139.
- Smith EL, Schlehner AM, Young HC Jr, Edwards LH. (1968).** Registration of agent wheat. In: *Crop Science*, 8:511-512)
- Smith EL, Schlehner AM, Young HC Jr, Edwards. (1968).** Registration of agent wheat. LH. In: *Crop Science*, 8:511-512
- Spielmeyer W, Sharp PJ, Lagudah ES. (2003).** Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.). In: *Crop Science*, 43:333–336
- Suenaga K, Singh RP, Huerta-Espino J, William HM. (2003).** Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat.. In: *Phytopathology*, 93:881-890

- Tanksley SD., Young ND., Patterson A H . , Bonierabale M W. (1989).** RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology*7, p. 257–264
- TerronesGavira F et Burny P., (2012).** Evolution du marché mondial du blé au cours des cinquante dernières années. In ‘‘Céréales’’. ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W Gembloux. PP 9.
- Udupa S.M., Robertson L.D., Weigand F., Baum M., Kahl G. (1999).** Allelic variation at (TAA)_n microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicerarietinum*L.) germplasm. *MolecularGenetics and Genomics*, 261: 354–363..
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, p. 4407–4414.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield ID. (1996).** **Functional properties of wheat glutenin.** In:Journal of Cereal Science, 23:1-18
- Wei B, Jing RL, Wang CS, Chen JB, Mao XG, Chang XP, Jia JZ (2009).** *Dreb1* genes in wheat (*Triticum aestivum* L.):development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Mol Breed* 23:13–22
- William M, Singh RP, Huerta-Espino J, Ortiz Islas S, Hoisington D. (2003).** Molecular Marker Mapping of Leaf Rust Resistance Gene Lr46 and Its Association with Stripe Rust Resistance Gene Yr29 in Wheat. In: *Phytopathology*, 93(2):153-159
- Williams JGK.,Kubelik AR., Livak KJ., Rafalski J A . , Tingey SV. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl.Acids Res.* 18 (22), p. 6531–6533.
- YenchoGC., Cohen MB., Bryne PF. (2000).** Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annu. Rev. Entomol.* 45, p. 393–422.

Annexes.

Liste des annexes

Annexe 1. Préparation de l'hypochlorite de calcium.....	I
Annexe 2. Protocole d'extraction (Udupa et <i>al.</i> , 1999).....	I
Annexe 3. Préparation des d'EDTA 0,5 X et TBE[5x].....	II
Annexe 4. Préparation du Tris HCL.....	III
Annexe 5. Préparation du bleu de dépôt.....	III
Annexe 6. Préparation de gel d'Agarose 1%.....	III
Annexe 7. Préparation de gel d'Acrylamide 15%.....	III
Annexe 8. Les Différentes étapes d'analyse des F ₂ par les SSR.....	IV
Annexe 9. Quantités d'ADN des F ₂ obtenues par spectrophotomètre.....	V

I. Solutions de l'extraction d'ADN

Annexe 1. Préparation de l'hypochlorite de calcium

Pour la stérilisation des graines, on a besoin de diluer l'hypochlorite de calcium de 32° à 12°

$$C1= 32^\circ \quad V1= 250 \text{ ml}$$

$$C2=12^\circ \quad V2=660 \text{ ml}$$

250 ml d'hypochlorite de calcium + 410 ml d'H₂O distillée

Annexe 2. Protocole d'extraction (Udupa et al., 1999)

1- Préparation de la solution CTAB :

- 2 g CTAB
- 28 ml NaCl
- 10 ml Tris HCl [Ph=8]
- 4 ml EDTA [Ph=8, 0,5M]
- 58 ml de H₂O distille (qsp. 100 ml)

Préchauffer la solution au bain Marie 10min à 60°C.

2- Dans chaque tube rajouter 1400 µl et 0,2% de β-Mercaptophénol.

3- Agiter 1min puis incuber les échantillons pendant 60min à 60°C. Agiter chaque 15min.

4- Ajouter 500 µl de chloroforme isoamyle (24:1). Mixer 15min.

5- Centrifuger à 1300 g pendant 15 min.

6- Prélever 1 ml de surnageant dans un nouvelle tube Eppendorff pour chaque échantillon.

Rajouter 600 µl d'isopropanol. Mixer puis incuber pendant 60min à -4°C.

7- Centrifuger à 1300 g et à 4°C pendant 10 min.

