



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 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** de Biologie et Ecologie végétale

**قسم :** بيولوجيا وايكولوجيا النبات

**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 :

---

**Analyse de la diversité génétique de lignées interspécifiques  
Blé dur (*Triticum durum* Desf)/ *Aegilops geniculata* par  
les microsatellites (*SSR*)**

---

**Présenté et soutenu par :** Saoula Zohra

**Le :** 21/06/2016

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Mr. BENBELKACEM Abdelkader D. R. – INRA – Constantine.

**Rapporteur :** Mr. KELLOU Kamel M. A. A. – UFM – Constantine.

**Examinatrice :** Mme. HAMMOUDA Dounia M. C. A. – UFM – Constantine.

*Année universitaire  
2015 - 2016*

# *Dédicace*

*A mon père et ma mère*

*A mon frère Adel*

*A mes sœurs Salwa ; Imen et Meissa*

*A ma grand-mère*

## *Remerciement*

*Au terme de ce travail,*

*Je remercie d'abord le bon Dieu de m'avoir donné la patience, le courage d'accomplir cet humble travail.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères et mon profond respect à Mr Kellou.K , maitre assistant à l'université Frères Mentouri constantine 1, pour ses orientations, ses conseils et son suivi permanent.*

*Au président du jury Dr.Benbelkacem.A, directeur de recherche à l'INRA Constantine qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements vont au Dr.Hammoud D, Maitre de conférence à l'université Frères Mentouri constantine 1, pour 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.*

*Et sans oublier encore, toutes celles et tous ceux, qui de loin et de près ont participé : directement ou indirectement a ce travail.....*

*Hamza, Nadia , Nour el houda , Nihed*



***Résumé***

## **Résumé**

Cette étude est basée sur l'analyse de la variabilité génétique des descendants d'autofécondation (F7) issus de croisement interspécifique entre le blé dur (*Triticum durum* Desf.) et *Aegilops geniculata* Roth. par l'utilisation des microsatellites SSR (*Simple Sequence Repeat*). Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, université des Frères Mentouri Constantine-1. Sur les douze microsatellites utilisés dans cette étude, trois microsatellites (**WMC25**, **WMC257** et **WMC488**) sont apparus polymorphes, ce polymorphisme est dû soit à une délétion d'une séquence nucléotidique au sein de loci ou d'un changement de site d'hybridation des amorces d'amplifications de ces marqueurs. Ce large spectre de polymorphisme peut être exploité pour la recherche des QTL et leurs utilisations dans la sélection assistée par marqueurs (SAM) des blés cultivés.

**Mots clés :** *Triticum durum* Desf., *Aegilops geniculata*, Marqueurs moléculaires, SSR, Polymorphisme.

## **Abstract**

This study is based on analysis of the genetic variability of descendants of auto-fertilization (F7) from interspecific cross between durum wheat (*Triticum durum* Desf) and *Aegilops geniculata* Roth., by using SSR molecular markers (*Simple Sequence Repeat*). This work was carried out in the laboratory of Genetics, Biochemistry and Plant Biotechnology, University of Mentouri brothers Constantine – 1. Of the twelve microsatellites used in this study, three microsatellites (**WMC25**, **WMC48** and **WMS257**) appeared polymorphic, this polymorphism is due either to a deletion of a nucleotide sequence within the loci involved or a change of annealing site of the amplification primer's markers. This broad spectrum of polymorphism can be exploited to search for QTL and their uses in marker-assisted selection (MAS) of cultivated wheat.

**Key words:** *Triticum durum* Desf., *Aegilops geniculata* Roth., Molecular markers, SSR, Polymorphism.

## ملخص:

تستند هذه الدراسة على تحليل التنوع الوراثي لسلاسل من نسل الإخصاب الذاتي ناتجة عن تهجين حصل بين القمح الصلب النوع (واد زناتي 368) و *Aegilops géniculata Rot* و هذا باستعمال المعينات الجزئية من نوع *SSR*.

أنجز هذا العمل في مخبر علم الوراثة للكيمياء الحيوية و بيوتكنولوجيا النبات بجامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1 من بين 12 *SSR* 3 منها أظهرت اختلافا جينيا (*WMC25, WMC257 et WMC488*) و هذا الاختلاف الجيني ناتج عن: حذف قطع نيكلوتيدية في المواقع الجينية او تغيير في موقع التهجين مع المعينات الجزئية. هذا المجال الواسع للتعدد الجيني يمكن ان يستغل من أجل البحث عن *QTL* و استعمالها في الانتخاب المعتمد على المعينات الجزئية للقمح المزروع.

**الكلمات المفتاحية:** القمح الصلب، *Aegilops geniculata*، الاختيار باستعمال الوسما ت،

## 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.

**BET :** Bromide Ethidium.

**CTAB :** Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide.

**EDTA :** Éthylène Diamine Tétra-Acétique.

**F7 :** septieme génération du croisement.

**FAO:** Food and Agriculture Organization.

**H2O UP :** Eau ultra pure.

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

**ITGC:** Institut Technique des Grandes Cultures.

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

**Pb :** Paire de bases.

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

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

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

**SAM:** La sélection assistée par marqueurs.

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

**TBE :** Tris-Hcl, Boric acid et EDTA.



## Liste des figures

<b>Figure1.</b> Evolution et origine des génomes du genre <i>Triticum</i> .	3
<b>Figure2.</b> Comparaison des principales techniques de marquage moléculaire .	13
<b>Figure3.</b> Développement et application des microsatellites SSR.	16
<b>Figure4.</b> Les différentes phases obtenue.	18
<b>Figure5.</b> Pelote blanche obtenu.	19
<b>Figure6.</b> Analyse de la qualité d'extraction de 0,5 µg d'ADN génomique des échantillons étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.	24
<b>Figure7.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc25</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	25
<b>Figure8.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc44</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	26
<b>Figure9.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc161</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	27
<b>Figure10.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xbarc174</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	28
<b>Figure11.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc 177</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	29
<b>Figure12.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc488</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	30
<b>Figure13.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwms124</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	31
<b>Figure14.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwms135</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	32
<b>Figure15.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwms257</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	33
<b>Figure16.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc332</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	34
<b>Figure17.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus Xwmc169</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	35
<b>Figure18.</b> Vérification des résultats de l'amplification du <b>Locus gwm 493</b> sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés.	36

## Liste des tableaux

<b>Tableau1:</b> Tableau représentant les caractéristiques des principaux marqueurs .	12
<b>Tableau2:</b> Composition de mélange réactionnel de la PCR .	20
<b>Tableau 3:</b> programmes des PCR effectuées sur les différents génotypes.	20
<b>Tableau 4 :</b> Liste des microsatellites et leurs paires d'amorces utilisées.	21
<b>Tableau 5 :</b> Quantités d'ADN extraites.	23

# TABLE DE MATIERES

---

<b>Introduction générale</b>	1
<b>CHAPITRE I : Revue bibliographie</b>	
1 . Présentation du blé dur	2
1.1. Origine du blé dur	2
1.2. Caractéristiques génétiques	2
1.3. Amélioration génétique du blé	3
2. Importance de l' <i>Agelops geniculata</i> Roth	4
2.1 Description botanique d' <i>Agelops geniculata</i> Roth.	4
2.2 Introduction de l'espèce <i>Aegilops geniculata</i> Roth. dans l'amélioration du blé	5
3.Objectifs de l'amélioration du blé dur	5
3.1. Sélection assistée par marqueur	5
3.2. Apport des marqueurs moléculaires à l'amélioration du blé	6
4.Les marqueurs moléculaires	7
4.1. Le choix d'un bon marqueur	8
4.2. Types de marqueurs moléculaires	8
4.2.1. Marqueurs RFLP	9
4.2.2. Marqueurs de type PCR	9
5.Les applications des marqueurs Microsatellites chez les plantes	14
5.1. Les cartes génétiques et les diversités fonctionnelles	14
5.2. Comparaison et cartographie entre les génomes des plantes	15
<b>CHAPITRE II : Matériel et méthodes</b>	
1.Matériel végétal	17
2.Méthodes	17
2.1. Préparation des échantillons	17
2.2. Extraction de l'ADN	18
2.3. Quantification des extraits d'ADN par Nanodrop	19

# TABLE DE MATIERES

---

2.4.PCR (polymérase chaîne réaction)	20
2.5.Electrophorèse et lecture des résultats	22
<b>CHAPITRE III : Résultats et Discussion</b>	
1. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN extrait	23
1.1. Quantification de l'ADN	23
1.2. Qualité d'extraction	24
2. Résultats de l'amplification	25
2.1. Locus <i>Xwmc25</i>	25
2.2. Locus <i>Xwmc44</i>	26
2.3. Locus <i>Xwmc161</i>	27
2.4. Locus <i>Xbarc174</i>	28
2.5. Locus <i>Xwmc177</i>	29
2.6. Locus <i>Xwmc488</i>	30
2.7. Locus <i>Xwms124</i>	31
2.8. Locus <i>Xwms135</i>	32
2.9. Locus <i>Xwms257</i>	33
2.10. Locus <i>Xwmc332</i>	34
2.11. Locus <i>Xwmc169</i>	35
2.12. Locus <i>Xgwm493</i>	36
Conclusion et perspectives	37
Références	38
Annexe	42



*Introduction générale*

En Algérie, une grande diversité de blés cultivés était observée. En effet, au début du XX<sup>ème</sup> siècle une multitude de population de terroirs et /ou de variétés étaient cultivées, mais depuis la fin des années soixante, la gamme variétale locale a commencé à régresser sous les introductions massives des blés dits à haut potentiel génétique (**Abdelguerfi et Laouar, 2000**).

L'érosion de la diversité génétique des blés cultivés a conduit les études sur la possibilité d'introduction des espèces sauvages apparentées dans les programmes d'amélioration génétique du blé. Car elles constituent des ressources importantes de gènes utiles pour l'adaptation des blés cultivés aux maladies et contraintes environnementales.

Le regard c'est tourné vers les espèces du genre *Aegilops*, pleines de gènes de rusticité vue leur adaptation à différents climats. Le genre *Aegilops* apparenté au genre *Triticum* est une source précieuse d'importants traits économiques pour l'amélioration du blé (Valkoun et al., 1985 ; Holubec et al., 1993 In : **Zaharieva et al., 2003**).

**David et al., (2003)**, ont rapporté que beaucoup d'hybrides naturels ont été observés dans la nature entre *Aegilops* et blé dur, où ces espèces sauvages poussent à proximité des champs de blé. Les espèces d'*Aegilops* adaptées aux zones semis arides où les quantités d'eau sont limitées, sont un réservoir potentiel de gènes pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse des blés cultivés (**Baalbaki et al., 2006**).

Quoique, l'analyse des variations de séquences d'ADN est aujourd'hui abondamment exploitée pour la cartographie génétique, l'étiquetage de gènes ou encore l'analyse de populations (analyse de diversité génétique, étude d'évolution...) En effet, de nombreux marqueurs moléculaires tels que les RFLP, les AFLP, les RAPD ou encore les microsatellites (ou SSR) ont été utilisées pour conduire ce type d'analyse chez les végétaux.

Néanmoins, les SSR sont réputés être les plus performants pour des analyses de diversité dans de vastes collections de ressources génétiques

L'objectif de notre travail est d'analyser la variabilité génétique chez 10 lignées recombinantes (*RIL*) issus de croisement interspécifique entre le blé dur (*Triticum durum* Desf) et l'espèce apparentée d'*Aegilops geniculata* Roth. en utilisant les microsatellites (ou *SSR*).



***Chapitre I:***

***Revue bibliographie***

## 1. Présentation du blé dur

### 1.1. Origine du blé dur

Le blé est l'une des premières espèces cultivées par l'homme, depuis plus de 7000 à 10000 ans avant Jésus-Christ dans la région du croissant fertile, vaste territoire comprenant, la vallée du Jourdain et les zones adjacentes de la Palestine, de la Jordanie, de l'Irak, et la bordure Ouest de l'Iran (**Feldman, 2001**).

Selon Vavilov in Erroux (1961), le blé dur (*Triticum durum* Desf) a deux origines : l'Abyssinie et l'Afrique du Nord, alors que pour Grignac (1978), le Moyen Orient est le centre générateur du blé dur, où il s'est différencié dans trois régions : le bassin occidental de la méditerranée, le sud de la Russie et le Proche Orient (Syrie et nord de la Palestine). L'Afrique du Nord est considérée comme centre secondaire d'après la classification de l'espèce (**Chikhi, 1992**).

