

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie  
Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا  
والجزئية

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie  
**Filière :** Sciences Biologiques  
**Spécialité :** Biochimie

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

**Diversité génétique chez *Medicago truncatula* par les marqueurs Morphologiques, Biochimiques et Moléculaires.**

---

**Présenté par :** Miles Sara.  
Mebarki Rayen

**Le 26/06/2022**

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** Mme. MEDOUKALI Imane (MCB - UFM Constantine 1).  
**Examineur 1 :** M. MOKRANI El Hassen (MCB- UFMC Constantine 1).  
**Examineur 2 :** Mme. TENIOU Soumia (MAA- UFMC, Constantine 1).

**Année universitaire  
2021 - 2022**

## Remerciements

*Avant tout, nous remercions « DIEU » Le tout-puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, la patience, et la santé durant toutes ces années et que grâce à lui ce travail a pu être réalisé.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice M<sup>me</sup> MEDOUKALI I, qui nous a dirigées avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire et surtout pour sa bonne humeur, ainsi pour le temps qu'elle nous a consacré et sans elle ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche :*

*Nous exprimons toutes nos reconnaissances à M (MOKRANI El Hassen). pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire et d'évaluer notre travail. Trouvez ici l'expression de nos respectueuses gratitude et de nos remerciements pour avoir bien voulu juger ce travail.*

*Nous tenons à remercier sincèrement avec plus grande gratitude et profonds respects à Mme (TENNIOU SOUMIA). De l'honneur qu'elle nous fait d'avoir acceptée de se joindre à ce jury en tant qu'examinatrice et de nous consacrer son temps.*

*Nous désirons également exprimer nos remerciements au Professeur Mr KHLIFI D le directeur du laboratoire de génétique biochimie et biotechnologies végétales de l'université Constantine 1, vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail.*

*Une pensée particulière pour l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude et à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à l'achèvement de ce travail.*

*Nous espérons être à la hauteur de votre*

*Confiance Par Sara et Rayene.*

# *Dédicace*

*Avant tout, je remercie « DIEU » Le tout-puissant de me avoir donné le courage, la volonté, la patience, et la santé durant toutes ces années et que grâce à lui ce travail a pu être réalisé.*

## *A MON TRÈS CHÈRE PÈRE*

*Quand vous m'avez appris à sauter haut et à sauter les cerceaux, vous m'avez appris à aspirer haut dans mes rêves et à les atteindre. Sans l'inspiration, l'enthousiasme et le soutien que vous m'avez donnés, je ne serais jamais devenu la personne que je suis aujourd'hui. Merci papa*

## *A MA TRÈS CHÈRE MÈRE*

*A toi qui m'as tout donné, sans rien demander, à la seule personne au monde qui sera toujours avec moi, ma plus grande fierté et la soleil de ma vie. Pour toi qui été toujours eu les bras ouverts et ton cœur plein d'amour envers moi, je te souhaite tout le bonheur du monde. Merci de m'aider, de m'encourager et de me pousser vers le bonheur que j'ai atteint. Sans vous, rien n'aurait été possible*

*En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves mes parents.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance*

*et mon profond amour.*

*Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.*

*A mes TRÈS CHÈRE frères*

*Je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous tous. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.*

*Je t'aime plus fort*

*A mon oncle Moussa et son épouse*

*Comment puis-je vous oublier? Votre bonté est encore gravée dans ma mémoire*

*J'implore dieu qu'il vous apporte bonheur et santé, et vous protéger Ayoub et Younes*

*A ma partenaire sara*

*Je te souhaite la meilleure des chances dans votre carrière.*

*Je dédie aussi*

*Toute ma fatigue et mes efforts à moi-même et ma confiance en elle.*

*À mes buts qui accompagnaient mon souffle à chaque inspiration et expiration.*

*À mes larmes et mes sourires, à mes croire en mes capacités et mon courage.*

*Ce que c'était hier n'est qu'un rêve est devenu réalité et*

*Cette étoile pour laquelle je me bats s'est rapprochée.*





*Je dédie cet ouvrage  
Ma grande-mère et mon grand-père .*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme  
de mon cœur, ma vie et mon bonheur : ma très chère mère  
Laïla. Matib ♥ d'amour je t'aime tant ♥*

*A ma très chère sœur Fatima Zohra merci de si bien accomplir ton  
rôle... de me prêter ton épaule quand j'en ai besoin... Merci de me  
suivre et de m'encourager dans mes projets et dans mes rêves les plus  
fous... je t'aime tant ♥*

*A mes chers oncles Farouk, Fawzi et Ihsan, je tiens à vous  
remercier de votre soutien. Vous avez été la bénédiction du  
Père et la bénédiction de l'oncle. Vous m'avez soutenu à chaque  
étape de ma vie.*

*Pour toute ma famille, en particulier mes chères tantes, Souad,  
Warda, Najat, Aïda, Sumiyeh, Mariam et et mes cousines  
d'amour surtout, Arwa, Mouad, Sundus, Anas et Zakaria.*

*à mes meilleures amies Roumaïssa, Marwa , Haïfa , Chaïma,  
Rayen Je vous adore et votre amitié m'est plus précieuse que de l'or.*

*Je remercie tout particulièrement Rayuna, ma partenaire de  
mémoire, mon binôme ...sans qui rien n'aurait été pareil. ♥*

*Sara Miles ♥*





***SOMMAIRE***

**LISTE DES ABREVIATIONS.**

**LISTE DES TABLEAUX.**

**LISTE DES FIGURES.**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Généralités sur les légumineuses.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Présentation du genre <i>Medicago</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Caractères généraux.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Taxonomie et génétique.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Distribution géographique et aire de répartition du genre <i>Medicago</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. Espèce spontanées de genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....</b>	<b>10</b>
<b>3. <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Présentation de <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Caractéristique de <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Cycles de vie de <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4. Description botanique.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5. Position systématique.....</b>	<b>13</b>
<b>3.6. Aire de répartition de l'espèce <i>Medicago Truncatula</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>3.7. <i>Medicago truncatula</i> comme plante modèle.....</b>	<b>14</b>
<b>3.8. Intérêt biologique.....</b>	<b>14</b>
<b>3.9. Intérêt agronomique.....</b>	<b>15</b>
<b>3.10. Intérêt génétique.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Définition de La diversité génétique.....</b>	<b>15</b>
<b>5. Les Marqueurs génétiques.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Marqueur Moléculaire.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2. Marquer biochimique.....</b>	<b>16</b>
<b>5.3. Marquer Morphologique.....</b>	<b>17</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>19</b>

**PARTIE2 : DIVERSITE GENETIQUE DE MEDICAGO TRUNCATULA**

**Chpitre.1. Genetic diversity in *Medicago truncatula* by morphological, molecular and biochemical marks**

<b>Introduction.....</b>	<b>24</b>
<b>Material and Methods.....</b>	<b>25</b>
<b>Results .....</b>	<b>29</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>42</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>45</b>

<b>Références .....</b>	<b>46</b>
<b>Synthèse et conclusion générale.....</b>	<b>50</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACP</b>	Analyse en Composante Principale.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>AFLP</b>	Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés.
<b>CNV</b>	Variabilité du nombre de copies.
<b>EST</b>	Estérases.
<b>GOT</b>	Glutamate Oxaloacétate Transaminase.
<b>HH</b>	Hyper-Humide.
<b>PCR</b>	Polymérase Chain Réaction.
<b>Pm</b>	La pluviométrie moyenne.
<b>RAPD</b>	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe.
<b>RFLP</b>	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction.
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SH</b>	Subhumide.
<b>SNP</b>	Polymorphisme nucléotidique.
<b>SS</b>	Semi Sec.
<b>SSCP</b>	Polymorphisme de conformation des simples brins.
<b>SSLP</b>	Polymorphisme de longueur de séquence simple.
<b>SSR</b>	Séquence Simple répétées ou polymorphisme de microsatellite.
<b>TCA</b>	Trichloracétique Acide.
<b>TM</b>	La température maximale.
<b>Tm</b>	Moyenne de la température minimale du mois le plus froid.
<b>VNTR</b>	Séquence répétée.
<b>WP</b>	Largeur des gousses.

## LISTE DES TABLEAUX

### PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Tableau 1 :</b>	Composition des réserves de quelques graines d' <i>espèces</i> cultivées.....	<b>6</b>
<b>Tableau 2 :</b>	<i>Espèce</i> spontanées de <i>genre Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	<b>11</b>

### PARTIE 2: DIVERSITE GENETIQUE DE *MEDICAGO TRUNCATULA*

<b>Table1.</b>	Geographical origins of the 29 accessions studied, with the corresponding eco-geographical parameters.....	<b>26</b>
<b>Table2.</b>	Sequences and link group of five microsatellite primers tests Primer Linkage.....	<b>28</b>
<b>Table3.</b>	Mean, standard deviation and coefficient of variation of the 12 traits analyzed for the 28 accessions of <i>M.truncatula</i> .....	<b>31</b>
<b>Table4.</b>	Correlation matrix between the 12 morphological characteristics analyzed.....	<b>31</b>
<b>Table5.</b>	Matrix presence/absence, mobilities and frequencies of albumins of the 29 accessions of <i>M. truncatula</i> .....	<b>34</b>
<b>Table6.</b>	Total number of amplified bands and polymorphism in the 25 accessions for each SSR marker.....	<b>41</b>

## LISTE DES FIGURES

### **PARTIE 1            REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>Figure 1:</b>	Collection des légumineuses Bilan et perspective pour les Légumineuses.....	3
<b>Figure 2:</b>	Phylogénie des Légumineuses Les Légumineuses sont groupées en trois grandes sous-familles : les <i>Mimosoïdées</i> , les <i>Caesalpinoïdées</i> et les <i>Papilionoïdées</i> , comprenant de nombreuses espèces cultivées. D'après.....	5
<b>Figure 3:</b>	Classification des légumineuses de la famille des <i>Papilionoidea</i> .....	6
<b>Figure 4:</b>	<i>Medicago sativa</i> .....	7
<b>Figure 5:</b>	<i>Medicago ciliaris</i> .....	7
<b>Figure 6:</b>	<i>Medicago granadensis</i> .....	7
<b>Figure 7:</b>	Feuilles de différents écotypes du <i>genre Medicago</i> .....	8
<b>Figure 8:</b>	Taxonomie du <i>genre Medicago</i> .....	9
<b>Figure 9:</b>	Origine géographique des <i>Medicago</i> .....	10
<b>Figure10:</b>	Distribution géographique du <i>genre Medicago</i> dans le monde.....	10
<b>Figure11 :</b>	Représente la plante <i>Medicago truncatula</i> .....	11
<b>Figure12 :</b>	Caractéristiques morphologiques des feuilles, fleurs, gousses et graines de <i>Medicago truncatula</i> .....	12
<b>Figure13 :</b>	Cycle de vie de la plante model <i>M. truncatula</i> : A : stade plante, B : stade feuille, C : stade fleur, D : stade gousse, E : stade graine.....	12

### **PARTIE2: DIVERSITE GENETIQUE DE MEDICAGO TRUNCATULA.**

<b>Fig.1.</b>	Geographic locations of the 29 accessions of <i>M. truncatula</i> in the north Algerian.....	4
<b>Fig.2.</b>	Principal component analysis of twelve morphological characteristics (a) and their Relationship with ecological parameters (b).....	9
<b>Fig.3.</b>	UPGMA dendrogram based on morphological characteristics of 25 accessions of <i>M. truncatula</i> .....	11

<b>Fig.4.</b>	Zymograms of the enzymatic system EST (1) and GOT (2) for the 29 accessions of the species <i>M. truncatula</i> with its phenotype: a) for EST, b) for GOT.....	<b>12</b>
<b>Fig.5.</b>	Hierarchical classification in UPGMA of the 29 accessions of <i>M. truncatula</i> based on enzyme polymorphism (Got-Est): 1) the first group, 2) the second group, 3) the third group.....	<b>14</b>
<b>Fig.6.</b>	Albumin electrophoretic profiles obtained by SDS/PAGE in 29 accessions of <i>M.truncatula</i> : a) Mt1 to Mt15, b) Mt16 to Mt29, (T)=Control.....	<b>15</b>
<b>Fig.7.</b>	Dendrogram based on UPGMA clustering of albumin data showing relatedness among the studied accesse of <i>Medicago truncatula</i> .....	<b>16</b>
<b>Fig.8.</b>	Globulin electrophoretic profiles obtained by SDS/PAGE in the denaturing conditions reductive name in 29 accessions of <i>M. truncatula</i> : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)=Control.....	<b>17</b>
<b>Fig.9.</b>	UPGMA hierarchical classification of the 29 accessions of <i>M. truncatula</i> based on globulin polymorphism: 1) the first group, 2) the second group,3) the third group, 4) thefourth group, 5) the fifth group, 6) the sixth group.....	<b>18</b>
<b>Fig.10.</b>	Electrophoretic profiles of <i>M.truncatula</i> SSR bands revealed by AFctt1 primer (a) and AFctt32 primer (b) .....	<b>19</b>
<b>Fig.11.</b>	Hierarchical UPGMA classification of 25 accessions of <i>M. truncatula</i> based on SSR polymorphism.....	<b>21</b>





# ***INTRODUCTION***

En raison du vaste territoire de l'Algérie, estimé à environ 2 741 2381 kilomètres carrés, et de sa situation surplombant la mer Méditerranée, tout cela lui confère de multiples zones climatiques et une riche diversité végétale. Il est connu pour ses conditions naturelles riches et variées, son relief, sa géologie, ses sols et son climat se traduisent finalement par une énorme biodiversité. Elle définit des biomes distincts, permettant à de nombreuses espèces végétales de coexister, et animaux, souvent adaptés aux conditions abiotiques extrêmes et aux hautes pressions la biologie. Le nombre d'espèces végétales en Algérie est de 3 139, réparties en 5 402 taxons (**Quézel P., Santa S., 1962**).

Les légumineuses sont l'une des plus grandes espèces végétales pour lesquelles l'Algérie est célèbre. Ce sont des plantes à fleurs contiennent plus de 20 000 *espèces*. La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae*, et *Papilionoideae* (**Doyle J.J., et Luckow M.A., 2003**). Il y en a beaucoup que nous consommons habituellement dans notre alimentation, tels que (haricots, pois, arachides, lentilles et fève ...) et d'autre utilisés pour l'alimentation animal (soja, luzerne...), en plus de leur importance nutritionnelle. Ils jouent aussi des rôles, industriels, économiques, écologiques et agronomiques, là où c'est une source essentielle des protéines, vitamines, fibres et nitrogène..... etc., ce qui en a fait l'un des paris pour les agriculteurs.