8- Jeter le surnageant soigneusement. Rajouter 1 ml d'Ethanol 70% froid

→ Rinçage 2 fois.

9- Centrifuger 1300g à 4°C pendant 5min

10- Verser l'éthanol précieusement et laisser les tubes sécher sous hotte.

11- Suspendre l'ADN dans 100 µl d'eau ultra pure.

12- Conserver au réfrigérateur.

Annexe 3. Preparation des d'EDTA 0,5 X et TBE[5x]

a. Préparation d'EDTA 0,5 X (Éthylène Diamine Tétra-Acétique)

$$1M \rightleftharpoons 372.2$$

$$0.5 \rightleftharpoons 186.12 \text{ g/l}$$

$$186.12 \text{ g} \rightleftharpoons 1000\text{ml}$$

$$37.22\text{g} \rightleftharpoons 200\text{ml}$$

Le Ph d'EDTA est de 4,62 donc on l'ajuste avec le NaOH sous forme de pastille jusqu' à Ph=8.

b. Préparation de TBE [5x]

Pour 2L du TBE on a besoin de :

- 80ml EDTA
- 108g Trizma Base
- 56g Acide Bourique
- Eau distillé (qsp. 2L)

Le Ph du TBE est de 8,66 donc on l'ajuste avec du HCL jusqu'à Ph=8.

c. Dilution de TBE [5x] à [0,5x]

Pour l'électrophorèse on a besoin du TBE [0,5x] donc on va diluer le TBE [5x] déjà préparé.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{0,5 * 4000}{5}$$

$$V_1 = 400\text{ml}$$

Donc pour 4 L de TBE [0,5x] on prend 400ml du TBE + 3600ml d'H₂O distillé et autoclavé.

Annexe 4. Préparation du Tris HCL

Pour 100ml: PM=121,14 g/mole

121,14 g/mole \rightleftharpoons 1000ml

12,114 g/mole \rightleftharpoons 100ml

De ce fait on a besoin de 12,114g de Trisma Base, qui a Ph=10 donc on l'ajuste avec de l'HCL jusqu'à Ph=8.

II. Préparation des tampons et gels (Agarose et Acrylamide)

Annexe 5. Préparation du bleu de dépôt (Bleu de Bromophénol) :

- 0,5 ml Tris HCL [Ph=8]
- 0,1 ml EDTA [Ph=8]
- 5ml Glycérol 50%
- 20mg β -Mercaptophénol.

On mélange le tout puis on ajuste à 10ml avec de l'eau distillé autoclavé.

Annexe 6. Préparation de gel d'Agarose 1%

- 1g Agar
- 100 ml TBE
- 10 μ l BET (Pour favoriser la révélation)

Annexe 7. Préparation de gel d'Acrylamide 15%

a. APS 25%

- 2,5 g Ammonium persulfate
- 10 ml d'H₂O ultra pure.

b. Gel d'Acrylamide (1 plaque)

- 22,5 ml d'Acrylamide.
- 15 ml TBE 5X.
- 112,5 ml d'H₂O distillé.
- 420 μ l APS.
- 112,5 μ l TEMED.

Annexe 8. Les Différentes étapes d'analyse des F₂ par les SSR.



Annexe 9. Quantités d'ADN extraits des F₂ obtenues par spectrophotomètre.

Echantillon	[ADN*10] ng/µl	260/280	260/230
1	110	1,6	0,94
2	325	1,9	0,87
3	320	1,67	0,64
4	304	1,87	0,7
5	105	1,8	0,69
6	209	1,07	1,02
7	332	1,03	1,03
8	354	1,02	1,01
9	770	1,86	1,62
10	222	1,48	0,98
11	537	1,23	1,16
12	1313	1,76	1,78
13	1028	1,62	0,96
14	749	1,65	0,95
15	756	1,01	0,97
16	536	1,96	1,82
17	1777	1,03	1,01
18	175	2,05	1,08
19	1993	1,01	0,99
20	249	2	1,29
21	958	1,06	0,97
22	1598	1,33	1,29
23	1064	1,14	1,07
24	974	1,54	1,06
25	197	1,83	0,65
26	333	1,21	0,88
27	536	1,33	0,82
28	683	1,76	0,86
29	267	1,02	1,01
30	471	1,61	0,82
31	305	1,85	1,25
32	910	1,37	0,98
33	1463	1,67	1,09
34	358	1,48	0,99
35	580	1,63	0,83
36	853	1,91	1,68
37	211	1,87	0,94
38	422	1,32	0,8
39	1333	1,66	1,35