Chaque centre a donné naissance à des groupes de variétés botaniques possédant des caractéristiques phénologiques, morphologiques et physiologiques spécifiques (**Monneveux, 1991**).

### 1.2. Caractéristiques génétiques

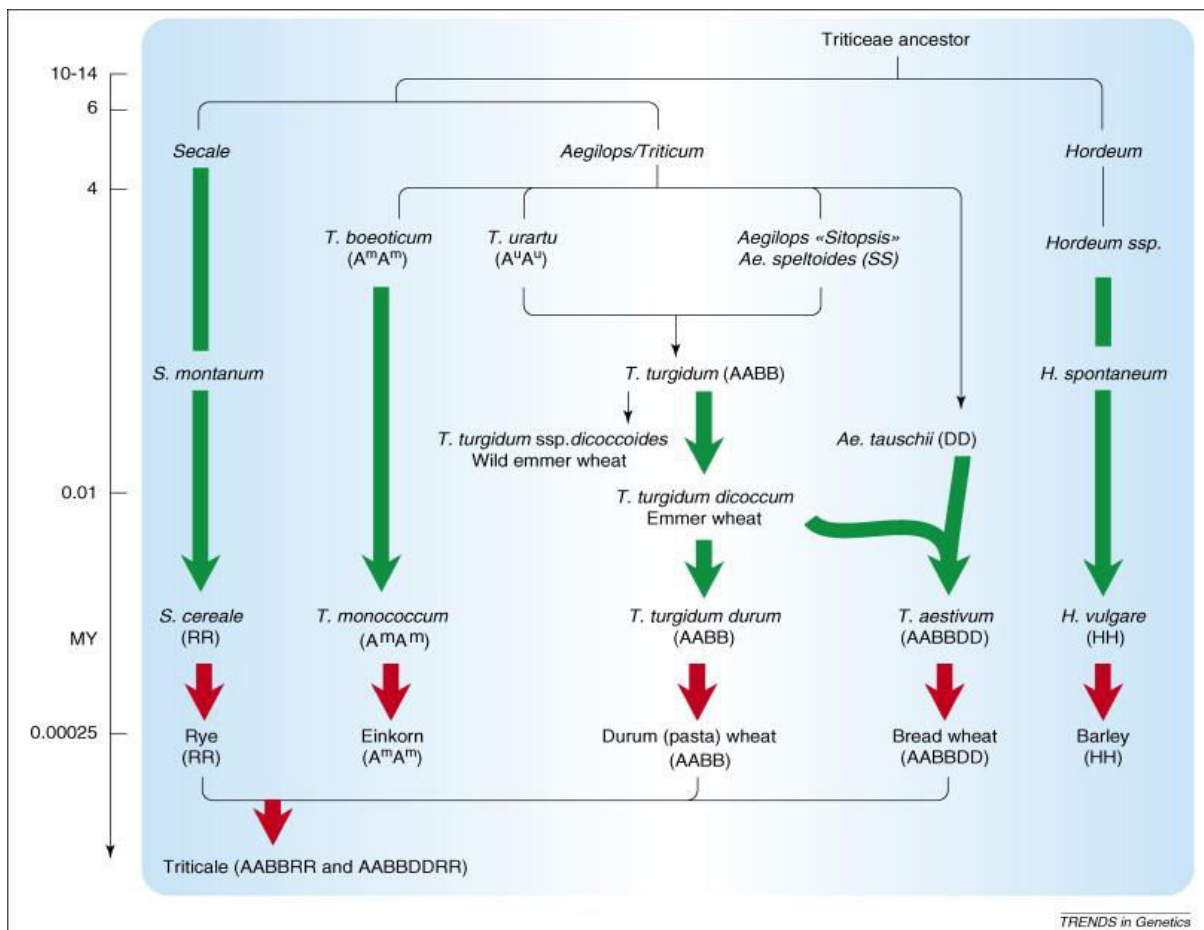
La filiation génétique des blés est complexe et incomplètement élucidée. Le genre *Triticum* regroupe de nombreuses espèces présentant une large gamme de diversité morphologique et agro-écologique

Le genre *Triticum* regroupe des espèces de ploïdies variées : des espèces diploïdes tel que l'Engrain (*Triticum monococcum* L.), des espèces tétraploïdes tels que l'Amidonnier (*Triticum dicoccum* L.) ou le blé dur (*Triticum durum* Desf.) et enfin des espèces hexaploïdes tel que le blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Parmi toutes ces espèces, le blé dur (*Triticum durum* Desf.) et le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) sont les plus cultivés.

Selon **Mackey, (1968)**, l'origine génétique du blé dur remonte au croisement entre deux espèces ancestrales *Triticum monococcum* et une graminée sauvage du nom d'*Aegilops spelta*. Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) appelé ainsi en raison de la dureté de son grain, possède  $2n = 4x = 28$  chromosomes. D'après **Feillet, (2000)**, le croisement naturel de *Triticum monococcum* (porteur du génome A)  $\times$  *Aegilops spelta* (porteur du génome B) a



permis l'apparition d'un blé dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) qui a ensuite progressivement évolué vers *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* puis vers *Triticum durum* (blé dur cultivé) (Huang et al., 2002). (Figure. 1)



**Figure 01:** Evolution et origine des génomes du genre *Triticum* (Feuillet et al., 2008).

### 1.3. Amélioration génétique du blé

L'amélioration génétique des blés 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.

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).

L'hybridation interspécifique ouvre des perspectives nouvelles complémentaires des méthodes d'hybridation intra-spécifique. Où l'obtention des hybrides interspécifiques, servant de matériel de départ pour la sélection d'importants traits économiques à introduire dans les variétés de blé dur constitue l'objectif majeur de l'amélioration génétique du blé. Dont, l'introduction de gènes de résistance des blés aux maladies depuis les espèces apparentées est l'exemple le plus illustrant.

En effet, les croisements interspécifiques sont aussi un moyen efficace dans l'amélioration des plantes pour le transfert des gènes et la production d'haploïdes. **Sharma, 1999**, rapporte que les croisements interspécifiques constituent une méthode importante dans la manipulation des génomes par l'introduction d'une seule variation aux cultures. En biologie, ils sont intéressants pour l'étude des génomes, le comportement des chromosomes et les relations phylogéniques.

## 2. Importance de l'*Agelops geniculata* Roth.

### 2.1. Description botanique d'*Agelops geniculata* Roth.

*Aegilops geniculata* Roth. est une espèce annule, autogame (Hammer, 1990), allo tétraploïde ( $2n = 4x = 28$ ), issu du croisement naturel entre deux espèces diploïdes *Aegilops umbellulata* zhuk. ( $2n = 2x = 14$ , UU) et *Aegilops comosa* ( $2n = 2x = 14$ , MM) ce qui donne la formule génomique UUMM. Elle pousse dans la région méditerranéenne, le moyen orient et les parties sud de la Russie et de l'Ukraine (**Zadri, 2009**).

En Algérie, *Aegilops geniculata* se retrouve dans une large gamme de conditions climatiques (**Bandou et al., 2009**). Ces auteurs ont collecté des populations de cette espèce sous des conditions bioclimatiques différentes, allant des plaines côtières au nord jusqu'aux hauts plateaux steppiques au sud, incluant les montagnes de l'Atlas Tellien. Bandou, non publié In **Bandou et al., (2009)** déclare qu'en Algérie, l'espèce *Aegilops geniculata* forme des populations mixtes avec *Aegilops neglecta*. Ainsi des types intermédiaires, issus d'hybridation, peuvent être observés.

### 2.2. Introduction de l'espèce *Aegilops geniculata* Roth. dans l'amélioration du blé

Le genre *Aegilops* représente une source de variabilité importante dans l'amélioration des blés pour la résistance aux stress abiotiques. Le genre le plus proche du genre *Triticum* et réparti en Asie de l'ouest et dans le bassin méditerranéen.

Parmi les espèces tétraploïdes *Aegilops geniculata* Roth. apparaît comme étant l'espèce la plus intéressante pour l'amélioration du blé dans la mesure où elle présente des caractères de résistance aux rouilles et à l'oïdium, au stress hydrique ainsi qu'au stress salin.

*Aegilops geniculata* est en affinité avec d'autre espèce du même genre avec lesquelles elle peut former des hybrides naturels. Elle peut également se croiser avec des formes de blé cultivées, tel que le blé dur et le blé tendre, l'hybridation avec le blé tendre a été signalés dès 1927 (Monneveux et Zaharieva, 2000).

### 3. Objectifs de l'amélioration du blé dur

La sélection a joué un rôle déterminant dans l'accroissement de la production agricole au cours du siècle dernier, tant dans les pays développés que dans les pays en développement. Les sélectionneurs de blé dur mettent l'accent sur l'amélioration simultanée et comportement agronomique, de la résistance aux maladies et des caractères qualitatifs du grain.

Les sélectionneurs de blé dur tentent aussi de maintenir la résistance aux maladies du blé et s'efforcent constamment d'intégrer une résistance stable aux taches foliaires, aux maladies transmises par les semences et à la fusariose de l'épi.

La capacité de sélection est si importante pour l'Algérie car on doit accroître notre production pour garantir la sécurité alimentaire.

#### 3.1. Sélection assistée par marqueur

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, 2002 et Hospital, 2002)

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**).

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**)

### **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**).

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**).

Les marqueurs moléculaires aident le sélectionneur à mieux connaître la génétique des caractères importants afin d'optimiser l'efficacité des programmes de sélection. L'utilisation des marqueurs moléculaires, aujourd'hui largement répandue, intervient dans divers programmes axés sur l'amélioration des céréales.

#### 4. Les marqueurs moléculaires

L'amélioration des plantes est basée sur une large utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiable de cette diversité dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent à la fois un diagnostic extrêmement fin de la variabilité et la mise en place de stratégies très rapides de création et sélection variétale (**Adam et Dron, 1993**)

Ces marqueurs présentent également différents avantages comparés aux marqueurs morphologiques et protéiques, très nombreux, neutres vis à vis de la sélection, couvrent le génome entier, indépendants de la partie de la plante prélevée et de son stade de développement et indépendants des influences environnementales (FAO, 1996, In : **Belkadi, 2003**).

Les marqueurs moléculaires deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection du blé dur (*Triticum durum* Desf.) pour les résistances aux maladies et insectes en offrant des solutions alternatives aux problèmes inhérents à l'utilisation des marqueurs phénotypiques traditionnels. Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires, mais cette étude sera consacrée aux microsatellites ou SSR

En effet, le sélectionneur peut inférer la présence d'un gène par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié et pourra ainsi sélectionner les individus résistants avant même que le caractère considéré ne soit exprimé et en absence du pathogène.

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.

En outre, les marqueurs moléculaires deviennent aujourd'hui un outil essentiel d'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur. Ils sont d'un grand intérêt lors du pyramidage de deux gènes ou plus dans une même variété permettant ainsi une résistance plus constante et à large spectre.

De même, les marqueurs moléculaires permettent le cumul rapidement 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**).

#### 4.1. Les caractéristiques 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.

#### 4.2. 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**).

#### 4.2.1. 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.

#### 4.2.2. 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*).

##### a. 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**)

#### **b. 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. Les amorces constituent donc les marqueurs. (**Santoni et al., 2000**).

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**).

### c. 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, codominants 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 et Langridge, 2000**).

Le taux de mutation élevé et la nature codominante favorisent l'estimation de la diversité intra- et interspécifique, et le mélange génétique entre les lignées, même si elles sont très proches.

En résumé, les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus, codominants 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

**Tableau 1** : 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 2, récapitule les principales techniques de marquage (RFLP, RAPD, AFLP et SSR).