Malgré la diversité, les avantages et l'importance, il y a un problème de longue date est que la plupart des légumineuses sont difficiles à considérer en raison de leurs grands génomes (**Barker DG., et al., 1990 ; Handberg k., et Stougaard J., 1992**). Ceci devrait être mentionné en particulier dans notre étude de la plante *Medicago truncatula*. C'est une espèce méditerranéenne, efflorescente, de taille intermédiaire. Utilisée comme aliment pour les bétails depuis des centaines d'années pour sa richesse supérieure en nutriments importants par rapport à d'autres sources d'alimentation. Elle a également été utilisée comme herbe médicinale pour l'homme afin que ses graines ou les feuilles séchées soient prises en complément. Elle se caractérise par sa capacité à résister à la sécheresse, à la chaleur et au froid, ainsi qu'à fertiliser le sol et à stabiliser l'azote dans l'atmosphère, et elle produit des gousses et des graines en abondance (**May DG., R.A., et Dixon 2004**).

Toutes ces caractéristiques nous ont incités à étudier de manière plus réaliste cette plante, qui suscite un grand intérêt de la part des scientifiques, car de nombreuses expérimentations ont été menées sur elle dans les plus grands laboratoires internationaux afin d'étudier sa structure génétique, et plus particulièrement sa diversité génétique. Ils la considéraient comme une plante modèle et parmi les légumineuses les mieux caractérisées génétiquement. En raison de sa texture simple qui facilite la manipulation.

Notre étude orientée vers l'analyse de la diversité génétique chez 29 accessions appartenant à l'espèce *M. truncatula* collectées dans différentes régions en Algérie, par l'utilisation des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires.

Ce travail est divisé en deux parties. A partir d'une revue bibliographique, la première partie consiste à présenter des légumineuses, leurs intérêts et leur situation en Algérie, ainsi que le genre *Medicago* et plus précisément l'espèce *M. truncatula*. Ensuite, un aperçu sur la diversité génétique, son intérêt et sa recherche à travers des marqueurs génétiques et morphologiques sont présentés.

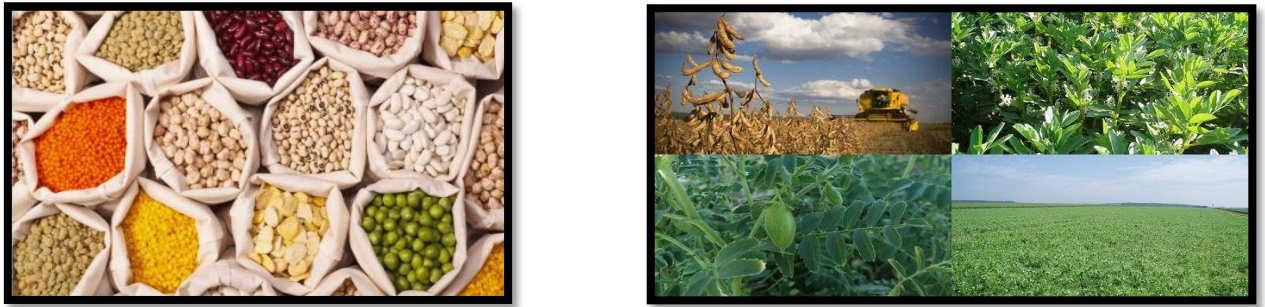
La deuxième partie est consacrée à l'étude de la diversité génétique de *M. truncatula* par les marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires. Les résultats sont structurés dans un seul chapitre complémentaire présenté sous forme d'article scientifique.

Enfin, les résultats les plus pertinents de ce travail sont contenus dans une synthèse et une conclusion générale.

*Première Partie*

***REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

## 1. Généralité sur les légumineuses



**Figure 1 :** Collection des légumineuses Bilan et perspective pour les légumineuses.

Les légumineuses (*Fabaceae*) figurent parmi les espèces végétales les plus importantes au monde, se classant au troisième rang après les Arachidées et les astéracées. Ce sont des plantes à fleurs. Leurs graines se distinguent par la possibilité de les séparer en deux parties, elles contiennent plus de 20 000 espèces différentes les unes des autres, qui les classe en deux types : les légumineuses fourragères tels que (soja, luzerne...) et légumineuse pour la consommation humaine (haricots, pois, arachides, lentilles et fève...).

Ils peuvent être inclus dans trois groupes :

- les légumes secs (lentilles, pois secs, pois chiches, haricots).
- les oléagineux (arachide, soja).
- les légumes à gousses (les petits pois et les haricots vert).

Les Fabacées sont divisées en trois sous-familles : les *Mimosoideae*, les *Caesalpinoideae* et les *Papilionoïdées* :

- La sous-famille des *caesalpinoideae*, comprenant environ 150 genres, rassemblant principalement des arbres ou des arbustes retrouvés en région tropicale et subtropicale.
- La sous-famille des *Mimosoideae* rassemble surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales. Cette sous-famille possède plus d'une soixantaine de genres.

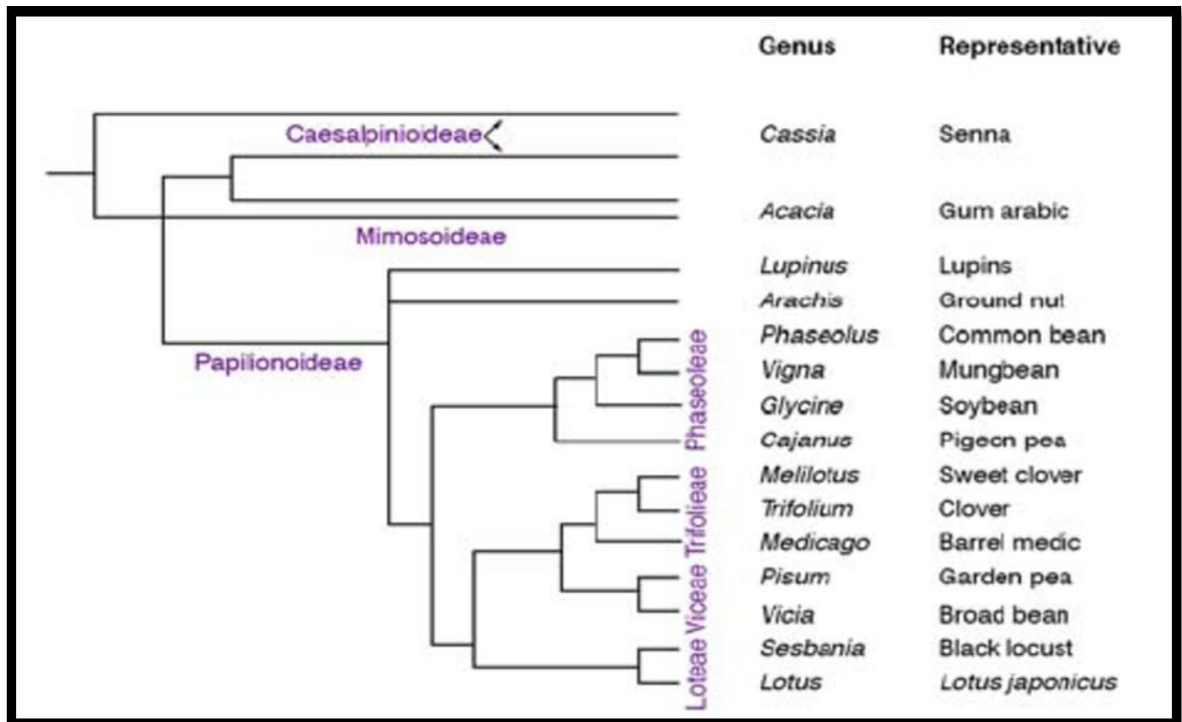
- Enfin, les *Papilionoïdées* représentent la sous-famille la plus diverse avec environ 430 genres. **(Dekak A., 2010).**

La sous famille des *Papilionoideae* (cette dernier) regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement: le soja (*Glycine max*,  $2n = 4x = 40$ ), le haricot (*Phaseolus vulgaris*,  $2n = 2x = 22$ ), le pois (*Pisum sativum*,  $2n = 2x = 14$ ), la luzerne (*Medicago sativa*,  $2n = 4x = 32$ ), l'arachide (*Arachis hypogaea*,  $2n = 4x = 40$ ), le pois chiche (*Cicer arietinum*,  $2n = 2x = 16$ ), et la fève (*Vicia faba*,  $2n = 2x = 16$ ). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés *Galegoïdes* et *Phaseoloïdes* (Figure 3), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des *Aeschynomeneae* **(Broughton WJ., et al., 2003).**

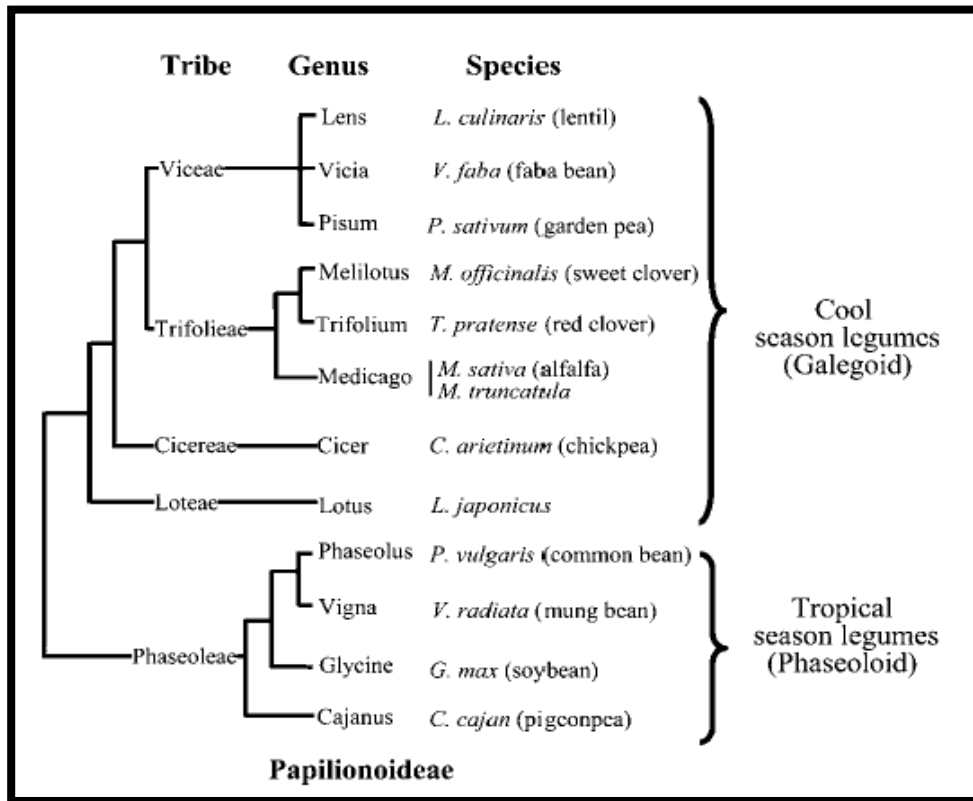
En effet les légumineuses jouent des rôles très importants dans différents domaines (alimentaires, industrielles, économique, écologique et agronomique) :

- Les légumineuses améliorent les pratiques agricoles et aident à maintenir la fertilité des sols en accumulant de fortes concentrations d'azote dans leurs tissus **(Simon JP., 2005).**
- Ils constituent une importance alimentaire pour les humains et les animaux, là où c'est une source essentielle en une variété de nutriments de base. (Protéines, vitamines, glucides et des fibres, éléments minéraux, zinc, magnésium et la matière grasse...) Cette intégration et la diversité alimentaire ça le fait compenser pour les produits laitiers et les viandes dans des zones que vous n'avez pas à produire.
- Industriellement, les légumineuses représentent une source très importante de matière première : pour la production de dérivés alimentaires tels que les huiles, les farines et les conserves... et pour la production des produits cosmétiques et pharmaceutiques **(Lee G., et al., 2007).**
- Les légumineuses sont importantes à la fois sur le plan écologique et agricole car elles sont responsables d'une partie du flux global d'azote provenant de l'azote atmosphérique  $N_2$  vers des formes telles que l'ammoniac, le nitrate et azote organique **(Sobti S., et al., 2015).**
- Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques **(Raven PH., et al., 2000).**

- Les légumineuses alimentaires occupent une partie très importante des recherches scientifiques.
- Accomplis dans des domaines aussi divers que la phytotechnie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie, la physiologie, la nutrition et la sélection variétale (**Baudoin JP., 2001**).
- Toutes ces caractéristiques en font un des piliers de l'économie mondiale.



**Figure 2 :** Phylogénie des Légumineuses groupées en trois grandes sous-familles : les *Mimosoïdées*, les *Caesalpinioïdées* et les *Papilionoïdées*, comprenant de nombreuses espèces cultivées. **D'après Udvardi et al. (2005).**



**Figure 3 :** Classification des légumineuses de la famille des *Papilionoideae* (Zhu et al. 2005).

**Tableau 1 :** Composition des réserves de quelques graines d'espèces cultivées D'après Bewley et Black (1994).

Céréales (amidon)	Composition moyenne en %		
	Protéines	Huiles	Carbohydrates
Orge	12	3	76
Maïs	10	5	80
Avoine	13	8	66
Séigle	12	2	76
Blé	12	2	75
<b>Légumineuses</b>			
Haricot	23	1	56
Petit pois	25	6	52
Arachide	31	48	12
Soja	37	17	26



## 2. Présentation du genre *Medicago*

### 2.1. Caractères généraux



**Figure 4:**

*Medicago sativa* L(1753)  
Willd.



**Figure 5:**

*Medicago ciliaris* (L.) All (1785).



**Figure 6:**

*Medicago granadensis*  
Willd Willd.

Les espèces du genre *Medicago* sont efflorescente contenant des gousses et des graines, ont de fortes racines Pivotantes pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur, ses tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentés au sommet et présente des inflorescences en grappe, les stipules sont Larges de forme allongée ou cordiforme. Les fleurs dont la couleur varie du mauve au jaune sont portées sur un long racème qui contient jusqu'à 20 fleurs (**Lapeyronie A., 1982 ; Mathieu M., 2003**). Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille, soit spiralée (de 1 à 4 spires) parfois épineuse. La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 10 mm (**Mathieu M., 2003 ; Hireche Y., 2006**) . Cependant plusieurs études intéressées essentiellement à la morphologie de leurs feuilles et les gousses, les luzernes caractérisées par une fécondation strictement autogame chez les espèces annuelles et allogame chez les espèces pérennes.