40	1098	1,85	1,14
41	2736	1,07	0,98
42	3693	1,04	0,97
43	991,9	1,3	0,81
44	100	3,3	1,02
45	1964	1,05	1,02
46	204	1,55	0,74
47	364	1,72	0,94
48	233	1,7	0,65
49	133	2,12	0,74
50	248	1,46	0,76
51	451	1,68	1,1
52	708	1,61	1,04
53	523	1,71	1
54	283	1,74	0,76
55	206	1,81	0,66
56	236	1,92	0,73
57	247	1,78	0,72
58	1351	1,6	1,3
59	73	7,11	0,73
60	2026	1,2	1
61	466	1,75	1,2
62	4	/	1,17
63	269	1,67	0,72
64	340	1,84	0,87
65	429	1,61	0,88
66	292	1,61	0,69
67	256	1,79	0,72
68	323	1,81	0,76
69	296	1,84	0,72
70	10	1,99	1,74
71	267	1,84	0,66
72	835	1,71	1,12
73	654	1,42	0,82
74	35	1,37	0,92
75	114	1,04	0,98
76	1014	1,84	1,24
77	688	1,81	1,09
78	326	1,71	0,67
79	275	1,7	0,76
80	460	1,72	0,85
81	681	1,72	1,01

82	180	1,57	0,93
83	337	1,74	0,71
84	282	1,81	0,63
85	148	1,68	0,75
86	1129	1,57	1,03
87	304	1,76	1,64
88	165	1,55	0,82
89	177	1,67	0,63
90	593	1,74	0,88
91	560	1,78	0,88
92	1407	1,63	1,17
93	578	1,57	0,83
94	1610	1,43	1
95	1250	1,56	0,94
96	146	1,59	0,81
97	828	1,94	0,93
98	672	1,61	0,84
99	917	1,61	0,94
100	106	2,63	0,72

Nom : GRINE. Prénom : Nour El Houda.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de : Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Master Biologie et Génomique Végétale.

Option : Biologie et Génomique Végétale.

Thème : La sélection assistée par marqueurs moléculaires de type SSR pour l'amélioration du Blé tendre (*Triticum aestivum*) vis-à-vis la résistance aux Rouilles

Résumé :

Afin d'optimiser la gestion des résistances aux maladies du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) dans les programmes d'amélioration variétale, il est devenu nécessaire d'utiliser la sélection assistée par marqueur (SAM) pour l'amélioration de cette espèce vis-à-vis les maladies fongiques, plus précisément les rouilles (jaune, brune et noir). Notre étude a été réalisée sur population F₂ issue du croisement entre *Nesse rdwarf* et *Dharwar dry* / *Nesser* par des marqueurs moléculaires de type SSR ; *Xwmc432*, *Xwmc89*, *Xwmc44*, *Xwmc140*, *Xgdm33*, *Xgwm261*, *Xgwm136*, *Xpsp2992* et *Stb2 Xgwm389*, liés à des caractères d'intérêt pour le blé tendre (résistance à la rouille brune et jaune (*Lr46-Yr29*), résistance à la cécidomyie (*Stb2*), au nanisme (*Rht*), allèles de qualité technologique (*Glu3*) et tolérance à la sécheresse) dans des fonds génétiques différents des variétés témoins ; *Annuelot*, *Stylet*, *Dahrawar* et *Rojo Yoko*, et sur les variétés parentales. Les résultats ont montrés un polymorphisme entre les deux variétés pour *Xgwm261*, *Xwmc44*, *Xgwm140*, *Xpsp2999* et *Xwmc89* soit pour les gènes : *Lr46*, *Rht* et *Glu*. L'analyse des F₂ pour *Lr34* « slow rusting gene » n'a montré aucune ségrégation hétérozygotie entre les individus.

Mots clés : *Triticum aestivum*, F₂, SAM, Marqueurs moléculaires, SSR, Rouilles.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. BENBELKACEM Abdelkader. M.R. « A » INRAA

Rapporteur : Mr. KELLOU Kamel. M.A.A U.F.M Constantine

Mme. DJENADI Chafika Attachée de Recherche INRA Algérie

Examineurs : Mme. KACEM Nadia Sandra M.A.A U.F.M Constantine

Année universitaire : 2014/2015