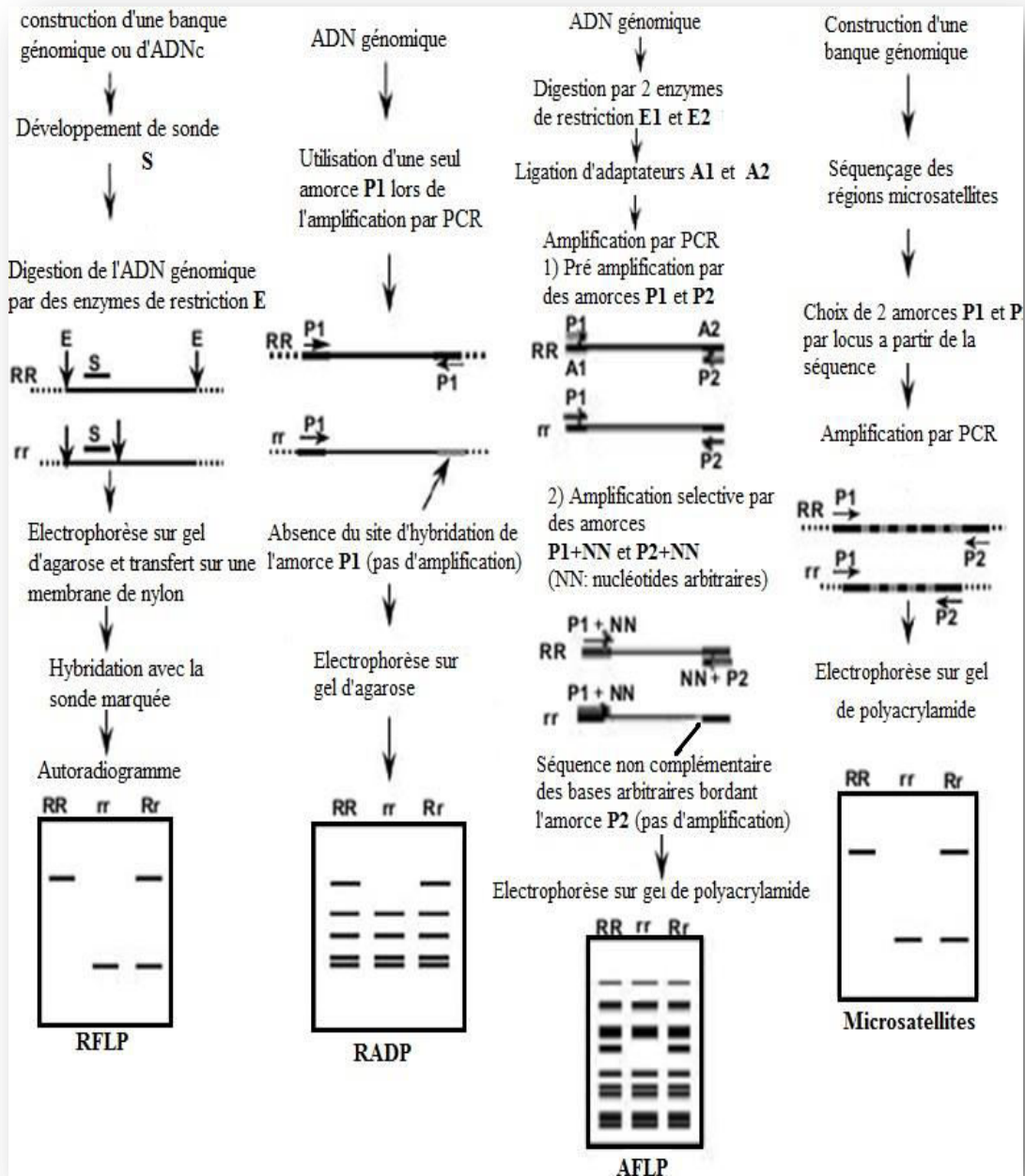


Figure 2 : Comparaison des principales techniques de marquage moléculaire.

### \* Avantages des marqueurs SSR

- ✓ Les microsatellites sont des marqueurs codominants ;
- ✓ Ils sont très largement utilisés ;
- ✓ Il y a une grande fréquence de SSR dans le génome ;
- ✓ Les microsatellites sont bien répartis à travers tout le génome ;
- ✓ Ils sont reproductibles ;
- ✓ Les microsatellites sont faciles à manipuler ;
- ✓ La répartition des microsatellites est assez lourde car il faut cribler une banque génomique enrichie avec une sonde microsatellite, séquencer les clones positifs, synthétiser les amorces oligonucléotidiques et tester les paires d'amorces dans un échantillon d'individus.

## 5. Les applications des marqueurs Microsatellites chez les plantes

### 5.1. Les cartes génétiques et les diversités fonctionnelles

Les marqueurs SSR développés à partir des banques génomiques, peuvent appartenir à la région transcrite ou à la région non transcrite du génome, en revanche, grâce aux marqueurs microsatellites on peut identifier certaines fonctions putatives de certains gènes et aussi détecter l'emplacement de ces gènes sur la carte génomique et cela par la localisation des motifs répétés (**Anderson et Lubberstedt, 2003**), les EST-SSR sont considérés comme une classe de marqueurs qui contribuent dans la sélection directe des allèles (**Sorrells et al., 1997**).

Par exemple, le gène DAG 1 gène qui contrôle la germination des graines chez *l'Arabidopsis thaliana* (Papi et al., 1997), et deux gènes (*Ppd*) responsable du photopériodisme chez le blé par l'utilisation des marqueurs EST-SSR (**Kyu et al., 2004**), finalement, par ces marqueurs SSR on peut facilement établir des cartes des gènes candidats et leur alignement sur leur génome et à travers des espèces relativement éloignées (**Varshney, et al., 2005**).

## 5.2. Comparaison et cartographie entre les génomes des plantes

L'atout le plus important pour des marqueurs génétiques SSR est que ces derniers sont transmissibles entre espèces relativement éloignées ; la transférabilité des marqueurs entre espèces et genres a été démontrée dans plusieurs études (**Varshney, et al., 2005**).

Les marqueurs SSR sont très utiles dans le développement de la conservation et l'analyse des gènes orthologues (deux séquences homologues de deux espèces différentes sont orthologues si elles descendent d'une séquence unique présente dans le dernier ancêtre commun aux deux espèces) pour la sélection. Par exemple, un ensemble de 12 EST-SSR chez l'orge ont été identifiés et il existe une homologie avec les ESTs de quatre espèces de monocotylédones (blé, maïs, sorgho et riz) et deux autres genres de dicotylédones (*Arabidopsis et le Medicago*) (**Varshney, et al., 2005**).

La figure 3, représente les différentes applications des marqueurs microsatellites (SSR) chez les plantes.

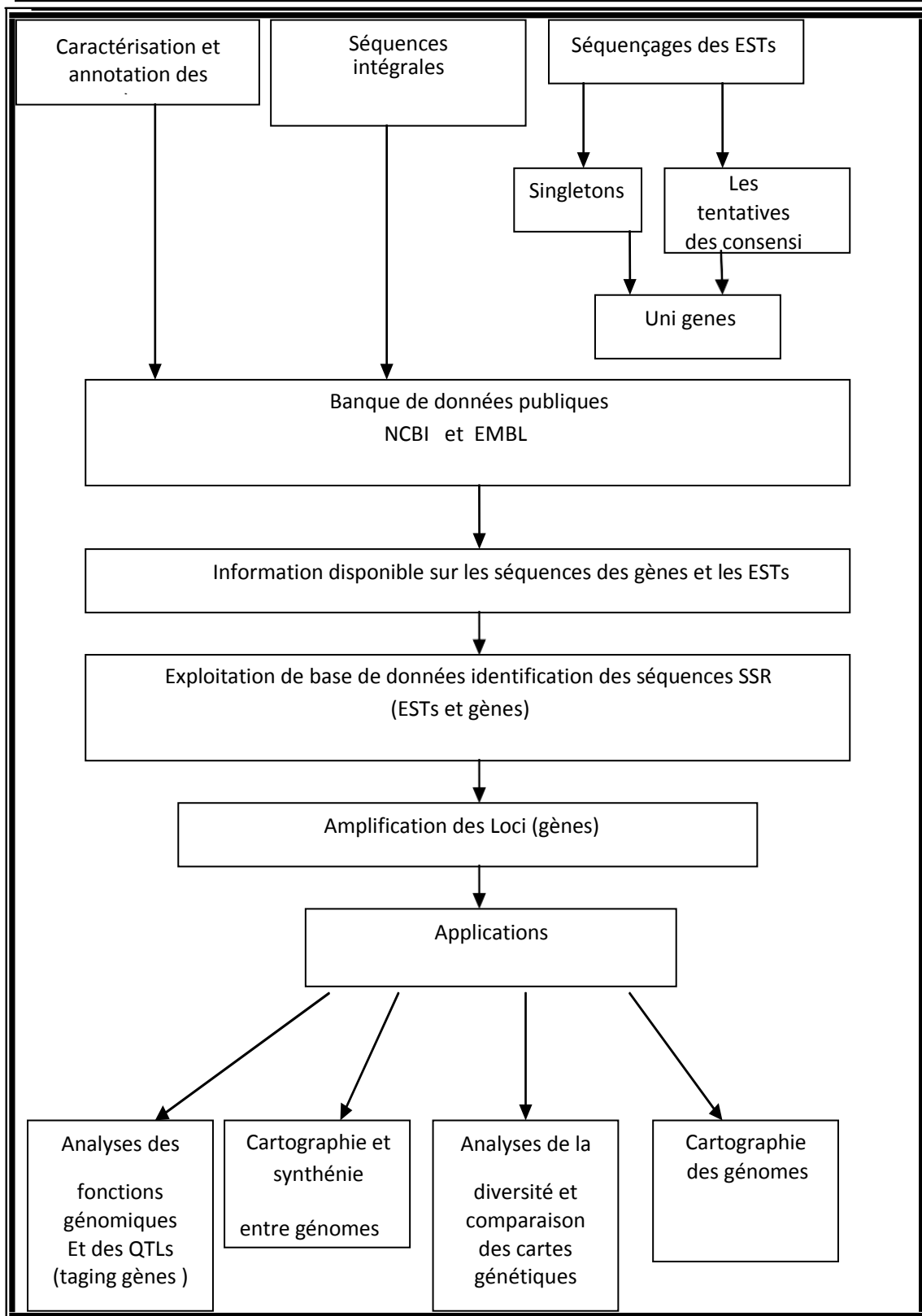


Figure 3 : Développement et application des microsatellites SSR (Varshney et al., 2005)



***Chapitre II:***

***Matériel et méthodes***

## Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, université des frères Mentouri Constantine – 1.

### 1. Matériel végétal

Pour réaliser notre essai, nous avons choisie 10 lignées recombinantes (H10, H1013, H1016, H1022, H1032, H18, H1814, H1817, H1818, H1822) issues de croisements interspécifiques blé dur (variété Oued Zenati 368) X *Aegilops geniculata* Roth. et leurs parents (Oued Zenati 368 et *Aegilops geniculata*).

La variété Oued Zenati 368 a été fournie par la station expérimentale de l'ITGC d'El-Khroub Constantine. C'est une variété locale d'ancienne sélection (*Triticum durum* Desf. Var. *leucomelan*. Al.). Elle est tirée des Bidis de la région d'Oued Zenati Guelma, depuis 1936. Le polymorphisme de cette variété et de ses lignées descendantes est apprécié par l'introduction des variétés *Chinese spring* et Courto de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), celles-ci sont utilisées dans le projet international de cartographie du génome de blé et elles sont introduites comme témoin, dans notre étude, pour la lecture génétique des marqueurs SSR étudiés.

Cependant, le parent sauvage *Aegilops geniculata* Roth. est obtenu d'une collection naturelle d'origine Constantine. Cette espèce est comparée par ses ancêtres *Aegilops umbellulata* et *Aegilops comosa* donneuses des génomes *U* et *M* respectivement. Elles sont issues d'une collection des espèces du genre *Aegilops* fournie par la station expérimentale de l'ITGC d'El-Khroub Constantine.

### 2. Méthodes

#### 2.1. Préparation des échantillons

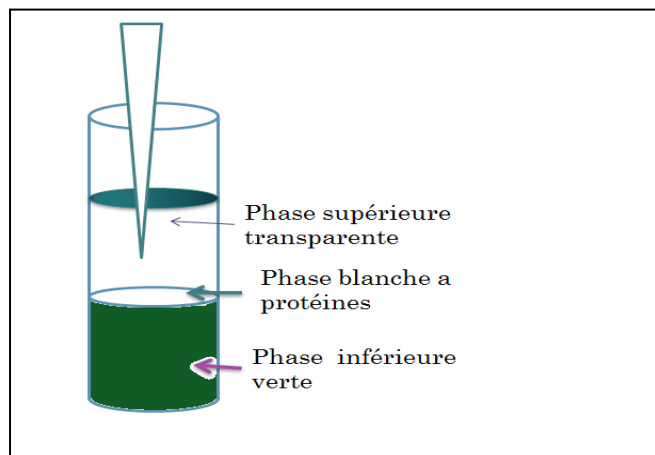
Les graines des génotypes étudiés sont pré-germées, et au stade 3<sup>ème</sup> feuilles, l'avant dernière feuille de chaque génotype est coupée avec un ciseau stérile et placée dans un tube Ependorf stérile de 2 ml. On a procédé à une extraction d'ADN selon la méthode CTAB modifiée selon **Murray & Thompson (1980)**.