### 2.2. Taxonomie et génétique

Le genre *Midicago* ou comme s'appelait avant « *Midica* » ou « herbes de *médic* », c'est parmi les espèces légumineuses. Appartenant à la famille des *Fabaceae* et sous-famille des *Papilionoideae* et fait partie de la tribu des *Trifolieae* elle est très proche des genres *Melilotus* et *Trigonella* (**Lesins KA and Lesins I., 1979**).

C'est parmi les types des légumineuses qui sont souvent cultivés comme fourrage de bétail, tels que *M. sativa* L (luzerne) et *M truncatula* (La luzerne tronquée)

Le genre *Medicago* comprend plus de 80 espèces divisées en quatre sous-genres selon la morphologie des gousses et des graines : *Orbicularia*, *Medicago*, *Lupularia* et *Spirocarpos* et qui sont constitués de 12 sections et 8 sous sections, présentant 56 espèces : annuelles, bisannuelles et vivaces. La plupart des annuelles sont diploïdes autogames avec  $(2n=16)$  ou  $(2n=14)$  par contre les pérennes sont strictement allogames tétraploïdes  $(2n=4X=32)$  et hexaploïdes  $(2n=6X=48)$  avec le nombre chromosomique de base  $X=7$  et  $X=8$ .

*Position systématique, selon (Small et Jompe, 1989)*

Règne : *Plantae*.

Embranchement *Spermatophytes*.

Sous-embranchement : *Angiospermes*.

Classe : *Dicotylédones*.

sous-classe : *Rosidées*.

Ordre : *Fabales*.

Famille : *Fabaceae*.

sous-famille : *Faboideae*.

Tribus : *Trifolieae*.

Genre: *Medicago*.



**Figure 7** : Feuilles de différents écotypes du genre *Medicago* (Delalande et al. 2007).

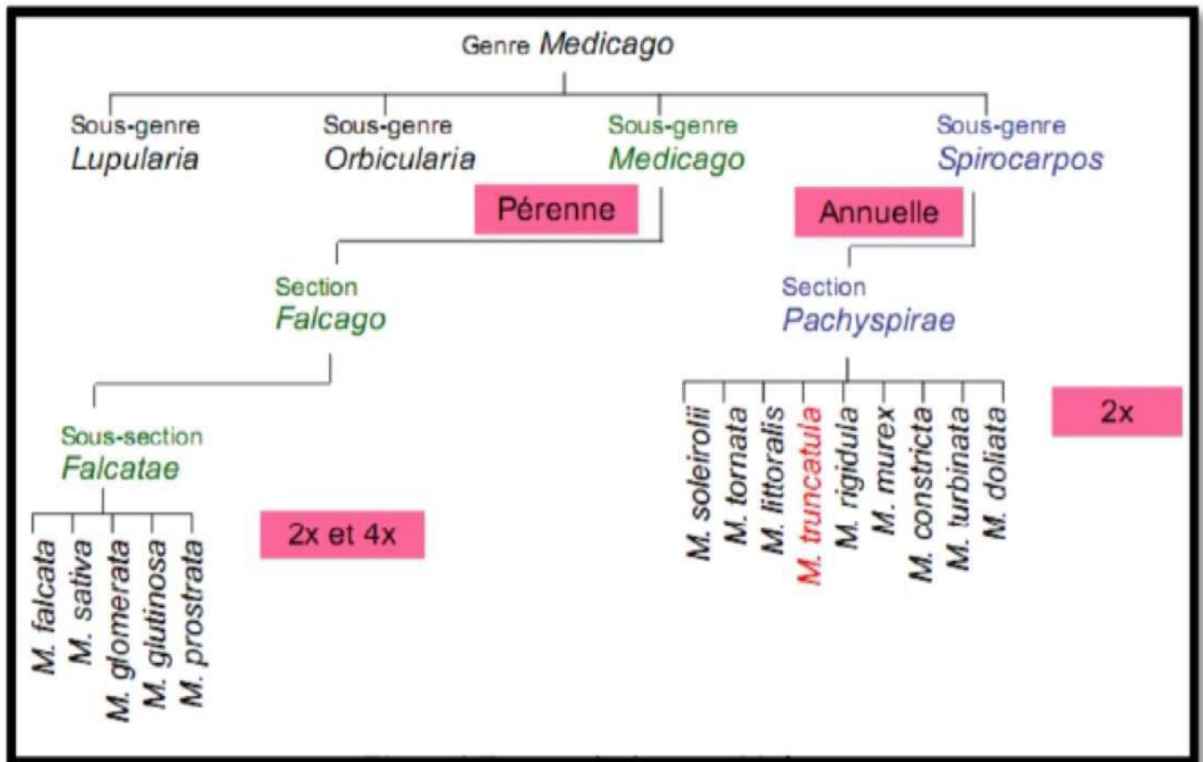
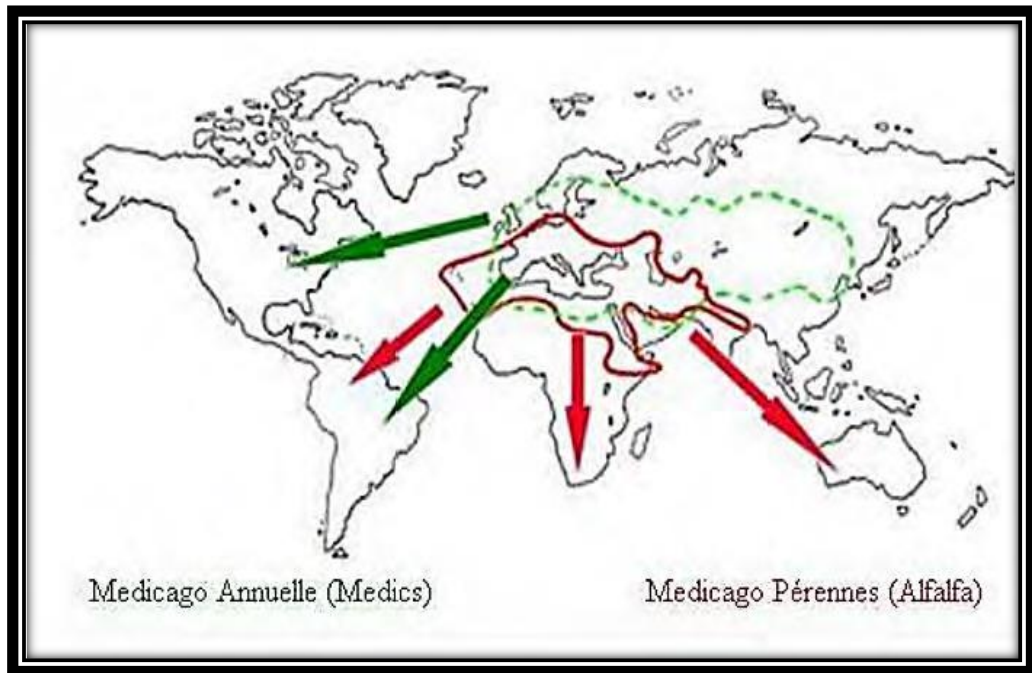


Figure 8: Taxonomie du genre *Medicago*. Tiré de Pierre (2008).

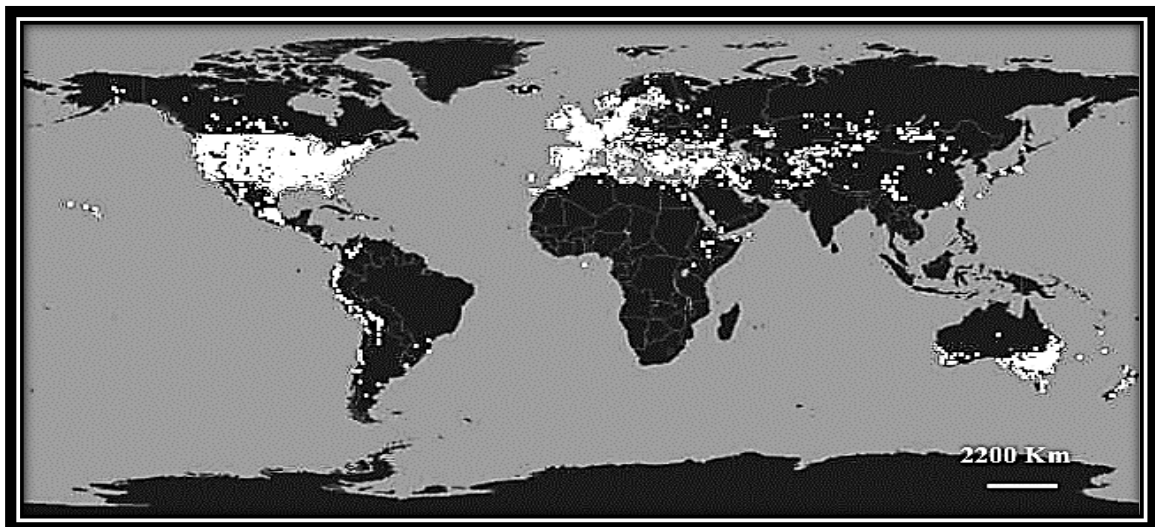
### 2.3. Distribution géographique et aire de répartition du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* a conquis tous le bassin méditerranéen et ces environs steppiques (Delalande M., et al., 2007) au cours de XIX siècle et à l'ouest de l'Asie et aussi les continents l'Amérique et l'Australie , (Prosperi JM., et al., 1995) signalent les aires d'origine de toutes les espèces du genre comme étant « le croissant fertile » recouvrant les pays ou régions actuelles de Turquie, d'Iran, d'Irak, du Sud du Caucase et du pourtour méditerranéen et selon (Lapeyronie A., (1982), les Luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides .

Cependant Les espèces de *Medicago* annuelles localisées essentiellement dans les régions qui ont un climat de bassin méditerranéen. *Medicago* pérennes leur croissance et fertile Sur la côte méditerranéenne, jusqu'au centre et l'Ouest asiatique.



**Figure 9 :** Origine géographique des *Medicago* (Delalande et al 2007).



**Figure10 :** Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde (Prolea 2002).

#### **2.4. Espèces spontanées du genre *Medicago* rencontrées en Algérie**

Parmi les espèces du genre *Medicago* qui sont distribuées en Afrique, environ 16 poussent spontanément dans le nord de l'Algérie. Sont représentés dans le tableau suivant (Hireche, 2006).

**Tableau 2** : Espèce spontanées de genre *Medicago* rencontrées en Algérie.

Espèces	Caractéristique et air de répartition en Algérie
<i>M. sativa</i>	Plante vivace rencontré un peu partout
<i>M. falcata</i>	Plante vivace très résistante au froid
<i>M. lupulina</i>	Dite lupuline ou minette : plante annuelle ou bisannuelle
<i>M. scundiflora</i>	Plante annuelle ou bisannuelle
<i>M. marina</i>	Plante vivace, elle pousse sur les sables maritimes
<i>M. scutellata</i>	Dite luzerne a écusson : plante annuelle, se rencontre sur les sols argileux du tell
<i>M. orbicularis</i>	Plante annuelle du pâturage de tell
<i>M. echuris</i>	plante annuelle, elle est assez commune dans les pâturages du Tell (constantinois)
<i>M. ciliaris</i>	rencontrée surtout dans les pâturages et les prairies du Tell à sol semi salin
<i>M. truncatula</i>	plante annuelle très commune dans le Tell
<i>M. littoralis</i>	plante annuelle, elle abonde sur les dunes du littoral et de l'intérieur. Elles constituent des pâturages de bonne qualité.
<i>M. murex</i>	plante annuelle commune dans tout le territoire algérien
<i>M. minima</i>	plante annuelle, elle est souvent rencontrée sur les sols pauvres
<i>M. arabica</i>	plante annuelle
<i>M. lanciniata</i>	Plante annuelle.
<i>M. hispida</i>	plante annuelle

### 3. *Medicago truncatula*



**Figure 11** : Représente la plante *Medicago truncatula* (<https://quelle-est-cette-fleur.com/index.php>)

#### 3.1. Présentation de *Medicago trnncatula*

La luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) est une espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes. Elle appartient à la famille botanique des Fabacées, plus



couramment nommées Légumineuses ou *Papilionacées*. (DoyleJJ., and Luckow MA., 2003).

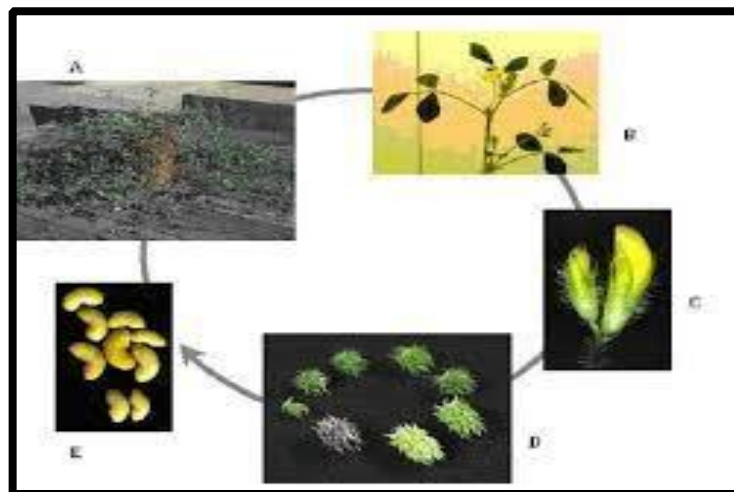
### 3.2. Caractéristique de *Medicago truncatula*

*M. truncatula* a de nombreuses propriétés qui lui donnent un avantage spécial. C'est multi-usage, en particulier analytique génétique et moléculaire e (autogamie, faible niveau de ploïdie, génome de petite taille, aptitude à la Culture en laboratoire, à l'embryogenèse somatique et à la transgènèse).



**Figure 12:** Caractéristiques morphologiques des feuilles, fleurs, gousses et graines de *Medicag truncatula*. (Source:<https://legumeinfo.org/organism/Medicago/truncatula>)

### 3.3. Cycles de vie de *Medicago truncatula*



**Figure 13 :** Cycle de vie de la plante model *M. truncatula* : A : stade plante, B : stade feuille, C : stade fleur, D : stade gousse, E : stade graine (Bakhti A., 2011).