## 2.2. Extraction de l'ADN

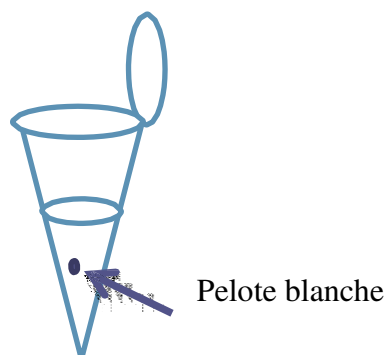
Le protocole d'extraction d'ADN est décrit ci-après :

- Préchauffer le tampon CTAB 2X additionné de  $\beta$ -mercapto-éthanol dans un bain Marie à 65° C ;
- Broyer le matériel végétal (environ 150 mg) dans un mortier avec de l'azote liquide en manipulant avec les gants ;
- A l'aide de spatule, pré-refroidie, transférer le broyat dans un tube à vis (Mettez les tubes contenant le broyat dans l'azote liquide, bien fermer les tubes) ;
- Ajouter 900  $\mu$ l de tampon CTAB 2X à 65° C ;
- Homogénéiser au vortex ;
- Incuber 60 min dans un bain Marie à 65C° avec agitation ;
- Centrifuger 15 min à 13000 rpm et à 4° C ;
- Récupérer le surnageant (environ 800  $\mu$ l) dans un nouveau tube eppendorf de 2 ml (stocker le culot à 4 C° à l'abri de la lumière) ;
- Ajouter 800  $\mu$ l du mélange Chloroforme/ Alcool isoamylique (24V : 1V) ;
- Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation ;
- Centrifuger 15 min à 13000 rpm et à 4° C ;
- Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube eppendorf (figure. 6) ;



**Figure 4 :** Les différentes phases obtenues

- Ajouter 3 à 5  $\mu\text{l}$  de RNase (10 mg/ ml) agiter par inversion et incuber à 37° C ;
- Ajouter 540  $\mu\text{l}$  (2/3 volume) d'isopropanol froid (- 20° C) ;
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche ;



**Figure 5 :** pelote blanche obtenu

- Laisser précipiter à - 20° C pendant 5 à 10 min ;
- Centrifuger 10 min à 13000 rpm et à 4° C ;
- Eliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette) ;
- Ajouter 500  $\mu\text{l}$  de solution de lavage 1 (Composition en Annexe n°1) ;
- Incuber pendant 15 min à température ambiante ;
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm et à 4° C ;
- Eliminer le surnageant et ajouter 500  $\mu\text{l}$  de solution de lavage 2 (Composition en Annexe n°2) ;
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm à 4° C ;
- Eliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min ;
- Resuspendre le culot d'ADN dans 100  $\mu\text{l}$  de TE 0.1 ou l'eau ultra pure stérile ;
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4° C avant dosage.

### **2.3. Quantification des extraits d'ADN par Nanodrop**

Le spectrophotomètre NanoDrop ND-2000 permet de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant des petits volumes d'échantillons de l'ordre de  $\mu\text{l}$ .

Il permet des mesures sur une grande gamme de longueurs d'onde pour l'analyse des spectres dans le visible et l'U.V. Cet appareil est spécialement conçu pour évaluer la pureté et la quantité des acides nucléiques.

#### 2.4. PCR (polymérase chaîne réaction)

Pour la réalisation de la PCR, le volume réactionnel utilisé est de 10  $\mu$ l, on a procédé à réaliser l'amplification de l'ADN dans des plaques de 96 puits

La composition du mélange réactionnel est présentée dans le tableau suivant :

Réactifs de mix	Volume
Gotaq Master Mix 2X	5 $\mu$ l
AND matrice	1.5ul
Amorce	1 $\mu$ l
H2O UP	2.5 ul

Le tableau 3 résume les programmes des PCR utilisés pour l'amplification des marqueurs étudiés qui dépend de la température d'hybridation ( $T_a$ ) des couples d'amorces, ainsi que le temps dépend de la taille des fragments à amplifier.

T° /les prog	P1 (51°)	P2 (61°)	P3(60°)	P4 (60°)	P5 (52°)
94c°	3min	3min	3min	3min	3min
94c°	1min	30sec	30min	30min	30min
72c°	2min	1min	45min	30min	7min
72c°	10min	10min	1min	7min	
60c°	1min				30min
61c°		45sec			30min
51c°			10min	30min	
Nb des cycles	45 cycles	35 cycles	40 cycles	40 cycles	40 cycles

**Tableau 4 :** Liste des microsatellites et leurs paires d'amorces utilisées.

Locus	Location des marqueurs sur chromosome	Amorce gauche 5' → 3' Amorce droite 5' → 3'	T° d'hybridation (° C) pour PCR
Xwmc25F Xwmc25R	DUM	5'TAAGATACATAGATCCAACACC3' 5'GGTCTTCTGGGTTTGATCCTG3'	51C°
Xwmc44F Xwmc44R	2B	5'GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG-3' 5'TGTTGCTAGGGACCCGTAGTGG-3	61C°
xwmc177F xwmc177R	2A	5'AGGGCTCTCTTTAATTCTTGCT-3' 5'GGTCTATCGTAATCCACCTGTA3'	51C°
xwmc161F xwmc161R	4A	5'-ACCTTCTTTGGGATGGAAGTAA-3' 5'-GTACTGAACCACTTGTAACGCA-3'	61C°
xbarc174F xbarc174R	7AM	5' TGGCATT TTTCTAGCACCAATACAT 3' 5GCGAACTGGACCAGCCTTCTATCTG T3'	52C°
xwmc488F xwmc488R	7A	5'-AAAGCAACCAGTTATGCCAC-3' 5'- GAACCATAGTCACATATCACGAGG3'	61C°
xwms124F xwms124R	1B	5' GCCATGGCTATCACCCAG 3' 5' ACTGTTCCGGTGCAATTTGAG 3'	60 C°
xwms135F xwms135R	1A	5' TGTC AACATCGTTTTGAAAAGG 3' 5' ACACTGTCAACCTGGCAATG 3'	60 C°
xwms25f xwms257R	2B	5' AGAGTGCATGGTGGGACG3' 3' 5' CCAAGACGATGCTGAAGTCA 3'	60C°
xwmc332F xwmc332R	2B	5CATT TACAAAGCGCATGAAGCC3' 5GAAA ACTTTGGGAACAAGAGC3'	61C°
xwmc169F xwmc169R	3A	5'TACCCGAATCTGGAAAATCAAT3' 5'TGGAAGCTTGCTAACTTTGGAG3'	61C°
xgwm493 x gwm493	3B	5'TTCCCATAACTAAAACCGCG3' 5'GGAACATCATTCTGGACTTTG3 ,	52 C°

### **2.5. Electrophorèse et lecture des résultats :**

Pour la lecture des résultats on a préparé un gel d'agarose de 3% (P/V) soit 3g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE (tris borate EDTA).

Le gel est amené doucement à ébullition dans un four à microonde, ainsi il est refroidi ; avant de verser le gel dans le support de la cuve. Lorsque le gel d'agarose est solidifié, le support contenant le gel est placé dans l'appareil de l'électrophorèse rempli par le tampon.

Aux produits de PCR on a déposé 10  $\mu$  l dans chacun des puits du gel submergé de tampon d'électrophorèse. Dans l'un des puits de chaque gel on a déposé 4 $\mu$  l de marqueur de taille (ladder) de 50 pb (biomatik) qui permet de vérifier la taille des fragments amplifiés.

La migration des échantillons est effectuée sous 130 V pendant 2 h. 40 min, lorsque la migration est terminée on a passé à la lecture des résultats.

Le traitement des images des gels après électrophorèse et le calcul de la taille des bandes a été réalisé par le logiciel photo Capt.



***Chapitre III:***  
***Résultats et discussions***

## 1. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN extrait

### 1.1. Quantification de l'ADN

Après l'extraction de l'ADN, on a procédé à une quantification de nos extraits par spectrophotométrie en utilisant le *Nanodrop* pour connaître les concentrations de nos échantillons et leur pureté afin de réaliser l'amplification par PCR.

Géotypes étudiés		Concentration d'ADN (ng/μl)	260/280	260/230
1	<i>Chinese spring</i>	1985	1,91	1,88
2	BT Court	789,3	1,96	2,1
3	BD OZ	699,7	2	2,03
4	Ae gen	330,6	1,98	1,81
5	Ae com	961,9	1,72	0,97
6	Ae umb	574,3	1,89	1,94
7	H 10	443,5	1,93	1,88
8	H 1013	1221,3	1,95	1,85
9	H 1016	2260,9	1,91	2,03
10	H 1022	702,9	1,99	2,03
11	H 1032	1052,8	1,91	2,07
12	H 18	1583	1,88	1,86
13	H 1814	1222,7	1,99	1,92
14	H 1817	819,3	1,98	1,93
15	H 1818	1411,4	1,9	1,97
16	H 1822	991,3	1,88	2,11

On note que les concentrations obtenues sont largement suffisantes pour un bon déroulement d'une amplification d'ADN, les concentrations de nos échantillons varient entre 2260,9 ng/μl et 330,6 ng/μl, pour l'hybride H1016 et *Aegilops geniculata* respectivement. (Tableau 5).

La pureté des extraits d'ADN est évaluée par le rapport d'absorbance Abs 260/280 nm. Ce dernier est en moyenne de 1.86 ng/ μl (valeurs varient entre 2 et 1,72). Ce qui nous permet de dire que nos extraits d'ADN sont purs des contaminations protéiques ou ARN.

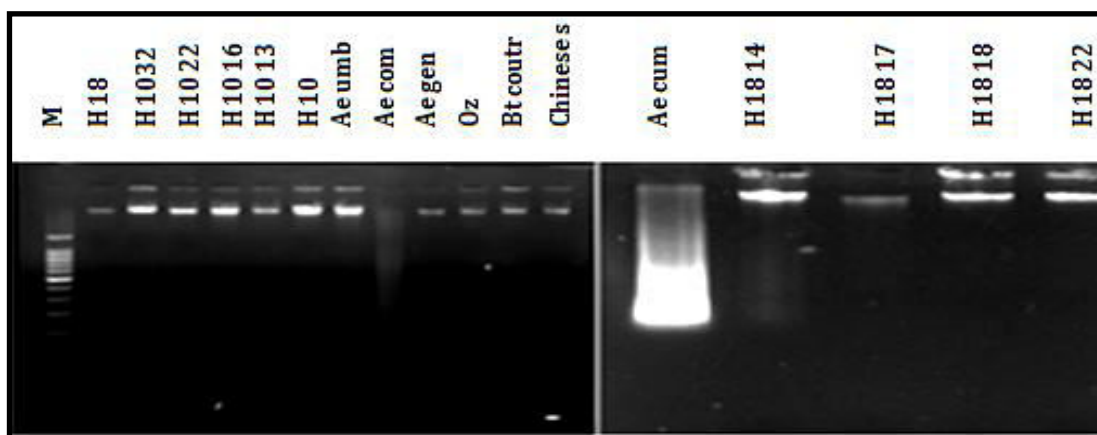
D'après le rapport d'absorbance 260/230 nm on peut également dire que les extraits d'ADN sont aussi purs des contaminations par les composés phénoliques utilisés au cours d'extraction, avec une moyenne de 1.54 ng/μl (valeurs varient entre 0.97 et 2.11).

L'analyse des rapport  $R_1 = 260/280$  et  $R_2 = 260/230$  montrent que la pureté d'ADN pour les contaminations en protéines et en ARN respectivement est assurée, pour cette évaluation nous avons utilisé les normes suivantes (Nolan *et al.*, 2006)

- $1,8 \leq R \leq 2$  ADN est pur
- $R < 1,8$  Contamination par les protéines
- $R > 2$  Présence d'ARN

### 1.2. Qualité d'extraction

A partir des résultats d'électrophorèse effectuée sur les extraits d'ADN des différents génotypes étudiés, on note que la qualité des extraits d'ADN est bonne et ceci ce rapporte à l'obtention d'une seule bande de taille commune et d'intensité variable pour l'ensemble des individus, selon les quantités obtenues.



**Figure 6 :** Analyse de la qualité d'extraction de 0,5 µg d'ADN génomique des échantillons étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

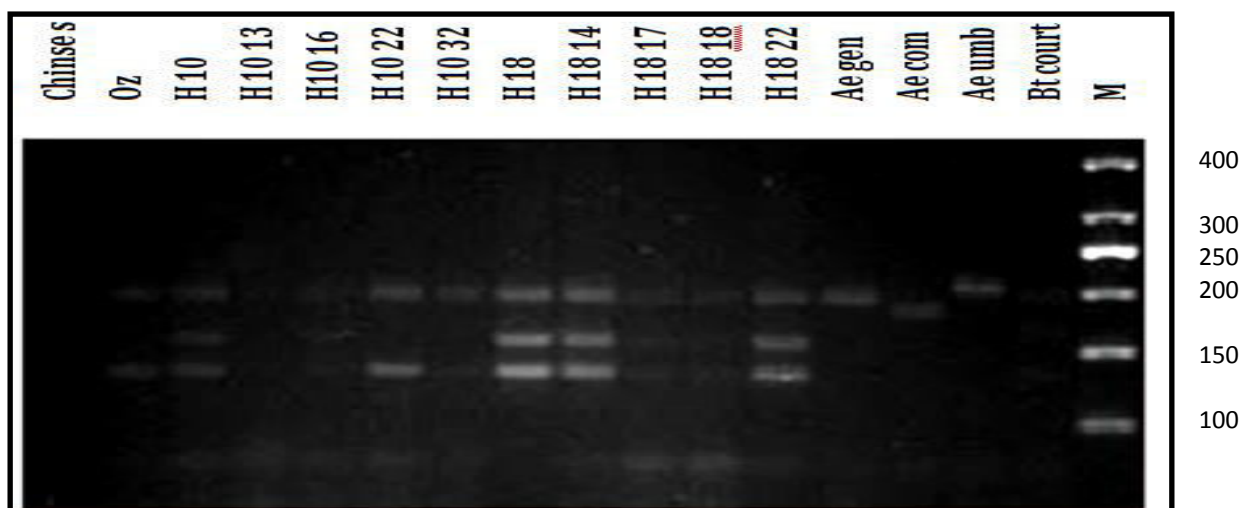


## 2. Résultats de l'amplification

### 2.1. Locus *Xwmc25*

Les résultats d'électrophorogramme des amplifiats de ce marqueur WMC25 ont permis de déceler l'existence de polymorphisme entre les 10 lignées et leurs parents ainsi qu'entre les espèces d'*Aegilops* et la variété Oued Zenati 368, car aucune amplification n'a été enregistrée pour les deux variétés témoins de blé tendre (*Chinese spring* et Courto) (Figure.7) alors que l'amplification de ce marqueur chez *Chinese spring* en utilisant la même paire d'amorce nous donne normalement une amplification de 166 pb attendues selon Somers et Isaac (2004) in : **Anonyme, 2016**

Les résultats de la cartographie de ce marqueur ont permis de constater qu'il est porté par les bras courts des chromosomes 2B et 2D chez le blé tendre. **Anonyme, 2016.**



**Figure 7 :** Vérification de l'amplification du locus *Xwmc25* sur gel d'agarose de 3% chez les 16 génotypes étudiés

Cependant, chez la variété OZ du blé dur on a enregistré l'amplification de deux bandes de tailles différentes de 200 et 130 pb, alors que les *Aegilops* (*Aegilops geniculata*, *Aegilops cumosa* et *Aegilops umbellulata*) ont présenté une seule bande de taille aussi variable entre les trois espèces (200, 180 et 210 respectivement).

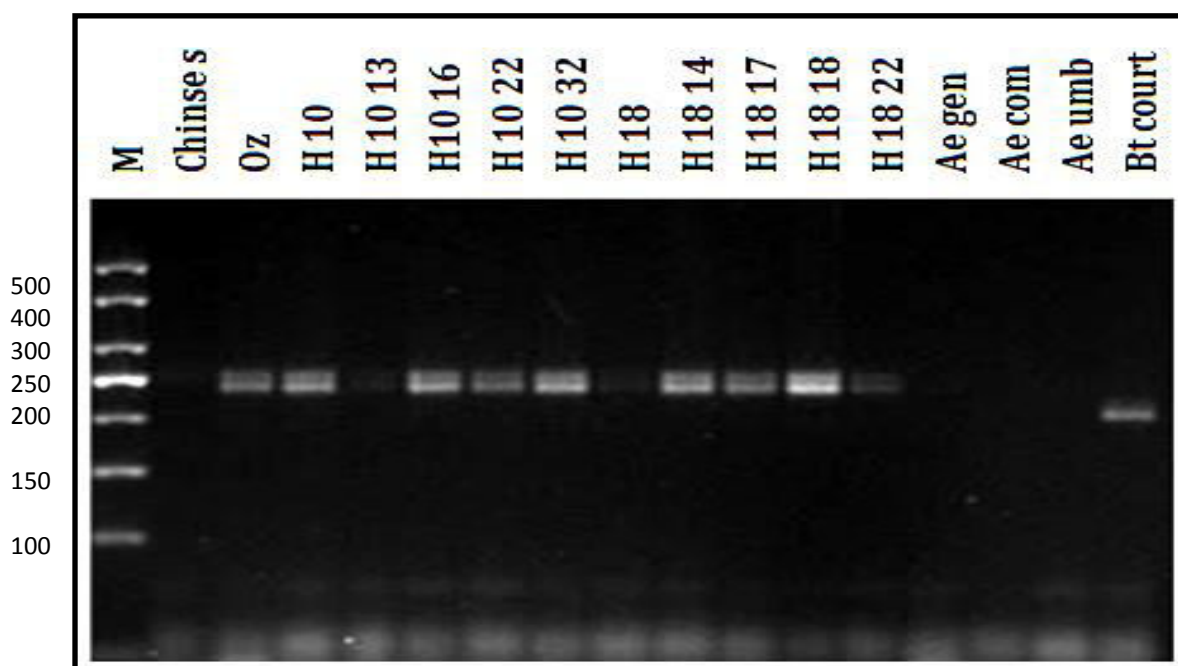
En effet, les hybrides H10, H18, H1814, H1822 ont présenté une troisième bande de taille 160 pb. Ceci est peut être dû à une duplication de ce locus *Xwmc25* ou une délétion sur l'un des loci des chromosomes porteurs de ce marqueur (bras court du chromosome 3B,

chromosomes du génome U ou M hérités du parent sauvage *Aegilops geniculata*). Sinon une modification survenue dans un site de l'hybridation de l'une des deux amorces. Ainsi, les hybrides H1022 et H1032 ont présenté le même profil, de deux bandes, que leur parent OZ.

Chez les lignées H1013, H1016, H1818 et H1817 il n'y a pas d'amplification, ce qui peut être expliqué par une erreur de manipulation, car le volume dans lequel la réaction de l'amplification (PCR) s'est déroulée est très peu pour une telle analyse de polymorphisme.

## 2.2. Locus *Xwmc44*

Ce marqueur n'est pas polymorphe, où on a enregistré chez OZ et ses descendants l'apparition de deux bandes de tailles communes (240 et 260 pb). Alors que le témoin *Chinese spring* et les espèces d'*Aegilops* n'ont pas enregistré d'amplification. Cependant, la variété Courtot de blé tendre a enregistré une amplification d'une seule bande d'environ 210 pb. (Figure8).



**Figure 8** : Vérification de l'amplification du Locus *Xwmc44* sur gel d'agarose de 3% chez les 16 génotypes étudiés

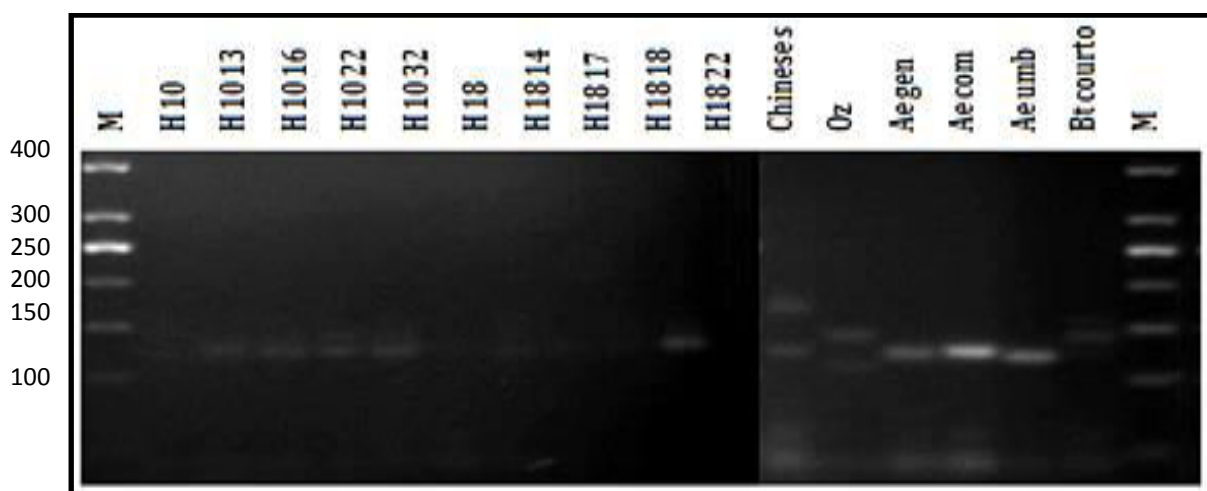
Les résultats attendus de l'amplification de ce marqueur pour la variété *Chinese spring* est d'obtenir une bande de 242 base selon Somers et Isaac (2004) in : **Anonyme, 2016**. Ainsi, l'avantage que peut apporter ce marqueur c'est qu'il est porté par le bras long du chromosome 1B et il co-ségrège avec les deux gènes de résistance aux rouilles *Lr46* et *Yr29* et les deux marqueurs *barc80* et *gwm259*.

*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).

L'obtention de deux bandes pour ce marqueur nous permet de dire que la variété OZ et ses descendants ont deux formes alléliques pour ce locus, ce qui demande plus d'étude sur la résistance et la sensibilité de ces génotypes vis-à-vis les deux maladies de rouille.

### 2.3. Locus *Xwmc161*

A partir de ce profil électrophorétique on observe qu'il y a deux bandes chez *Chinese spring* (avec 170 et 130 pb) et OZ (avec 140 et 110 pb), alors que les *Aegilops* (*Aegilops geniculata*, *Aegilops cumosa* et *Aegilops umbellulata*) ont présenté une seule bande de tailles différentes (126, 126 et 143 respectivement). (Figure 9).



**Figure 9** : Vérification de l'amplification du Locus *Xwmc161* sur gel d'agarose de 3% chez les 16 génotypes étudiés

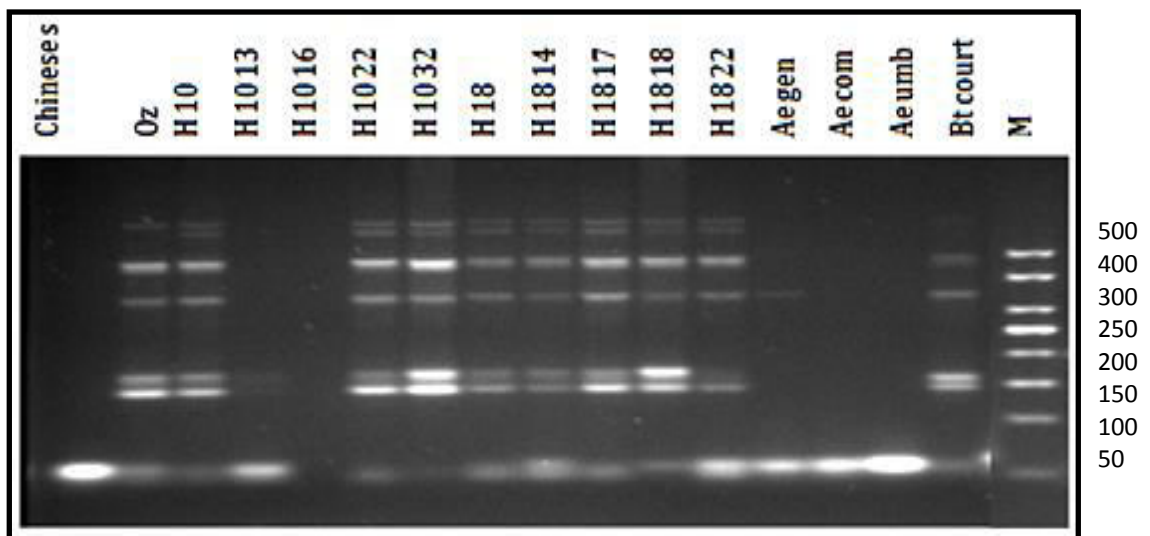
Cependant, la variété Courtot de blé tendre a enregistré une amplification d'une bande d'environ 140 pb. Chez les hybrides (H10, H18, H1814, H1817 et H1818) il n'y a pas d'amplification, ce qui peut être expliqué par les erreurs de manipulation vu qualité de gel et l'intensité des bandes chez les génotypes étudiés.