### 3.4. Description botanique

*Medicago truncatula* est une espèce diploïde ( $2n=16$ ) et autogame. Son génome est de petite taille il est estimées à 500-550 (Mpb) c.à.d. 3 à 4 fois supérieur à celui d'*Arabidopsis thaliana*, équivalent à celle de riz et est environ dix fois inférieur à celui de pois (Denarie J et Gamas P., 2001. Young ND *et al*, 2003) puisque elle présente un fort degré de synthèses avec d'autres légumineuses (Choi HK *et al.*, 2004. Kalo P *et al*, 2000. Yan HH *et al*, 2003. Cannon SB *et al.*, 2003). *M. truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois (Lesins KA et Lesins I., 1979). C'est une plante annuelle herbacée, ramifiée au port souvent rampant de 15 à 80cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées (Lesins KA et Lesins I., 1979), l'inflorescence porte 1 à 5 petites fleurs jaunes donnant après autofécondation des gousses cylindriques très dures, en forme de vrilles renferment de 3 à 12 graines. Le poids de 1000 graines oscille entre 3.3 à 6 g (prosperi JM *et al.*, 1996). Leur propriété c'est que la durée de vie de ces graines est supérieure à 40 ans et facilement élevée. Elle a un cycle de vie très court de 2 à 3 mois.

### 3.5. Position systématique

Règne : <i>plantae</i>
Division : <i>Magnoliophyta</i>
Classe : <i>Magnoliopsida</i>
Ordre : <i>Fabales</i>
Famille : <i>Fabaceae</i>
Sous-famille : <i>papilionoideae</i>
Tribu : <i>Trifolieae</i>
Genre: <i>Medicago</i>

### 3.6. Aire de répartition de l'espèce *Medicago Truncatula*

La propagation des légumineuses dans le monde est souvent basée sur leur environnement en matière de climat, de sol... etc. Bien que les haricots soient une espèce qui aime les zones chaudes, *M. truncatula* est l'une des espèces les plus

indigènes le long de la Méditerranée et en Algérie en particulier. Donc cette espèce est localisée principalement dans les régions chaudes et de basse altitude méditerranéennes, elle est considérée comme une espèce assez sensible au froid et aux parasites foliaires. Elle est considérée comme une plante modèle (à un moindre degré que *M. sativa*) essentiellement lors des études sur la symbiose plante-rhizobium (Prosperi JM., 1995).

### 3.7. *Medicago truncatula* comme plante modèle

*M. truncatula* est largement utilisé comme une plante légumineuse modèle pour comprendre la tolérance aux stress abiotiques (Young ND et Udvardi M., 2009). Ainsi, la longueur de la racine et de la tige fournissent des indications importantes de la réponse de la plante au stress salin (Jamil M et Rha ES., 2004). La compréhension de la relation entre le développement des jeunes plants, les conditions environnementales et la qualité des graines au niveau physiologique et agronomique sont des objectifs fondamentaux de la science des semences (Bláha L et Pazderů K., 2013). Au contraire de la majorité des légumineuses, *M. truncatula* est bien accessible aux outils moléculaires et aux analyses génétiques. Cette espèce est une plante modèle précieuse et utile dans le domaine de la recherche sur les légumineuses avec de nombreuses études génétiques et génomiques publiées dans tous les domaines de la biologie végétale (pour revue Kang et al., 2016). Le génome de *M. truncatula* a été séquencé pour la première fois en 2011 (Young ND et al., 2011) et est toujours en cours de développement avec une cinquième version récente (Pecrix Y et al., 2018). Mutant populations de *M. truncatula* ont été développées par différentes approches à appliquer dans domaines de recherche biologique, y compris la biologie des semences, la fixation symbiotique de l'azote et le stress abiotique réponses (Kang Y et al., 2016).

### 3.8. Intérêt biologique

*Medicago* est défini comme un type parfait de toutes les légumineuses étudiées en raison de leurs propriétés, y compris la fixation de l'azote atmosphérique. C'est ce qui l'a rendue biologiquement importante. Ce sont des produits extraordinaires à croissance rapide qui peuvent produire 500 à 1000 graines. Il s'agit également d'une espèce facile à propager et en évolution, connue sous le nom d'espèce ayant un environnement



diversifié. Ils peuvent être trouvés dans des zones chaudes ou humides avec un sol lourd ou de la boue, selon leur environnement.

Récemment, l'intérêt fut focalisé sur *M.truncatula* comme système pour examiner la grande richesse de production de métabolites secondaires par les légumineuses (Gepts P et al., 2005) et la résistance aux maladies (Frugoli J et Harris J., 2001). Cette plante est aussi largement étudiée pour analyser le déterminisme des symbioses endo-mycorhiziennes lui permettant de prélever le phosphore du sol (Journet EP et al., 2001).

### 3.9. Intérêt agronomique

Venant à l'origine du pourtour méditerranéen, *M. truncatula* est présente sur des sols lourds, marneux ou argileux et est adaptée aux conditions semi-arides (Lazrek ben- Friha F., 2008). Cette espèce a accordé une attention considérable aux agriculteurs parce qu'elle est abondante en production, ainsi qu'un rôle dans la réduction de l'utilisation excessive d'engrais, et donc la présence d'azote est essentielle dans les zones sèches. Ils sont distinctifs car ils peuvent pousser naturellement et périodiquement (ou annuellement), ce qui aide à empêcher le sol de dériver.

### 3.10. Intérêt génétique

Pour des aspects multiples de la génétique et de la génomique, *M. truncatula* a été choisie comme plante modèle grâce à son petit génome d'environ 500 Mb -soit environ 4 fois celui d'*Arabidopsis* (Castilho A et al., 2005) réparti sur 8 chromosomes, sa diploïdie ( $2n = 16$ ) et son caractère autogame avec un temps de génération court. *M. truncatula* forme de petites graines permettant leur culture dans des tubes à essais. Le partenaire bactérien de cette plante modèle est le plus étudié parmi les bactéries *rhizobiales* et le séquençage du génome de la souche de référence de *S. meliloti* 1021 a été achevé (Capela D et al., 2001). Elle est facilement transformée par *Agrobacterium rhizogenes* et *A. tumefaciens* (Boisson D et al., 2001).

## 4. Définition de La diversité génétique

La biodiversité a été remarquée dès l'Antiquité. Lorsqu'on observe le monde vivant, on constate que les êtres sont différents les uns des autres (Gouyon PH., 1994). La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de

la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (**Parizeau ME., 1997**). C'est la diversité intraspécifique (polymorphisme génétique) qui représente le potentiel et la capacité à répondre aux changements environnementaux, à la fois sur le court terme (faculté d'adaptation) et sur le long terme (potentiel d'évolution). La richesse des espèces est la mesure d'évaluation de la biodiversité la plus largement utilisée (**Lewin B., 1992**).

Dans l'agriculture, la diversité génétique est exploitée pour créer des variétés adaptées à différents environnements et conditions de croissance. L'aptitude de telle ou telle variété à résister à la sécheresse ou à l'inondation, à se développer sur un terrain pauvre ou riche, à résister à de nombreuses espèces d'insectes ravageurs ou maladies, à fournir des produits riches en protéines ou ayant de meilleures qualités gustatives, est un caractère transmis par les gènes. Ces ressources génétiques sont la matière première qu'emploient les sélectionneurs de plantes et les spécialistes de la biotechnologie pour produire de nouvelles variétés. Sans cette diversité, nous ne pourrions plus adapter les cultures à l'évolution constante des besoins et des conditions. (**Cronk QC., 2001**).

D'une manière général, la variabilité génétique peut être définie par différents critères sur l'information : morphologique, moléculaire et biochimique. . etc.

## **5. Marqueurs génétiques**

Un marqueur génétique est un marqueur polymorphe qui peut informer le génotype d'un (de) locus voisin(s), le génotype de l'individu qui le porte (en génétique des populations). Les plus courants de ces marqueurs génétiques sont :

- les marqueurs morphologiques.
- les marqueurs moléculaires (au niveau de l'ADN).
- marqueur biochimique+ protéique.

### **5.1. Marqueur Moléculaire**

C'est un type de marqueur génétique qui permettent de détecter un polymorphisme dans la séquence nucléique d'ADN entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même individus sont donc des indicateurs neutres de variabilité

génétique et grâce aux ces marqueurs moléculaire il devient possible de mettre en évidence et suivre le gène d'intérêt.

Les marqueurs moléculaires ont un développement stable, ils sont détectables dans tous les tissus et à tous les stades de développement, ils ne sont pas influencés pas les conditions environnementales (**Santoni S et al., 2000**).

Pour un marqueur moléculaire polymorphe de bonne qualité il devrait être :

- Transmis de façon codominance
- Facile à obtenir.
- Reproductible.
- Dispersés le long du génome.

En effet il existe plusieurs types de technique de marqueurs moléculaires :

- ✓ RFLP : Polymorphisme de longueur de fragments de restriction.
- ✓ AFLP : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés.
- ✓ SSLP : Simple séquence length polymorphisme.
- ✓ RAPD : Amplification aléatoire d'ADN polymorphe.
- ✓ SNP : Polymorphisme nucléotidique.
- ✓ SSCP : Polymorphisme de conformation des simples brins.
- ✓ EST : Marqueur de séquence exprimé.
- ✓ CNV : Variabilité du nombre de copies.
- ✓ VNTR : Séquence répétée.
- ✓ SSR : séquence Simple répétées ou polymorphisme de microsatellite.

Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et SSR.

## 5.2. Marquer biochimique

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs à avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (**Harry M., 2001**) et Il est important pour le sélectionneur de connaître l'aspect purement génétique du caractère étudié, indépendamment de son expression. A cet effet, de nombreux marqueurs biochimiques ou moléculaires ont été développés depuis une vingtaine d'années. Les marqueurs biochimiques, généralement des isozymes ou des protéines de réserve, ont un pouvoir

de discrimination plus élevé que les marqueurs morphologiques, traduisent directement l'activité des gènes, sont neutres et peuvent être révélés dans plusieurs organes à différents stades de développement. Ils sont mis en évidence par électrophorèse, sur la base des propriétés de migration des protéines, et révélés par une simple coloration pour les protéines ou par une coloration histochimique spécifique pour les enzymes. Les protéines ont l'avantage d'être plus nombreuses que les marqueurs morphologiques, mais dépendent également de l'organe considéré (**Mebarek I., 2010**).

### **5.3. Marquer Morphologique**

C'est un révélateur basée essentiellement sur des gènes polymorphes cartographiés à partir de l'analyse des phénotypes, Il constitue la mesure la plus directe, Néanmoins, Ce type de marquer définit les caractères morphologiques c'est à dire la forme et l'apparence d'un individu, organisme, population... Etc.

Chez les plantes ces caractères intéressent la longueur des tiges, la couleur et la forme des feuilles, initiation de la floraison... Etc.

D'une manière générale, les marqueurs morphologiques avec ces caractères phénotypiques sont utilisés pour révéler la variation intra- et inter-populations.

## *Références Bibliographiques*

- 1-Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Flament P, Galluxi P, Genier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T. (1990).** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant molecular Biology Reporter*, 233 :78-93.
- 2- Baudoin J.P. 2001.** Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *BASE*. 5(4): 221-230.
- 3-Bláha L, Pazderů K (2013).** Influence of the Root and Seed Traits on Tolerance to Abiotic Stress. *Agricultural Chemistry*. Edited by Margarita Stoytcheva and Roumen Zlatev. Published by InTech. 5. 1-89.
- 4-Boisson D, Chabaud M, Rosenberg C, David G, Barker. (2001).** *Agrobacterium rhizogenes* -Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations.
- 5-Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. (2003).** Beans (*Phaseolus* spp): Model Food Legume. *Plant and Soil*, 252: 55-128.
- 6-Cannon SB, McCombie WR, Sato S, Tabata S, Denny R, Palmer L, Katari M, Young ND, Stacey G. (2003).** Evolution and microsynteny of the apyrase gene family in three legume genomes. *Molecular Genetics Genomics*, 270: 347-361.
- 7-Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandenbol M, Weidner S, Galibert F. (2001).** Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17): 9877-9882.
- 8-Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss Cronk QC (2001)** Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nat. Rev. Genet.* 2: 607-619.
- 9-Dekak, A. (2010).** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses endémiques des genres *Genista* et *Argyrolobium*. Thèse de magister. Université de Tébessa. P 06 - 18.
- 10-Dénarié J, Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, 1-9.

- 11-Doyle J.J., Luckow M.A., (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a Phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131:900-910.
- 12-Frugoli J, Harris J. (2001).** *Medicago truncatula* on the move. *the Plant Cell*, 13: 458-63.
- 13-GB, Young ND, Cook DR. (2004).** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101: 15289-15294.
- 14-Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. (2005).** Legumes as a Model Plant Family. *Genomics for Food and Feed Report of the f the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. Plant Physiology*, 137: 1228– 1235.
- 15-Gouyon PH. (1994).** La biodiversité dans sa perspective historique, in *Le courrier de l'environnement de l'INRA n°23*, novembre 1994.
- 16-Handberg K, Stougaard J. (1992).** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2 :487-496.
- 17-Harry M. (2001).** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.
- 18-Journet EP, Carreau V, Gouzy J, Thoquet P, Rosenberg C, Barker D, Huguet T, Denarie J, Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, 8(5) : 478–484.
- 19-Kalo P, Endre G, Zimanyi L, Csanadi G, Kiss GB. (2000).** Construction of an improved linkage map diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 641–657.
- 20-Kang, Y., Li, M., Sinharoy, S., and Verdier, J. (2016).** A snapshot of functional genetic studies in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* 7.
- 21-Lazrek-Ben friha F. (2008).** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse De Doctorat. L'université de Toulouse. France.
- 22-Lee , G. - J , Wu , X. , Shannon , J. G. , Sleper , D. A. and Nguyen , H. T. ( 2007 ) .** Chapter 1 : Soybean . *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Oilseeds , Volume 2* : 1-53 . C.
- 23-Lesins KA, Lesins I. (1979).** Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague-Boston-London.
- 24-Lewin B. (1992).** *Genes*. Flammarionmédecine-sciences, Paris.