Chez le reste des individus on note qu'il y a une bande commune de taille (environ de 130 pb). A partir de ce gel, on peut conclure que le locus *Xwmc161*, porté sur les bras longs

des chromosomes 4A et 5D du blé tendre, est localisé aussi chez les *Aegilops* sur l'un des chromosomes des génomes U et M et que les lignées ont hérité ce locus du parent sauvage.

#### 2.4. Locus *Xbarc174*

A partir de cet électrophorégramme on observe qu'il n'y a aucune amplification chez *Chinese spring*, *Aegilops umbellulata*, *Aegilops comosa*, H1013 et H1016. Cependant, le parent OZ et les autres hybrides montrent plus de cinq bandes communes de tailles variables (150, 175 et 470 pb) et les deux autres dépassent les 500 pb. On peut dire que ces individus sont hétérozygotes pour ce locus. Ainsi chez *Aegilops geniculata* on observe qu'une seule bande de taille 360 pb. (Figure10).

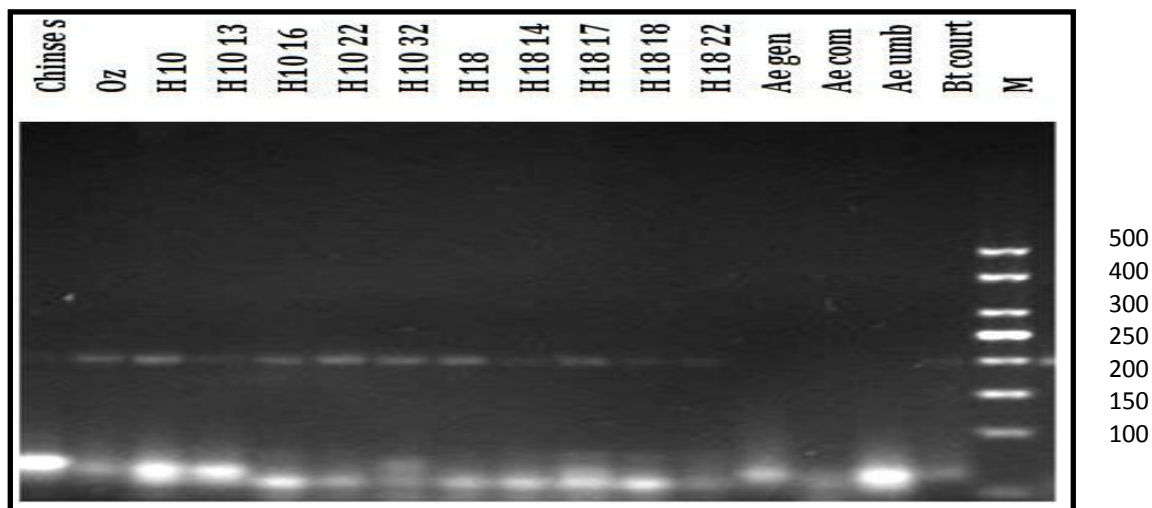


**Figure 10** : Vérification de l'amplification du Locus *Xbarc174* sur gel d'agarose de 3% chez les 16 génotypes étudiés

Pour une bonne séparation on peut proposer de refaire la séparation par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Il est à noter que le locus *Xbarc174* existe sur les chromosomes 7A et 1B du blé.

### 2.5. Locus *Xwmc177*

L'amplification de ce marqueur nous a permis de noter qu'il y a un profil électrophorétique commun chez OZ et ses descendants. On a enregistré une amplification d'une bande d'environ 200 pb, par contre il n'y a pas d'amplification chez le blé tendre (*Chinese spring*) et les *Aegilops* (*Ae. geniculata*, *Ae. cumosa* et *Ae. umbellulata*). (Figure 11).

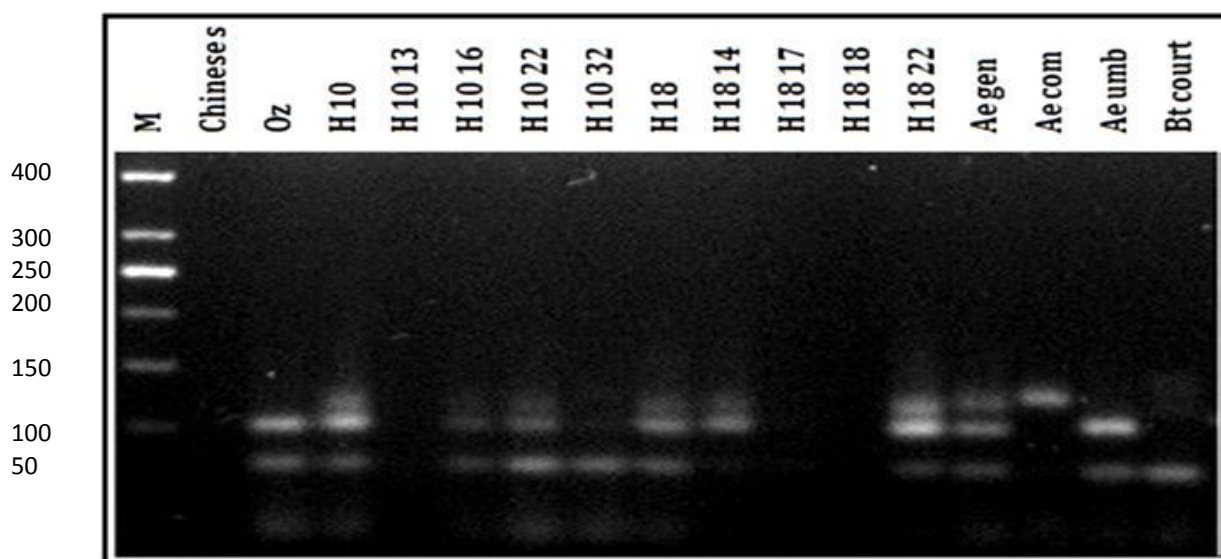


**Figure 11** : Vérification de l'amplification du **Locus *Xwmc177*** sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 géotypes étudiés

Selon la bibliographie, **anonyme 2016**, ce locus existe sur le bras court du chromosome 2A. L'utilisation du même couple d'amorces que l'on a, pour amplifier ce marqueur chez *Chinese spring* a permis d'obtenir une bande de 184 pb. (Somers et Isaac, 2004 in : **Anonyme, 2016**).

### 2.6. Locus *Xwmc488*

A partir de ce profil électrophorétique on a enregistré chez OZ, H10, H1016, H1022, H18, H1814, H1822, *Aegilops geniculata* et *Aegilops umbellulata*, deux bandes communes de tailles variables (75 et 100 pb). Chez les individus H10, H1822 et *Aegilops geniculata* on note l'apparition d'une troisième bande de taille 110 pb. Cette bande existe aussi chez le diploïde *Ae. comosa* qui est le donneur du génome M ainsi que le deuxième diploïde *Ae. umbellulata* présente deux bandes qui sont reporter aussi chez l'*Aegilops geniculata* et ses descendants. (Figure 12).



**Figure 12** : Vérification de l'amplification du Locus *Xwmc488* sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

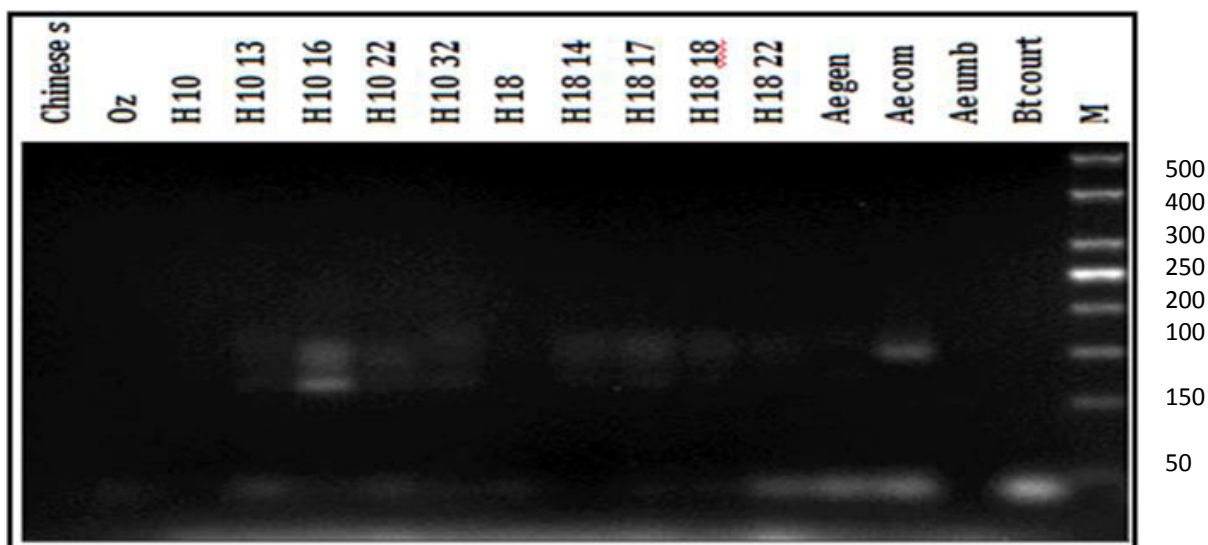
Cependant la variété témoin blé tendre Courto, l'*Aegilops comosa* et H1032 présentent une seule bande de taille variable (71, 122 et 76 respectivement). Par contre, chez H1013, H1817, H1818 et *Chinese spring* aucune amplification n'a été enregistrée. Ceci est peut être dû aux erreurs de manipulation. Pour le blé tendre, l'absence d'amplification chez *Chinese spring* n'indique plus que ce locus est absent chez ce génotype. Puisque, chez *Chinese spring* ce locus a été répertorié sur les chromosomes 7A et 7D avec une taille de 136 bases. (Somers et Isaac, 2004 in : **Anonyme, 2016**).

En effet, ce locus existe aussi sur l'un des chromosomes des deux génomes de l'*Aegilops geniculata* (U et M). Selon Somers et Isaac (2004) ce locus a été identifié sur le génome M.

L'amplification spécifique pour ce marqueur avec le couple d'amorces utilisé a permis d'obtenir un polymorphisme remarquable entre les lignées recombinantes. Ces dernières présentent entre 2 à 3 bandes, par comparaison avec leurs parents on trouve que OZ ne présente que deux bandes alors que *Ae. geniculata* a 3 bandes, ces 3 bandes ont comme origine ancestrale l'*Ae. comosa* et l'*Ae. umbellulata*, ce qui reflète leur existence sur les génomes M et U Somers et Isaac (2004).

### 2.7. Locus *Xwms124*

A partir de ce gel (Figure 13), on note qu'il n'y a pas d'amplification chez *Chinese spring*, OZ, H10, H1013 et les *Aegilops* (*Ae. umbellulata* et *Ae. geniculata*). Alors que chez l'hybride H1016 on a enregistré deux bandes de taille variable (90 et 150 pb) ainsi que chez *Ae. comosa* une seule bande de taille 150 pb a été enregistrée.

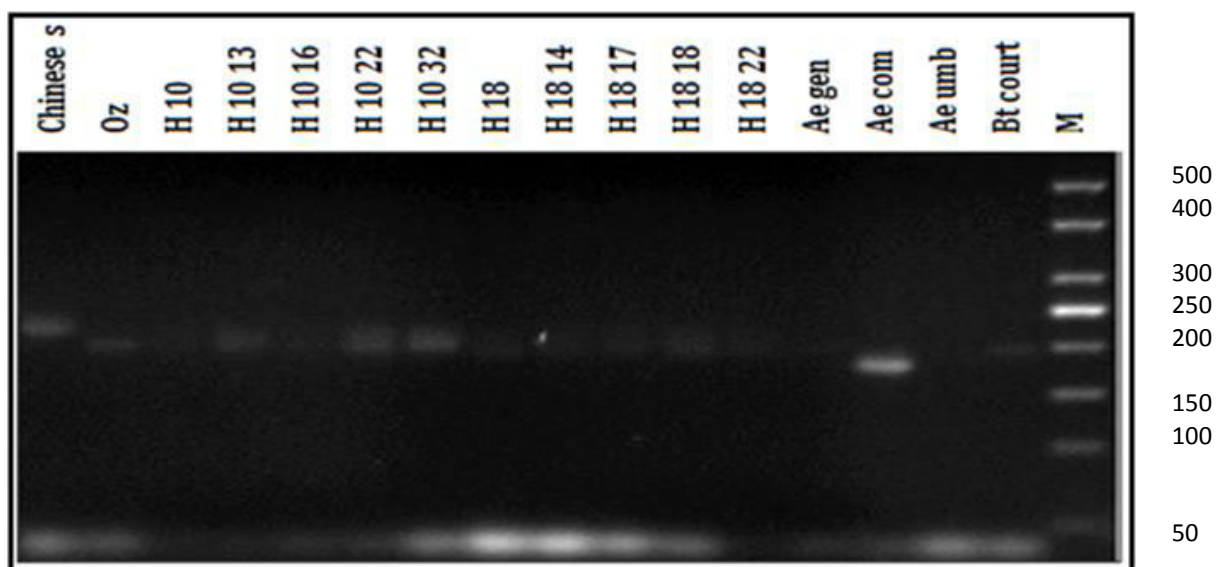


**Figure13** : Vérification de l'amplification du **Locus *Xwms124*** sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

Roder et al., 1998 in : **Anonyme 2016**, ont rapporté que ce marqueur est porté par le bras long du chromosome 1B. Alors qu'on a enregistré aussi une amplification positive chez *Ae. comosa*, ce qui peut nous permettre de conclure que ce marqueur existe aussi sur l'un des chromosomes du génome M.