- 25-Mebarek I. (2010).** Analyse comparative de la diversité génétique et de la structure des populations chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) à l'aide de marqueurs SSR, DART et du pedigree. Thèse de doctorat. Département de phytologie faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université, Laval Québec.
- 26-Parizeau ME. (1997).** La biodiversité. Edition de Boeck, Bruxelles.
- 27-Pecrix, Y., Staton, S. E., Sallet, E., Lelandais-Brière, C., Moreau, S., Carrère, S., et al. (2018).** Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nat. Plants* 4, 1017–1025.
- 28-Prosperi JM, Isabelle O, Angevain M, Génier G, Nansat P. (1993).** Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes, 4: 1-5.
- 29-Prosperi, JM, Guy P, Genier G, Angevain M. (1995).** Les luzernes ou le genre *Medicago*. In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. INRA Editions.
- 30-Quezel P, Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome 1. 4:133-137.
- 31-Raven PH, Evert RF et Eichlorn S E. (2000).** Biologie végétale. 6ème Edition de Boeck, Paris.
- 32-Santoni S, Faivre-Rampant P, Prado E, Prat D. (2000).** Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Cahiers d'études et de recherches francophones/ Agriculture, 9: 311-327.
- 33-Simon J-P., 2005.** Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. Préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal.
- 34-Yan HH, Mudge J, Kim DJ, Larsen D, Schoemaker RC, Cook DR, Young ND. (2003).** Estimates of conserved microsynteny among genomes of *Glycine max*, *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1256- 1265.
- 35-Young N.D. & Udvardi M. ( 2009 ) .** Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes . *Current Opinion in Plant Biology* 12 : 193-201.
- 36-Young ND, Mudge J, Ellis THN. (2003).** Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:199-204.



**38-Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., et al.(2011).** The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480, 520–524.

## *Deuxième Partie :*

*Diversité génétique de l'espèce M.truncatula*

***(Article scientifique)***

## Genetic Diversity in *Medicago truncatula* by morphological, biochemical and molecular markers

Imane MEDOUKALI\*, Rayen MEBARKI, Sara MILES and Douadi KHELIFI\*

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25 000, Constantine, Algérie.

\*Corresponding author: Dr. Imane MEDOUKALI, dkhelifi@yahoo.fr

Submitted in: Bangladesh Journal of Plant Taxonomy.

---

### Abstract

Morphological, proteins, isozyme and SSR markers were used to determine the genetic diversity in 29 accessions of *Medicago truncatula*, collected from different regions in Northern Algeria. The analyses were carried out using twelve biometric traits, two enzymatic systems, two protein fractions (albumin and globulin) and two SSR loci. The data analysis resolved a high level of genetic diversity. All morphometric characteristics contributed to the discrimination of studied accessions and showed a particular environmental geographical link. Area of the first leaf (AFL) was the most important characteristic with high coefficient of variation. Esterase (EST) enzyme system was more polymorphic than glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) system. The results reflect the great diversity of albumin and globulin proteins in this specie; hence, 24 and 27 bands were detected for the two fractions respectively. The SSR amplification products 18 fragments, 10 fragments (17-187 bp) with AFct1 and 8 fragments (25–166 bp) with AFct32 locus. The dendrograms based on Jaccard index showed a wide range of similarity indicators, which confirm the high degree of diversity at all levels, and probably there was no correlation between genetic similarities and eco-geographical localizations of *M. truncatula* accessions.

**Keywords:** *Medicago truncatula*, genetic diversity, Morphological traits, Proteins, isozymes, Molecular markers.

---

## Introduction

Legumes are one of the world's largest plant factions; they are flowering plants whose seeds are characterized by the possibility of separating them into two parts such as (beans, peas, peanuts, beans, soybeans, and alfalfa...). Pulses play very important roles in various fields (food and industry Economic, ecological and agricultural) being an essential source of protein, vitamins, carbohydrates... for humans and animals, and nitrogen for soil improvement. It contains more than 20,000 highly diverse species. Among these, *Medicago* species has been one of the most widely studied legumes because of numerous agriculturally important and domesticated species (Small, 2010), with an extremely diverse phylogenetic heritage.

Most leguminous plants are hard to study, because they got a big genome. however a recent study shows that the specie *Medicago truncatula* (truncated alfalfa) , which spontaneously growing in arid and semi-arid environments in the Mediterranean basin, can be considered as a model specie, due to its simple structure and ease of handling ,well accessible to molecular tools and genetic analysis. This forage specie belonging to the subfamily Papilionoideae, are located in different geographic areas. Whereas according to the scientific researchers it is an annual specie; native; diploid ( $n = 8$ ) and autogamous; characterized by a small genome (500-550 Mbp) and its rapid generation time. Bonnin et al (1996) reported that biodiversity of the specie *M. truncatula* is characterized by high morphological and genetic variability within and between populations and by significant individual homozygosity.

However, the use of genetic diversity in a breeding program inevitably depends on its estimation and the selection of the type of marker that most accurately reflects it. Which facilitating gene discovery and comparative genomics. On the basis of this, the morphological characterization is the first step in the description and classification of genetic resources (Smith and Smith, 1989). While, molecular markers give, direct access to DNA polymorphism and allow highlighting a variety nucleotide sequences between individuals. Protein also is the first product of the genetic system, on this account; it can be used as genetic marker. Albumins and globulins comprise the major storage proteins of legumes (Osborne, 1924). The Isozyme markers when used in combination with other approaches are of considerable value in understanding the crop plant evolution (Malaviya et al. 2008); and can define a biochemical polymorphism.

Therefore, the present study was carried out to identify similarities and differences among accessions of *Medicago truncatula* specie, naturally grown in Northern Algeria by using morphological; isozymes; albumin and globulin seed storage proteins and SSRs as genetic markers.

## Material and methods

### Sample collection and preparation

The study was conducted on 29 accessions of *M. truncatula* specie, which were collected from different sites covering a wide range of bioclimatic stages in northern Algeria from May to July 2013. The major characteristics of each site [altitude (Alt), latitude (Lat), longitude (Lon)] are detailed in Table 1.

Mature seeds of each individual were extracted from pods, scarified and sterilized with 3% (v/v) sodium hypochlorite solution. Sterile grains were germinated in the dark for 2 days in petri dishes containing 1% water-agar (w/v) at room temperature, and then kept under normal daylight. Young leaves from every sample (0.3 g) were ground into a very fine powder using liquid nitrogen and frozen at -20°C for further enzymatic and molecular analyses. However, for protein analysis, mature seeds were ground with a mortar and pestle at room temperature until a fine powder was obtained.



**Fig.1.** Geographical locations of the 29 accessions of the specie *M. truncatula* in the Algerian North.

**Table 1.** Geographical origins of the 29 accessions studied, with the corresponding eco-geographical parameters.

<u>N</u>	<u>REGION</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>ALT</u>	<u>LAT</u>	<u>LON</u>	<u>Pm</u> <u>Tm</u>	<u>TM</u> <u>CLIMAT</u>
Mt1	Mila	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	568 2,5 31,3	HH
Mt2	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742 4,4 31,1	HH
Mt3	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	704 3,2 31,4	SH
Mt4	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E	558 3 32,2	SH
Mt5	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624 3,3 32	SH
Mt6	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E	462 0,4 31,3	HH
Mt7	Oum Bouaghi	Ouled Hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E	454 1,9 31,7	HH
Mt8	Oum Bouaghi	Ain Fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E	492 0,4 30,8	HH
Mt9	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E	626 8,4 30,1	HH
Mt10	Bourdj bouarriridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E	368 1,6 33,4	SH
Mt11	Bourdj bouarriridj	mansoura	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E	409 3,1 32,6	SH
Mt12	Bourdj bouarriridj	air lac ain zada	2000 m	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E	495 0,2 31,1	SH
997							
Mt13	Bourdj bouarriridj	-	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E	420 1,2 33,1	SH
Mt14	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	506 0,2 30,9	H
Mt15	Bouira	Akhdoria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E	711 5,9 31,9	H
Mt16	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E	670 7,6 29,8	H
Mt17	Alger	Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E	762 6,9 28,4	HH
Mt18	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791 7 30,9	HH
Mt19	Ain Defla	1	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E	593 6 33,5	H
Mt20	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593 6 33,5	H
Mt21	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	405 6,6 32,6	H
Mt22	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O	368 7,5 29	SS
Mt23	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736 2,5 30,6	SH
Mt24	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	609 1,1 30,1	SH
Mt25	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564 1,9 32,1	H
Mt26	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E	482 1 31,3	H
Mt27	Sétif	centre-ville	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E	473 0,3 31,7	H
Mt28	Batna	-	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N	335 0,7 32,6	HH
Mt29	Oran	-	87	35°37'40,780	36°01,72"O	383 8,2 26,6	H

### **Morphological analysis**

Morphological measurements were implemented on only 24 accessions of *M. truncatula*. For each accession, twelve quantitative traits related to seeds, pods and Cotyledons described by Issolah and Abdelguerfi (1999) were analyzed using a dial-micrometer with an accuracy of 0.01 mm: Pod size: length (LP), width (WP); Number of seeds per pod (SP); Seed size: length (LS), width (WS); Weight of 30 pods (WTP); Weight of a thousand seeds (WTS) and the ratio weight of seed/weight of pods (RW); Seedling characteristics: date of emergence of cotyledons (DCOT), length of first leaf (LFL), width of first leaf (BFL) and area of first leaf (AFL = LFL \* BFL). DCOT was measured from the time the seedlings were placed under light. LFL, BFL and AFL were measured after six days of germination. Each trait was scored as a mean value of ten randomly chosen individuals for every accession.

### **Enzymatic analysis**

A total of 29 accessions of *M. truncatula* was evaluated using two enzymatic systems: Esterases (EST, E.C. 3.1. -) and Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1) (Weeden and Wendel, 1990). Isozymes were extracted from the leaves of 15-day-old seedlings using the process of Bendiab et al. (1993). Enzyme separation was performed according to Singh et al. (1991) using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) method, on 10% polyacrylamide gel for EST system, while the GOT system required a 7% polyacrylamide gel. This analysis was performed at 40 MA for 3 hours at 4°C. The gels were stained using the methods given by Bendiab et al. (1993).

### **Albumin and globulin analysis**

The extraction protocol was carried out using the technique developed by Franco et al. (1997) with some modifications at the laboratory level. The resulting powder of each sample (10 mg) was defatted with *n*-hexane (0.35 mL) with stirring for 30 min, the hexane was decanted and air-dried after centrifugation of 15 min at 14 000 rpm. The albumin fraction was extracted from the defatted powder by stirring with 0.35 mL distilled water (pH 8) containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min at 4°C. The albumin-containing solution was centrifuged at 14 000 rpm, 4°C for 20 min and the supernatant was conserved at 4°C as the albumin fraction. This extraction was repeated twice to eliminate as possible as the remaining albumin fraction. The total globulins were extracted by stirring the pellet with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8, containing 10% (w/v)



NaCl, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) and 1 mM PMSF for 30 min at 4°C. The suspension was centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant contained the globulin fraction.

Extracted albumin and globulin fractions were precipitated with 1 mL cold acetone (1:4 (v/v)) for 1 h at -20°C and centrifuged at 10 000 rpm for 15 min, then, acetone was decanted and evaporated, and the pellet was suspended in 100  $\mu$ L of sample buffer. Nonreducing SDS-PAGE was carried out in 12,5% polyacrylamide resolving gel and 5% polyacrylamide stacking gel according to Singh *et al.* (1991) at 60 V over the night.

### SSR analysis

Total genomic DNA was isolated according to a Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol described by Doyle and Doyle (1990). DNA quality was tested using 0.8% agarose gel electrophoresis. After measuring DNA concentration with NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), samples were diluted to 50 ng/ $\mu$ l for PCR amplification.

A number of five SSR primer pairs were screened and on the basis of this preliminary data, two SSR primers were selected according to the quality of fragment amplification (Table 2).

**Table2.** Sequences and link group of five microsatellite primers test Primer Linkage

Primer	Linkage group	Motif	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AFctt1*	4	(CTT) <sub>9</sub> (CAA) <sub>3</sub>	CCCATCATCAACATTTTCA	TTGTGGATTGGAACGAGT
AFct11	7	(CT) <sub>12</sub>	GGACAGAGCAAAAGAACAAT	TTGTGTGGAAAGAATAGGAA
AFct32*	3	(CT) <sub>14</sub>	TTTTTGTCACCTCATTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC
AFca1	4	(CT) <sub>4</sub> (CA) <sub>10</sub>	CGTATCAATATCGGGCAG	TGTTATCAGAGAGAGAAAGCG
AFca11	6	(CA) <sub>11</sub>	CTTGAGGGAACTATTGTTGAGT	AACGTTTCCCAAACATACTT

\*Primers used in this study.

PCR amplification was carried out in a 20  $\mu$ l final volume containing 3  $\mu$ l of genomic DNA (50 ng/ $\mu$ l) as template, 2.4  $\mu$ l of dNTP mix containing 2.5 mM of each of the four nucleotides, 3  $\mu$ l of 10 x reaction buffer, 1.2  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1.8  $\mu$ l of each SSR forward and reverse primer (10  $\mu$ M) and 0.3  $\mu$ l of Taq DNA polymerase



Thermo Scientific (2.5 U). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, with a final 72°C extension for 10 min. Amplification products (10 µl per lane) were resolved on 8% non-denaturing polyacrylamide gel, using an acrylamide/bis-acrylamide ratio of 19:1 and a 0.5X TBE buffer. Electrophoresis was performed at 175 V constant voltages, for approximately 2 h 30 min at 4°C, and revealed with ethidium bromide for 5 min.

### **DATA analysis**

Morphological characteristics were analyzed using the principal component analysis (PCA). Mean, standard deviation (s.d) and coefficient of variation (CV) of the morphological traits were computed. The correlation between morphological variability and bioclimate was examined by another PCA including the most important ecological parameters (Alt., Pm, Tm, TM and Q2). Phenetic relationships among accessions were evaluated by UPGMA (Unweighted Pair- Group Method using Arithmetic Averages) cluster analysis based on Euclidean distances. All analyses based on morphological markers were performed using Statistical version 6.0 program.

For isozyme, protein and SSR analysis, electrophoretic profiles are compared according to the mobility of obtained bands. The various samples studied are compared in pairs and the genetic distances were computed using the Jaccard index. From the calculated genetic distances, a hierarchical classification in UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) was developed using the Xlstat 2014 software.

## **Results**

### **Morphological markers**

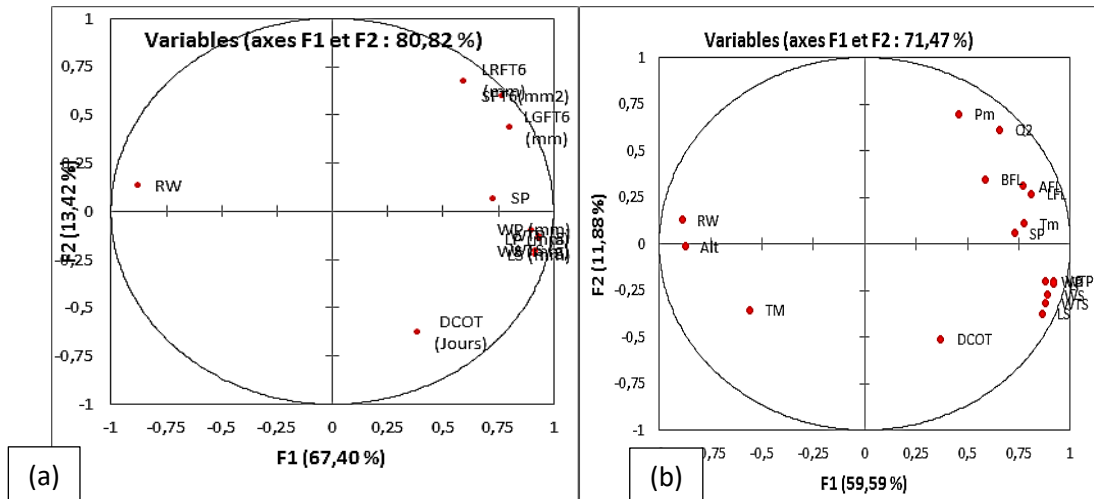
#### *Morphometric characteristics analysis*

Mean, range, sd and CV values of the morphological characteristics studied are shown in Table 3. Area of the first leaf (AFL) was found to be the most variable characteristic with CV of 58.38%. Twelve accessions showed AFL greater than the overall mean. It ranged from 12.19 mm to 40.68 mm with an average of 23.70 mm across all accessions. Followed by SP with CV value of 2.31 %, whence the lowest SP was 1.33, while the highest was 9.00. Seed size characteristics (LS and WS), DCOT and BFL displayed the lower CV values with 0.11, 0.04, 0.49 and 0.30, respectively.

A principal component analysis (PCA) was carried out on the twelve qualitative traits (fig. 2a). This accounted for 80.8% of the total variation with 67.40% and 13.42% for axis 1, 2 respectively. The component values of each variable were projected in the two first principal components (PC1 and PC2). The majority of characters are positively correlated to axe 1, except RW, which was negatively correlated with all other characteristics (Table 4). The traits LP, WP, WTP, WTS, LS, WS and SP, were highly correlated between them and had high loadings on PC1. LFL, BFL and AFL characteristics displayed a relative correlation between them and contributed to the formation of PC1 and PC2. The highest positive contribution ( $r = 0.937$ ) was shown between LS and WTS; However, the highest contribution negative ( $r = -0.932$ ) shown between RW and WTP (Table 4).

*Correlation between morphological characteristics and ecological parameters*

For the purpose demonstrating the relationship between the studied morphological characteristics and the bioclimate, another PCA was conducted taking into account the five environmental characteristics and criteria (Alt, Pm, TM, Tm and Q2) (fig. 2b). The first two axes represent 71.74% of the total difference (59.59% and 11.88% respectively). All properties form a group with a significant contribution to the formation of PC1 on the positive side, while Alt and TM are negatively associated with this axis. On the other hand, PC2 is mainly affected by PM, and is negatively associated with DCOT. This variable distribution indicates a strong relationship between morphological properties and the bioclimate. A very high positive correlation was recorded between (Tm) and (WTP) with  $r = 0.706$ . On the other hand, there are negative relationship links between (TM) and (WP),  $r = -0.557$ .



**Fig.2.** Principal component analysis of twelve morphological characteristics (a) and their relationship with ecological parameters (b).

**Table 3.** Mean, standard deviation and coefficient of variation of the twelve traits analyzed on 28 accessions of *M. truncatula*.

Variable	Min	Max	Mean	s.d.	CV (%)
LP (mm)	3,83	8,55	6,23	1,21	1,47
WP (mm)	5,13	10,23	6,65	1,28	1,64
WTP (g)	0,85	5,54	2,77	1,45	2,10
SP	1,33	9,00	5,47	1,52	2,31
LS (mm)	2,79	4,14	3,47	0,33	0,11
WS (mm)	1,44	2,14	1,81	0,19	0,04
WTS (g)	2,18	6,53	4,31	0,94	0,88
RW	0,92	2,62	1,81	0,54	0,29
DCOT (Jours)	1,00	3,00	1,67	0,70	0,49
LFL (mm)	5,19	10,58	7,55	1,34	1,80
BFL (mm)	2,12	4,00	3,08	0,55	0,30
AFL (mm <sup>2</sup> )	12,19	40,68	23,70	7,64	58,38

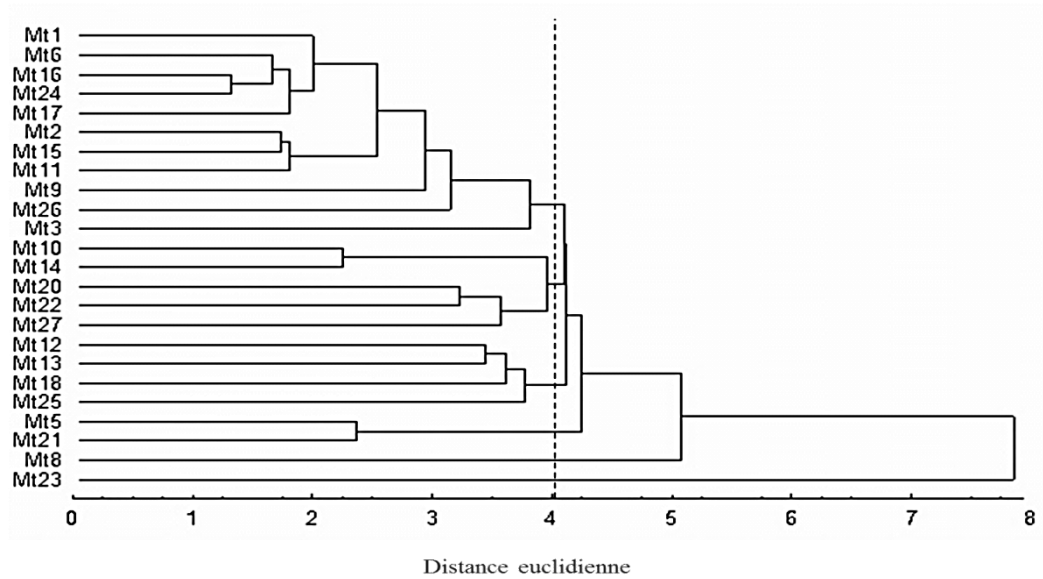
Min: Minimum, Max: Maximum, s.d.: Standard deviation, CV: Coefficient of Variation, LP: Length of pod, WP: Width of pod, WTP: Weight of 30 pods, SP: Number of seeds per pod, LS: Length of seed, WS: Width of seed, WTS: Weight of thousand seeds, RW: Ratio weight of seeds/Weight of pods, DCOT: Emergence date of cotyledons, LFL: Length of the first leaf, BFL: Breadth of the first leaf, AFL: Area of the first leaf.

**Table 4.** Correlation matrix between the twelve morphological characteristics analyzed.

Variables	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LFL	BFL	AFL	Alt	Pm	Tm	TM	Q2
LP	1																
WP	0,859	1															
WTP	0,906	0,857	1														
SP	0,677	0,600	0,601	1													
LS	0,861	0,795	0,850	0,580	1												
WS	0,828	0,859	0,845	0,696	0,916	1											
WTS	0,878	0,802	0,878	0,544	0,937	0,869	1										
RW	-0,878	-0,802	-0,932	-0,611	-0,769	-0,793	-0,764	1									
DCOT	0,366	0,320	0,302	0,222	0,475	0,436	0,474	-0,323	1								
LFL	0,678	0,653	0,681	0,567	0,663	0,616	0,620	-0,632	0,069	1							
BFL	0,412	0,431	0,416	0,442	0,383	0,407	0,442	-0,389	-0,007	0,662	1						
AFL	0,605	0,615	0,602	0,532	0,578	0,566	0,600	-0,550	0,051	0,907	0,911	1					
Alt	-0,795	-0,741	-0,759	-0,616	-0,654	-0,753	-0,693	0,782	-0,458	-0,626	-0,440	-0,594	1				
Pm	0,304	0,206	0,264	0,350	0,166	0,254	0,201	-0,352	0,003	0,445	0,254	0,358	-0,463	1			
Tm	0,669	0,615	0,706	0,430	0,535	0,563	0,639	-0,705	0,277	0,606	0,368	0,549	-0,859	0,403	1		
TM	-0,357	-0,557	-0,455	-0,440	-0,358	-0,472	-0,391	0,423	-0,081	-0,418	-0,391	-0,439	0,370	-0,446	-0,350	1	
Q2	0,478	0,397	0,479	0,481	0,321	0,409	0,389	-0,539	0,106	0,568	0,340	0,480	-0,667	0,928	0,670	-0,597	1

*Cluster analysis based on morphological characteristics*

Euclidean distances values based on the twelve quantitative traits were represented in a UPGMA phenogram (Fig.3), which subdivided *M. truncatula* accessions into six major clusters at distance level  $d = 4$ . The first cluster was the largest, composed of 11 accessions belonging to different eco-geographic locations, subdivided itself into two sub-clusters at distance  $d = 3.8$ . Cluster 2 was composed of five *M. truncatula* accessions (*Mt10*, *Mt14*, *Mt 20*, *Mt22* and *Mt27*) at distance  $d=3.9$ , characterized by a difference in distances between collection sites (some near and others far), and at the level of their altitudes and their climate. At  $d=3.7$ , the third cluster consisted of four accessions: *Mt12* (Bourdj bouarriridj), *Mt13* (Bourdj bouarriridj), *Mt18* (Blida) and *Mt25* (Guelma), collected from central to eastern Northern Algeria with bioclimatic stages vary from sub-humid to hyper-humid. The fourth cluster embodied two accessions (*Mt5* and *Mt21*) at  $d=2.3$ , representing two regions fairly distant and ecologically close (sub-humid /humid, respectively). Finally, the two accessions *Mt8* (oum Bouaghi) and *Mt23* (Medea) constituted each the fifth ( $d=5.1$ ) and the sixth ( $d=7.9$ ) clusters, respectively.

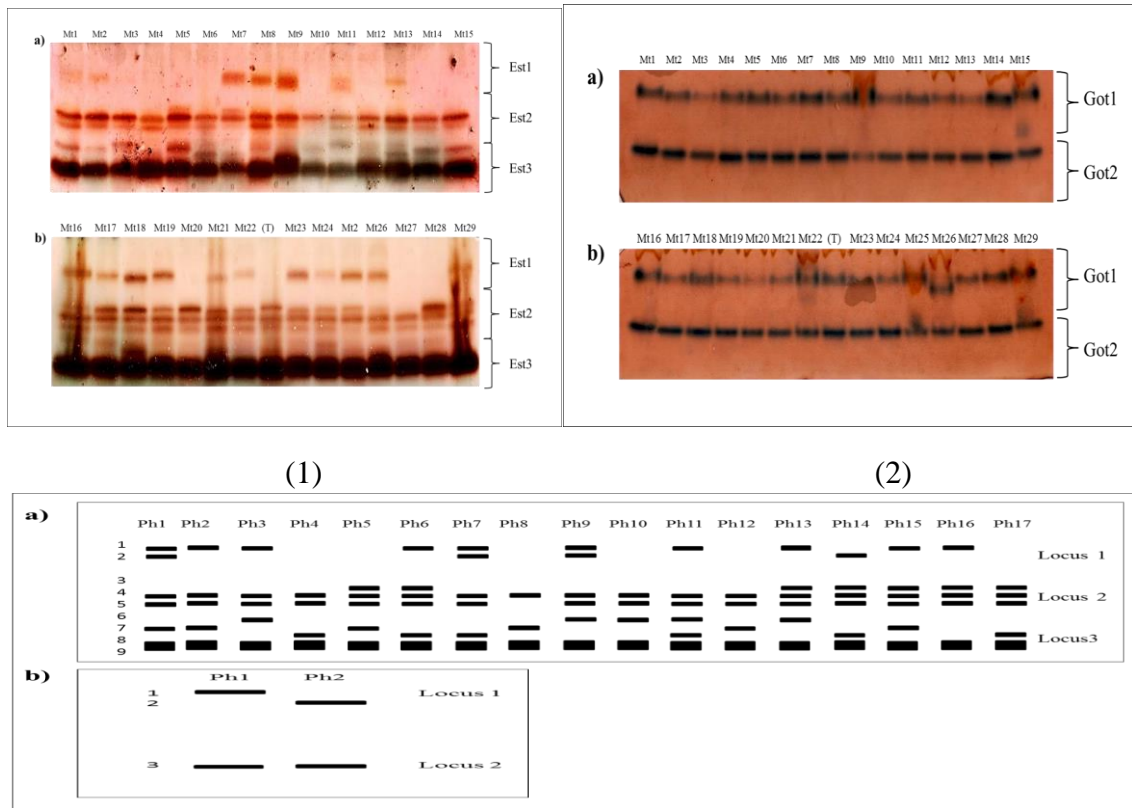


**Fig .3.** UPGMA dendrogram based on morphological characteristics of 25 accessions of *M. truncatula*.

### Isozyme markers

Zymograms for the two enzymatic systems studied (EST and GOT) and their diagrammatic representations are presented in Fig.4. A total of five isozyme loci with 12 alleles and 20 phenotypes were recorded for the two enzymes analyzed. Three bands were scored based on GOT enzyme system, attributed to two loci Got1 and Got2 with 2 (Gt1 and Gt2) and 1 allozymes (Gt3), respectively (table 5). Where Gt3 was available in all accessions (monomorphic), while the Gt2 was present in only one accession Mt26, As for Gt1, it was present in all accessions except *Mt26*.

Three zones of activity considered as product of three EST loci with 9 allozymes and 17 phenotypes, were observed among all *M. truncatula* accessions. In total, we recorded 2, 3 and 4 bands for Est1, Est2 and Est3, respectively. Furthermore, both E4 and E8 bands were present in all accessions with the highest frequency value (1). As for each of alleles E1, E3, E5 and E7 were found with 0.60, 0.60, 0.96 and 0.50 frequencies, respectively. The lowest frequency (0.1) was represented by the allozyme E2, observed in four accessions (*Mt1*, *Mt9*, *Mt17* and *Mt20*), shared by remote geographical areas.