### 2.8. Locus *Xwms135*

L'électrophorégramme des résultats d'amplification a marqué les lignées étudiées par une seule bande de taille de 200 pb pour ce locus. Ceci est observé chez OZ et quelques descendants (H1013, H1022 et H1032). On a enregistré chez le blé tendre *Chinese Spring* et courtot une seule bande de taille différente (200 pb et 230 pb) (Figure 14).



**Figure14** : Vérification de l'amplification du Locus *Xwms135* sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

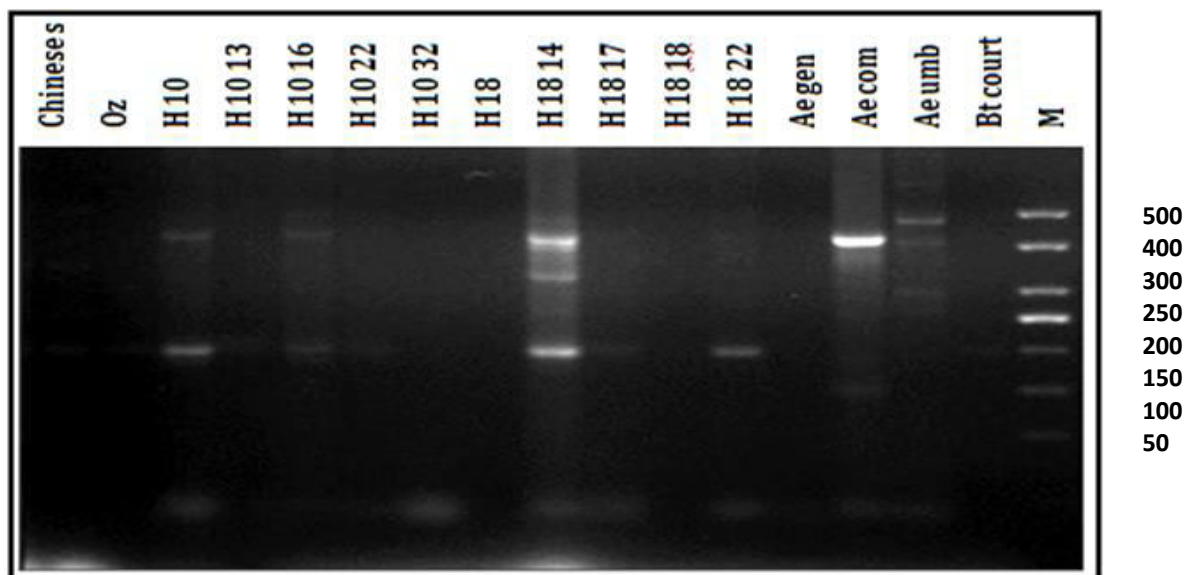
Cependant, l'espèce diploïde *Aegilops comosa* a présentée une seule bande de taille 180 pb alors que chez l'*Aegilops geniculata* et *Aegilops umbellulata* aucune amplification n'a été enregistré.

Ce locus est attribué au bras long du chromosome 1A (Anonyme, 2016). Néanmoins, dans notre cas d'étude il figure aussi sur l'un des chromosomes du génome M de l'*Ae. comosa*.



### 2.9. Locus *Xwms257*

Pour ce locus on a enregistré une amplification d'une seule bande de taille commune de 200 pb chez *Chinese spring*, OZ, H10, H1016, H1814, H1822. Ainsi que chez les hybrides H10 et H1814 il y a une deuxième bande de taille 440 pb. On peut dire que ces individus sont hétérozygotes. (Figure 15).



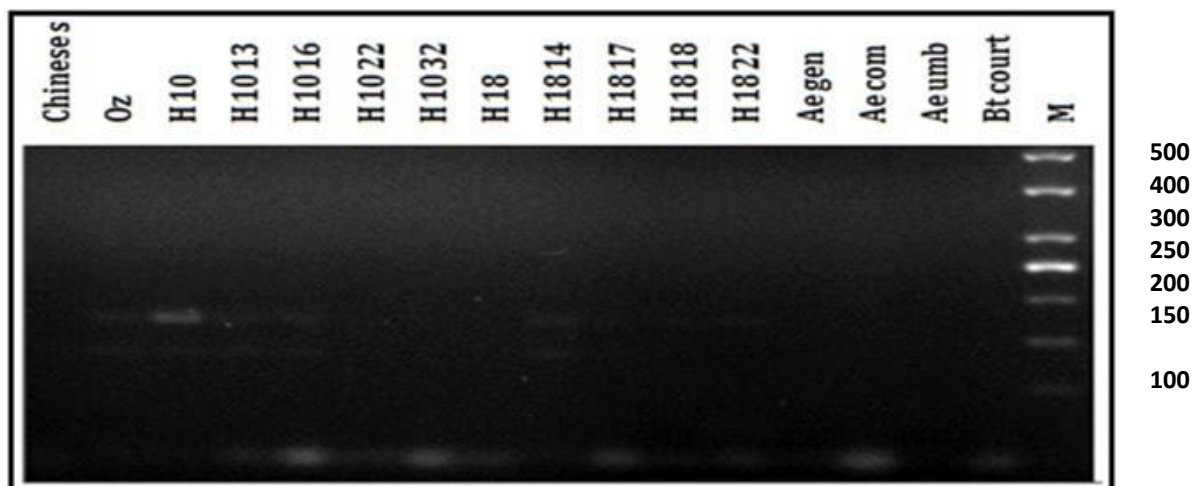
**Figure15** : Vérification de l'amplification du **Locus *Xwms257*** sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

Cependant, les deux espèces ancestrales d'*Aegilops geniculata* (*Ae. comosa* et *Ae. umbellulata*) présentent une seule bande de taille (420 et 490 pb respectivement), Par contre, chez les individus H1013, H1022, H1032, H18, H1817, H1818, *Aegilops geniculata* et la variété courtot du blé tendre on n'a pas d'amplification. Nous pouvons suggérer de refaire la PCR pour ce locus avec des volumes de 20 µl ou plus et d'effectuer une électrophorèse sur gel d'acrylamide pour une bonne résolution et un bon résultat de séparation.

Le locus de ce marqueur figure sur le bras court du chromosome 2B. Ainsi pour notre cas d'étude, il est repéré chez les deux espèces diploïdes (*Ae. comosa* et *Ae. umbellulata*) porteuses des génomes M et U respectivement.

### 2.10. Locus *Xwmc332*

Le profil électrophorétique n'est pas informatif pour l'ensemble des génotypes surtout les hybrides, où on note une faible intensité des bandes qui peut être due au problème technique que génétique. La résolution du gel d'électrophorèse après amplification avec l'absence d'information génétique pour ce locus nous oblige de le refaire puisqu'une légère bande d'environ 180 pb a été amplifiée chez le parent OZ. (Figure16).

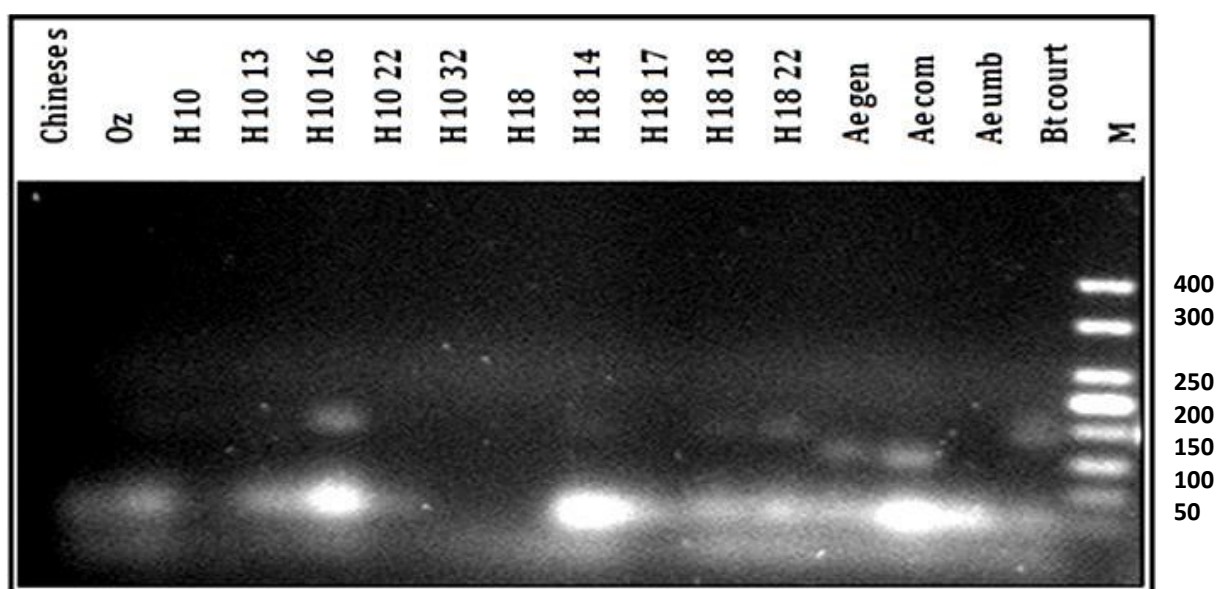


**Figure16** : Vérification de l'amplification du **Locus *Xwmc 332*** sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

Quoique ce marqueur a été amplifié chez *Chinese spring* et a donné une bande de 169 pb en utilisant le même couple d'amorces et le même programme de PCR (Somers et Isaac 2004 in : **Anonyme 2016**), ceux-ci ont indiqué que ce locus est porté par le chromosome 2B et que l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, pour ce marqueur, a permis de repérer beaucoup de loci.

### 2.11. Locus *Xwmc169*

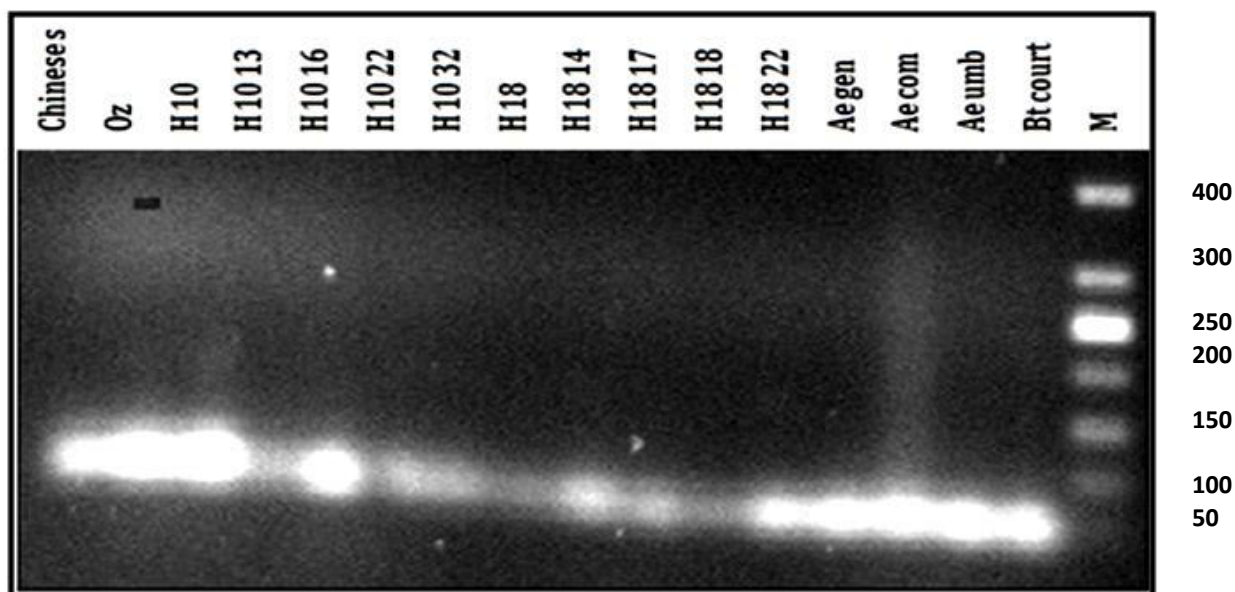
A partir de ce gel (figure 17), on ne peut pas constater grande chose, puisque la résolution de l'image n'est pas bonne. On note que le locus *Xwmc169* existe sur le bras long du chromosome du génome 3A du blé presque il est amplifié chez OZ et les hybrides H1013, H1016, H1814 et *Aegilops comosa* et son profil de migration formé par une seule bande de taille environ 80 pb par contre il n'y a pas d'amplification chez l'*Aegilops geniculata* et les autres individus.