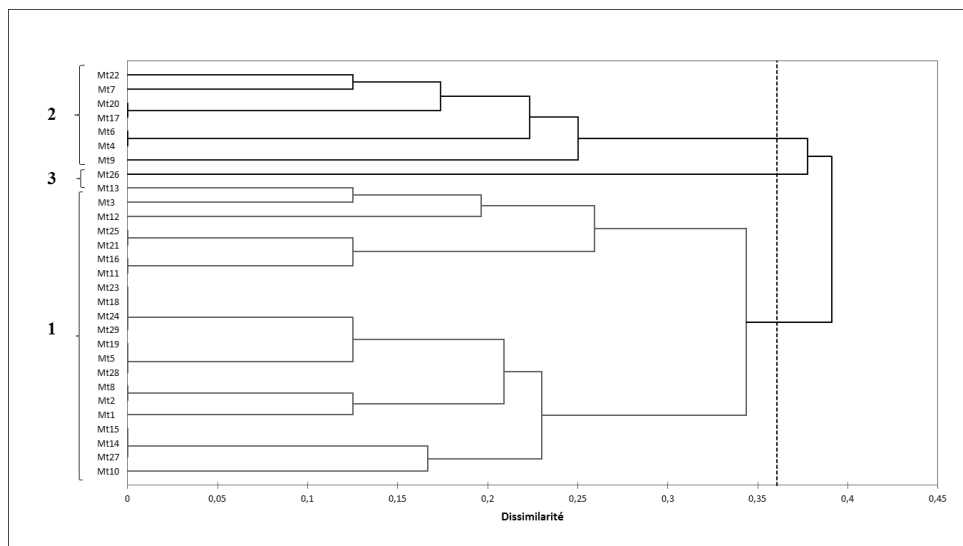
**Fig.4.** Zymograms of the enzymatic system EST (1) and GOT (2) for the 29 accessions of the specie *M. truncatula* with their phenotypes: a) for EST, b) for GOT.

**Table 5.** Matrix presence/absence, mobilities and frequencies of allozymes of the 29 accessions of *M. truncatula*.

Loci	Alleles	Mt 1	Mt 2	Mt 3	Mt 4	Mt 5	Mt 6	Mt 7	Mt 8	Mt 9	Mt 10	Mt 11	Mt 12	Mt 13	Mt 14	Mt 15	Mt 16	Mt 17	Mt 18	Mt 19	Mt 20	Mt 21	Mt 22	Mt 23	Mt 24	Mt 25	Mt 26	Mt 27	Mt 28	Mt 29	total	Frequencies	
Est1	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	16	0,6	
	E2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,1	
	E3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	16	0,6
Est2	E4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
	E5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	28	0,96	
	E6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,2	
Est3	E7	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	14	0,5	
	E8	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	9	0,3	
	E9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
Got1	Gt1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	28	0,96
	Gt2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,03
Got2	Gt3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	

A genetic distance matrix based on the two enzymatic systems (EST and GOT) was estimated according to Jaccard index. The higher genetic distance value (0.70) was obtained between *Mt26* and *Mt10*, which collected from two regions close geographically, and ecologically (table1). It is therefore represent the maximum of divergence. Despite the fact that some of them were taken from geographically distant areas; such as (*Mt25/ Mt21*), 17 pairs of accessions were completely similar (d=0.00); while others are geographically and ecologically close, such as (*Mt8/Mt2*).

Interesting information in intraspecific variability is obtained with cluster analysis. The UPGMA dendrogram based on distances matrix of the wise pooled zymogram (fig. 5) showed the presence of three major clusters at d= 0.36. The first one (d= 0.34) was the largest, composed of 21 accessions and subdivided into two main sub-cluster ; the first sub-cluster contains 14 accessions belonging to different climates (table 1) at a distance level of 0.23 ; the second sub-cluster comprised 7 accessions (*Mt11, Mt16, Mt21, Mt25, Mt12, Mt3* and *Mt13*) belonging to different regions, at a distance level of 0.26. The second cluster composed of 7 accessions at a distance level of 0.25; it subdivided into two sub-clusters with an assembly not compatible with the geographic environmental location. While the accession *MT26* (setif) has been isolated by an independent cluster at genetic distance level of 0.37.



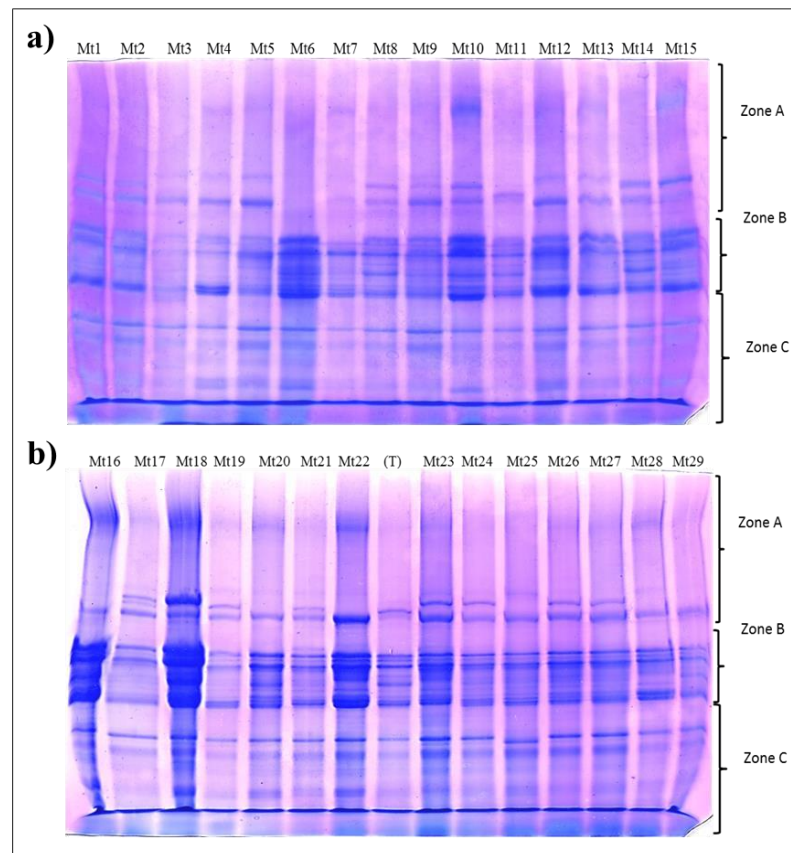
**Fig. 5.** Hierarchical classification in UPGMA of the 29 accessions of *M. truncatula* based on enzyme polymorphism (Got-Est): 1) the first group, 2) the second group, 3) the third group.



## Protein markers

### *Albumin electrophoresis*

Analysis of the albumin fraction (Fig. 6) revealed 24 bands across all the collections. The comparison between accessions showed a high variation in Albumin frequencies. Where, only four monomorphic bands (A5, A9, A21, and A24); was omnipresent in all the accessions at 100%. Followed by (A8, A17); that was absent in only one accession; with frequency value of 0, 97. While the lowest frequency band A19 (0.07); that detected in only two accessions (data not shown).



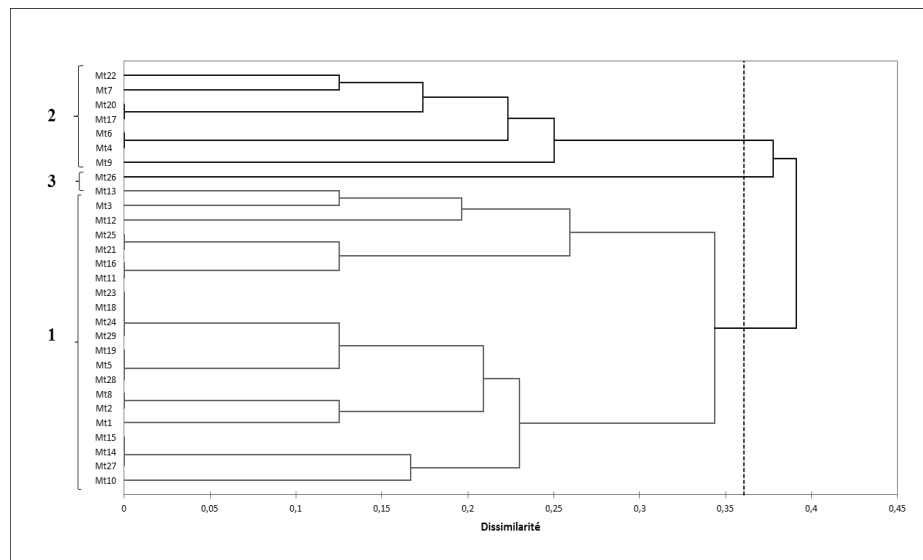
**Fig. 6.** Albumin electrophoretic profiles obtained by SDS/PAGE in 29 accessions of *M. truncatula*: a) Mt1 to Mt15, b) Mt16 to Mt29, (T) = Control.

A genetic distance matrix based on Albumin data was estimated according to Jaccard index. The smallest distance value of ( $d= 0.05$ ) is observed between (*Mt24* and *Mt23*) collected from two regions close geographically; environmentally similar. Followed by  $d= 0, 06$ , represented by four pairs of accessions, some taken from geographically distant areas; such as (*Mt29/ Mt28*), and others are close geographically and ecologically as (*Mt21 / Mt17*) (Chlef/ Alger). The higher genetic distance value of



( $d= 0.62$ ) is obtained between (*Mt29 / Mt11*), representing the great variation, where these accessions represent two regions fairly distant. The majority of other accessions showed intermediate levels of similarity.

The dendrogram based on Jaccard's dissimilarity matrix of the pooled albumin pattern (Fig. 7), showed the presence of four major clusters at  $d= 0.35$ . One includes two accessions (*Mt1, Mt7*) belonging to a geographically close regions with a hyper-humid climate at  $d = 0.29$ . The second group composed of 12 accessions subdivided into three sub-clusters at distance of  $d= 0.33$  (Fig. 7). The majority of these accessions were collected in the eastern regions of the country. The accession *Mt3* has been isolated by a group independent at the high genetic distance of ( $d= 0.48$ ). Fourteen accessions belonging to different Eco-geographic locations; clustered together in the fourth group, which was subdivided into several subgroups at  $d= 0.28$ .

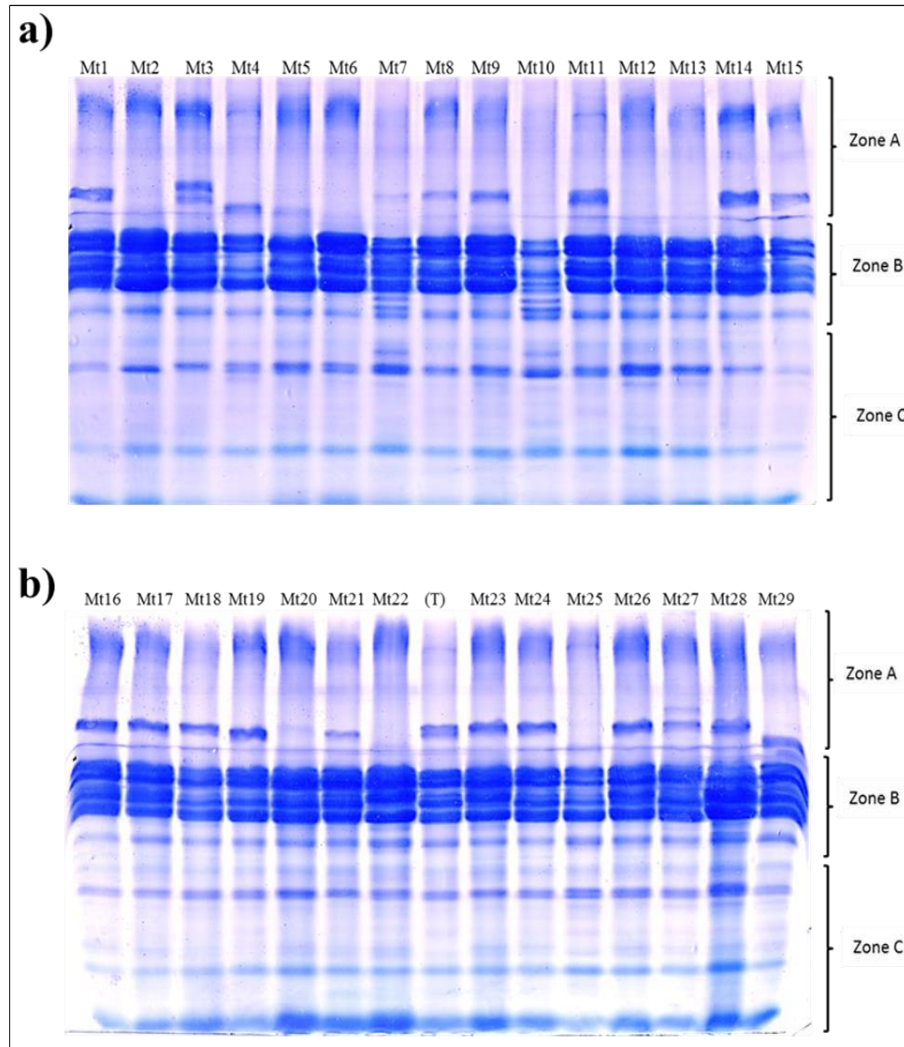


**Fig .7.** Dendrogram based on UPGMA clustering of albumin data showing relatedness among the studied accessions of *M. truncatula*.

### *Globulin electrophoresis*

By studying the electrical diagram of 27 bands, significant variability in globulin frequencies was observed (fig. 8). Only nine bands were monomorphic (G1, G2, G12, G13, G17, G18, G22, G23 and G27), they are ubiquitous in all accessions with a maximum rate (1.00), which implies their dominance. Followed by bands G14, G16, G26 and G25, with lower values, which vary between 0.82 and 0.96. Average frequencies between 0.51 and 0.72 (G6, G10, G11 and G19) were also recorded. The

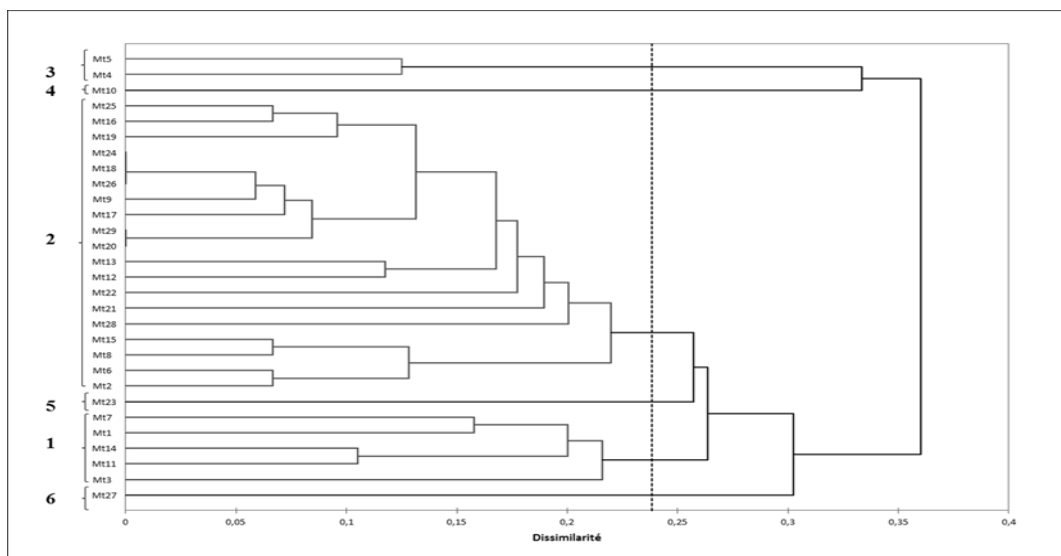
lowest frequency of 0.03 bands (G3, G4 and G8), were found in accessions from eastern Algeria (Setif, Constantine/Beni Hamidan, Constantine/Chettaba, respectively).