**Figure17** : Vérification de l'amplification du **Locus *Xwmc 169*** sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

### 2.12. Locus *Xgwm493*

A partir de ce gel (figure18), on constate qu'il y a une amplification d'une seule bande de taille 130 pb chez OZ, H10, H1013, H1016. Chez les individus blé tender courtot l'*Aegilops* (*Aegilops geniculata*, *Aegilops comosa* et *Aegilops umbellulata*) une bande de taille environ 65pb.



**Figure18:** Vérification de l'amplification du Locus *Xgwm493* sur gel d'agarose de 3 % chez les 16 génotypes étudiés

Chez les autres individus aucune amplification n'est enregistrée. Ceci peut être expliqué par une erreur technique lors de la préparation des constituants de la PCR.

Ce marqueur est porté par le bras court du chromosome 3B dans la région de co-ségrégation du gène de résistance ''*fusarium head blight*'' (*FHB*) de l'épi et le marqueur *gwm 533*. Donc, il est préférable de reprendre l'amplification de ce marqueur et effectué un criblage profond de la descendance du croisement interspécifique.



*Conclusion générale*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail illustre l'intérêt de l'utilisation des marqueurs microsatellites pour le criblage d'une population de lignées recombinantes. Les microsatellites sont utilisés pour quantifier la variabilité génétique qui existe chez cette population sélectionnée en comparaison avec leurs parents et ancêtres sauvages. Les SSR utilisés dans notre étude sont tous cartographiés.

Pour conclure sur nos résultats, nous avons enregistré que les marqueurs WMS124 et WMS135 figurent sur le génome M d'*Ae. comosa*, le WMS257 est repéré chez les deux espèces diploïdes *Ae. comosa* et *Ae. umbellulata* porteuses des génomes M et U respectivement et le WMC161 qui est localisé aussi chez les *Aegilops*.

L'identification de polymorphisme des marqueurs de prédisposition aux gènes d'intérêt agronomique, tel le WMC44 avec les deux gènes de résistance aux rouilles *Lr46* et *Yr29* et le GWM493 avec le gène de résistance à la brûlure de l'épi ''*fusarium head blight*'' (*FHB*) permettent de les introduire dans le programme de sélection assistée par marqueurs.

En effet, même s'il existe des associations des gènes *Lr46* et *Yr29* avec le marqueur WMC44, l'étude de la résistance ou de la sensibilité de la variété OZ et ses descendants demande des tests au champ pour confirmer leur résistance à ces maladies, car elles sont multigéniques et que la race du *Puccinia* responsable de la rouille jaune enregistrée ici en Algérie est la *Yr27*.

En conclusion, on retiendra :

- Il est préférable de reprendre l'amplification de certains marqueurs et d'effectuer un criblage profond de la descendance du croisement interspécifique ;
- L'électrophorèse sur gel d'acrylamide, pour les marqueurs polymorphes, peut nous permettre de repérer beaucoup de loci tels les marqueurs WMC332, WMC177 et WMS 257 ;
- Certains individus sont hétérozygotes pour locus BARC174 ;

En effet, cette étude, en plus de confirmer la présence de polymorphisme pour certains loci, a permis la détection de l'existence de certains d'autre chez les espèces sauvages d'*Aegilops*.



***Références***

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abdelguerfi, A. & Laouar, M. 2000.** Les ressources génétiques des blés en Algérie. Passé, présent et avenir. Actes du premier Symposium International sur la filière de blé. Enjeux et Stratégies. Office Algérien International sur la filière de blé. Alger, Algérie. 7-9 Février. Pp 133-148.

**Andersan, A., Crasta, O., Francki, M., Bucholtz, D., Sharma, H. & Ohm, H. 1997.** Molecular and cytogenetic analysis of *Thinopyrum intermedium* translocations. *Plant Genome* 5, 90.

**Andersen, JR., Lübberstedt, T., (2003).** Functional markers in plants. *Trends Plant Sci.* (11):554-60.

**Anonyme, 2016** Graingenes database for Triticeae and Avena 2016  
<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes>

**Bandou, H., Rodriguez-Quijano, M., Carrillo, J. M., Branlard, G., Zaharieva, M. & Monneveux, P. 2009.** Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. *Plant. Syst. Evol.* 277: 85 – 97.

**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.

**Catherine Feuillet , peter langridge ,Robbie waugh 2008** cereal breeding takes a walk on wild sude trends in Gentic volé 24 page 24 32 .

**Chandler, J., Jan, C. & Bread, B. 1986.** Chromosomal differentiation among the annual *Helianthus* species. *Syst. Bot.* 11: 354-371.

**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

**David ; JI . Benavente ,E ; Délieux ;f , Du Sautoir. Jc , Mignot ,A . Molina J . 2003 .**Role des diplogametes dans les échanges de genes

**DekkersJCM., Hospital F. (2002).** The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations [Review]. *Natl. Rev. Genet.* 3 (1), p. 22–32.

**De Vienne D., (1999).** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales, Ed. INRA, 195 p

**De Vienne D., (1998).** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales, Ed. INRA, 195 p



- Eagles HA., Bariana HS., Ogonnaya FC., Rebetzke GJ., Holmby 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
- Feillet P., (2000).** Le grain de blé. Composition ET utilisation. Mieux comprendre. INRA. ISSN: 1144- 7605. ISBN: 2- 73806 0896- 8.308 p.
- Feldmann P., Feyt H., (1998).** L'amélioration des plantes et la production de matériel végétal. CIRAD.
- 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.
- Gallais A., Bannerot H., (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. Ed: INRA, Paris.768p.
- Goacolou J., Perdrizet E., (1988).** Les Biotechnologies au Service de la Production végétale. INRA.
- Gornicki, P. 2002.** Genes encoding plastid acetyl-coa carboxylase and 3- phosphoglycerate Kinase of *Triticum/Aegilops* complex and the evolution history of polyploidy wheat. Proc Natl Acad Sci USA.
- 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.
- 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.
- 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.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Hasel Korn, R. & Jauhar, P.P. & Chibbar, R.N. 1999.** Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome* **42**:570-583.
- Hammer K., (1980).** Vorarbeiten zur monographischen Darstellung von wild planzen-Sortimenten: *Aegilops* L. kulturpflanze., 28: 33-180.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Hasel Korn, R. &**

- Gornicki, P. 2002.** Genes encoding plastid acetyl-coa carboxylase and 3- phosphoglycerate Kinease of *Triticum/Aegilops* complex and the evolution history of polyploidy wheat. Proc Natl Acad Sci USA.
- Jauhar, P.P. & Chibbar, R.N. 1999.** Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome* 42:570-583.
- Lafon J.P., Tharaud Prayer C., et Levy G. (1998).** biologie des plantes cultivées, 2<sup>ème</sup> édition. Technique & documentation Lavoisier. pp : 113-134.
- Martínez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D. (2001).** Characterization of Lr46, a geneconferring partial resistance to wheatleaf 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
- Michelmore RW. (1995).** Isolation of disease resistance genes from crop plants. *Curr. Opin. Biol.* 6, p. 145–152.
- Monneveux.P.2009.**Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* Frome Algeria .plant.Syst.Evol.277 :85-97
- Monneveux P., Zaharieva M.et Rekika D. (2000).** The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. CIHEAM- options mediterraneennes, pp 72-81.
- 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
- Moulet, O. Fossati, D. Mascher, F. et Schori, A. (2008).** Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales. *Revue suisse Agric* .40 (3) :133\_138
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Schlotterer, C., (2004).** The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.* 5: 63-69.
- Sharma, C.H. 1999.** Embryo rescue following wide crosses. In: **Hall, R.D.** (eds), *Methods in molecular biology*, vol. 111. Plant cell culture protocols. Human press Inc., Totowa, NJ. Pp. 293-307
- 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.
- Sorrells, Minella. E., (1997).** Inheritance and chromosomal location of *Alp*, a gene controlling aluminum tolerance in 'Dayton' barley. *Plant Breeding* 116, 465-469
- Varshnet, Rajeev K., Graner, Andreas., et Sorrells, Mark E. (2005).** Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* Vol.23 No.1.
- 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
- 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.
- Zadri. F. (2009) :** Obtention d'hybrides F1 issus du croisement Aegilops X Blé dur (*Triticum durum* Desf) Amélioration à la tolérance à la sécheresse. Thèse de magistère. Université Constantine. p 23-24.
- Zaharieva ,M ;Dimova,A, stankova. ;P .David ,J ; Monneveux p.2003** Morphological diversity and potential interest for Wheat in improvement of three Aegilops L . species From Bulgaria. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50 : 507- 517



*Annexes*

**Annexe 1.** tableau de solution lavage1

	Concentration finale	PM(g /mol)	1litre	100ml	50ml
Acétate de Sodium	200mM	82.03	16.46g	1.6g	0.8g
H2O distillée			240ml	24ml	12ml
Dissoudre l' acétate de soduim avant d' ajouter l'éthanol					
Ethanol100 %	76%		760ml	76ml	38ml

Utilisez de l'éthanol 100 % et non pas du 96

**Annexe 2.** tableau de solution lavage2

	Concentration finale	PM(g /mol)	1litre	100ml	50ml
Acétate de Sodium	10mM	77.08	0.8g	0.08g	0.04g
H2O distillée			240ml	24ml	12ml
Dissoudre l' acétate de soduim avant d' ajouter l'éthanol					
Ethanol100 %	76 %		760ml	76ml	38ml

Utilisez de l' éthanol 100 % et non pas du 96

**Annexe 3. Préparation de gel d'Agarose 8%**

- 8g Agar
- 300 ml TBE
- 12 µl BET (Pour favoriser la révélation)

**Annexe 4 .** composition de Mix 2x

Dntp (10X)	1 ul
Tp(10X)	1ul
Mg cl (25 M)	1 .5
Taq DNA poly	0 .15
H2O	1 . 35

# Analyse de la diversité génétique de lignées interspécifiques Blé dur (*Triticum durum* Desf)/ *Aegilops geniculata* par les microsatellites (SSR)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en *Biologie et génomique végétale*.

Cette étude est basée sur l'analyse de la variabilité génétique des descendants d'autofécondation (F7) issus de croisement interspécifique entre le blé dur (*Triticum durum* Desf.) et *Aegilops geniculata* Roth. par l'utilisation des microsatellites SSR (*Simple Sequence Repeat*). Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, université des Frères Mentouri Constantine-1. Sur les douze microsatellites utilisés dans cette étude, trois microsatellites (**WMC25**, **WMC257** et **WMC488**) sont apparus polymorphes, ce polymorphisme est dû soit à une délétion d'une séquence nucléotidique au sein de loci ou d'un changement de site d'hybridation des amorces d'amplifications de ces marqueurs. Ce large spectre de polymorphisme peut être exploité pour la recherche des QTL et leurs utilisations dans la sélection assistée par marqueurs (SAM) des blés cultivés.

**Mots clés** *Triticum durum* Desf., *Aegilops geniculata*, Marqueurs moléculaires, SSR, Polymorphisme.

**Laboratoire de recherche** : Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, université Constantine 1

Jury d'évaluation :

**Président du jury** : Mr. BENBELKACEM Abdelkader . D. R. – INRA – Constantine.  
**Rapporteur** : Mr. KELLOU Kamel. M. A. A. – UFM – Constantine  
**Examineur** : Mme. HAMMOUDA Dounia . M. C. A. – UFM – Constantine.

**Date de soutenance** : 21/06/2016