**Fig. 8.** Globulin electrophoretic profiles obtained by SDS/ in 29 accessions of *M. truncatula*: a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29,(T)=Control.

The variations among the 29 accessions of *M. truncatula* had been calculated from the globulin records the use of the Jaccard distance as a coefficient. Data vary among 0.00 and 0.50, with a median of 0.23. A total similarity in globulin profiles became observed among 4 pairs of accessions: *Mt24* and *Mt18*, *Mt26* and *Mt18*, *Mt29* and *Mt20*, *Mt26* and *Mt24*, with distance value 0.00. They were collected in relatively remote areas (Blida/ Ain Defla/ Tissemsilt/ Sétif/ Oran) and ecologically vary from hyper-humid to subhumid. On the other hand, the highest genetic distance (0.50) was recorded for three pairs (*Mt10/Mt21*), (*Mt10/Mt22*) and (*Mt10/Mt23*) collected in geographical areas with a different climatic between (subhumid up to humid).

The formed UPGMA dendrogram (Fig. 9) from globulin analysis showed that all accessions were split into six major groups at genetic distance coefficient  $d = 0.24$ . The first organization ( $d = 0.21$ ) had five accessions (*Mt1*, *Mt3*, *Mt7*, *Mt11* and *Mt14*) that belong to relatively remote areas of eastern Algeria (Mela, Constantine/Bani Hamiden, Umm Bouagi, Borg Bouarej and Bouayrah, respectively), with vital climatic phases varying from hyperhumid to subhumid. The second group carried 19 accessions and is considered the largest group at 0.22 distance, representing the entire north of Algeria (east to west). Followed by the third group representing *Mt3* and *Mt4* at the smallest distance equal to 0.12. The fourth, fifth and sixth groups included one accession each: *Mt10*, *Mt23* and *Mt27* at distances  $d = 0.33$ ,  $d = 0.25$  and  $d = 0.30$ , respectively.

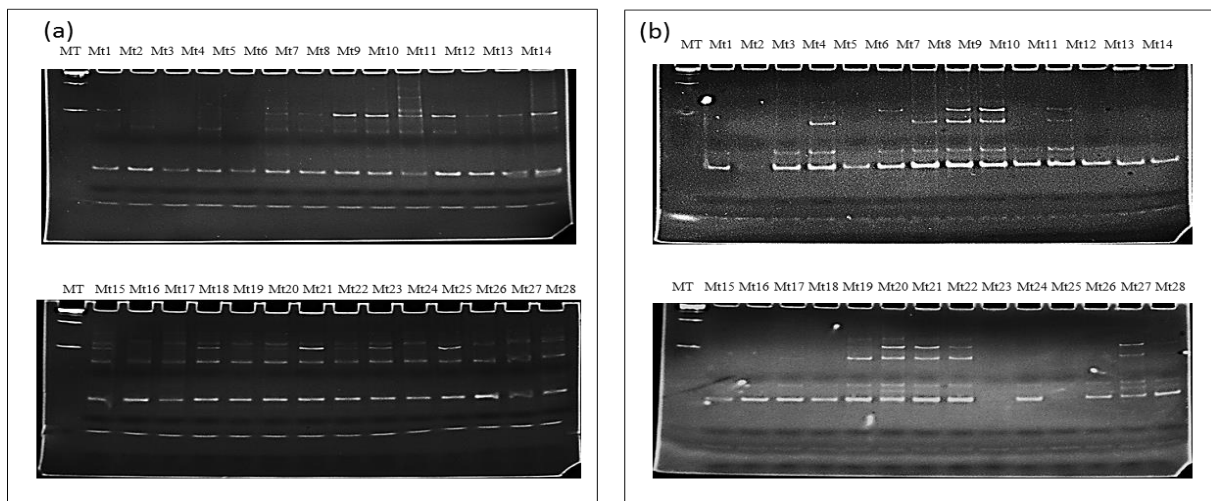


**Fig. 9.** UPGMA hierarchical classification of the 29 accessions of *M. truncatula* based on globulin polymorphism: 1) the first group, 2) the second group, 3) the third group, 4) the fourth group, 5) the fifth group, 6) the sixth group.

## SSR markers

Among the five SSR markers selected for testing polymorphism in 25 accessions of *M. truncatula*; three of them, did not produce any fragments. Two markers (AFctt1 and AFct32) produced 18 fragments, with 10 bands (17-187pb) and 8 bands (25-132 pb), with an average of 4.32 and 3.32, for AFctt1 and AFct32 respectively (Table 6). SSR banding patterns based on each of the primers is given in Fig.10. The results showed significant variation in detected frequencies, where 14 SSR polymorphic fragments were recorded out of 18.

A high variation recorded for AFctt1 SSR primer with polymorphism value of 80%, hence, only two monomorphic fragments (19 and 59 pb) among 10 detected; were omnipresent in all the accessions. Followed a 100 pb fragment with frequency of 0.88; which was missing in only 3 accessions. The lowest frequency fragment (187 pb) was observed only one accession *Mt13* (Bourdj bouarriridj). Regarding AFct32 SSR primer, the value of polymorphism is 75.00%; whereas, among the eight bands detected; two fragments (34 and 25 pb) have been marked monomorphic; they are ubiquitous in all accessions with a maximum frequency (1.00). The low frequency fragment with 30 pb size, was shared by only 3 accessions.



**Fig.10.** Electrophoretic profiles of *M.truncatula* SSR bands revealed by AFctt1 primer (a) and AFct32 primer (b).

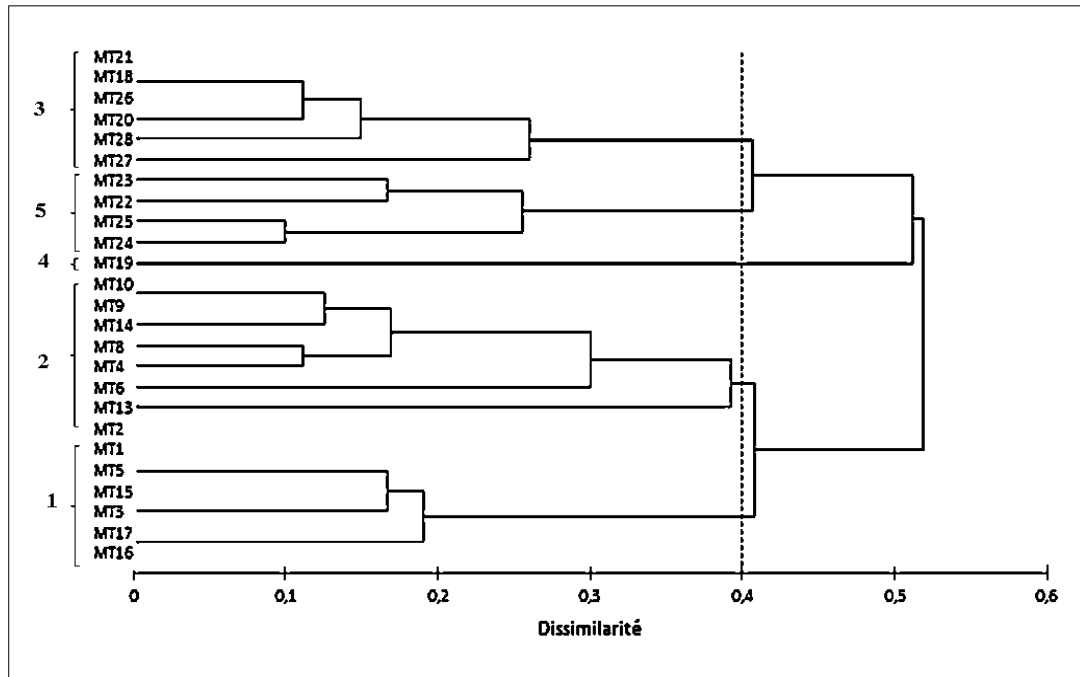
**Table 6.** Total number of amplified bands and polymorphism in 25 *M. truncatula* accessions for each SSR marker.

Loci	Total no. of amplified bands	Average no. of bands	Approx. band size range (pb)	No. of polymorphic bands	Amount of Polymorphism (%)
AFctt1	10	4.32 (3-6)	17-187	8	80
AFct32	8	3.32 (2-6)	25-132	6	75.00

Pairwise comparison was performed among all studied accessions. The average Jaccard's dissimilarity coefficient calculated from SSR data was assessed as  $d = 0.375$ . This study highlighted some of the results that demonstrated the existence of eight pairs of accessions: *Mt2/Mt1*, *Mt5/Mt1*, *Mt5/Mt2*, *Mt15/Mt1*, *Mt15/Mt2*, *Mt15/Mt5*, *Mt17/Mt16* and *Mt21/Mt18* were 100% similar. They were collected from geographically relatively remote areas (Constantine/Mila/Bouira/Alger/Chlef/Blida) and ecologically ranging from hyper-humid to sub humid, with elevation values of 584, 831, 144, 3, 70 and 135, respectively. While the highest distance was observed between *Mt18/Mt22* (Mascara/Blida) with  $d = 0.80$ . These samples were collected from two environmentally remote sites (semi-dry and extremely wet).

A UPGMA dendrogram based on SSR markers was drawn using Jaccard's dissimilarity coefficient (Fig.11). There were five main clusters at a distance  $d=0.4$ . The first cluster ( $d=0.19$ ) comprises seven accessions (*Mt1*, *Mt2*, *Mt3*, *Mt5*, *Mt15*, *Mt17*, *Mt16*) belonging to the eastern region of the country (Constantine, Mila and Bouira), whose bioclimate stages range from hyper-humid to sub-humid, with the exception of *Mt16* and *Mt17* (Algiers) from the center of Algeria, which is a hyper humid to humid climate. The second cluster includes seven accessions at a distance of  $d=0.39$ , belonging to relatively faraway regions of eastern Algeria (Oum Bouaghi, Constantine, Bourdj Bouarriridj and Bouira), with bioclimatic stages starting from great-weather humid to sub-humid, except that *Mt9* taken from the northern a part of Algeria (Tipaza) has a super humid climate. At distance of 0,26; The third cluster includes six accessions accrued in areas from the center to the west of Algeria and belonging to a moist weather, except Setif (*Mt26* and *Mt27*) and Batna (*Mt28*) which represents the East side, with a climate (humid and hyper humid) , with a maximum degree of genetic divergence ( $d=0.5$ ). *Mt19* accession established the fourth group that is deemed independent of others. The fifth institution consists of four accessions (*Mt22*, *Mt23*, *Mt24* and *Mt25*) at the distance

level of 0.25. These accessions have the particularity of being gathered in one of a kind regions starting from the East through the center to the West of the country (Guelma, Medea, Tissemsilet, Mascara) with a huge variety of bioclimatic ranges that varies from humid to semi-arid.



**Fig. 11.** Hierarchical UPGMA classification of 25 accessions of *M. truncatula* based on SSR polymorphism.

## Discussion

This study determined the genetic diversity of *M. truncatula* accessions collected in wide range of climatic stages in Northern Algeria by using morphological, isozyme, protein and molecular markers.

First, this is not the first report on the morphological and genetic diversity of *Medicago* populations. Hence, Riday and Brummer (2004) assessed the morphological performance of 125 *Medicago* genotypes. Ping Li et al. (2009) reported that morphological estimations are more dependent on environment and are more subjective than other measurements.

Result of this study confirmed the high degree of diversity among Algerian *M. truncatula* accessions based on morphological characters; where, most of the twelve quantitative traits used in terms of pod, seed and seedling traits, are important in differentiation of *M. truncatula* genotypes. Moreover, fruit traits (pod and seed) are often used in several studies for

distinguishing species of the genus *Medicago* L. (Heyn, 1963; Lesins and Lesins, 1979; Quezel and Santa, 1962; Small and Jomphe, 1989). This high morphological variation within these Algerian wild pool is possibly because the geographic extent that is represented. This result has been documented previously by Haddiou et al. (2012) and El Hansali et al. (2007), when analyzing Moroccan *M. truncatula* population structure based on morphological traits. The biodiversity of the specie *M. truncatula* is characterized by a high morphological and genetic variability intra- and inter-populations and by an important homozygosity at the individual level (Bonnin et al., 1996).

Pod size (LP, WP,), WTP, seed size (WS, SP, LS), WTS, seedling traits (LFL, BFL and AFL) participated strongly to the discrimination of all accessions into six separate groups since this clustering inconsistent with eco-geographic location of access. The significance of these traits is demonstrated by their high burdens in the first principal component. LFL, BFL and AFL displayed a relative correlation between them, similar results were found by Bonnin et al. (1996) when analyzing *M. truncatula* population structure by quantitative genetic markers.

Concerning the relationship between biometric characters and climatic factors the ACP mark a certain ecological correlation, in fact it reveal a positive correlation between rainfall and minimum temperature with the majority of biometric factors and negatively with altitude and TM. Badri et al. (2007), has shown a correlation between quantitative traits and eco-geographical factors. This result of the correlations between quantitative characteristics and environmental factors is logical due to the different location of the heterogeneous selection. Since, much study in *Medicago* L, showed positive correlation between morphological traits and climatic factors (Abdelguerfi and Laouar, 1999; Al-Faifi et al., 2013; Zivkovic et al., 2012).

The ability to observe allelic variation at isozyme loci has revolutionized research in the fields of biochemical genetics (Weeden and Wendel, 1990). As result of this investigation, a high genetic variability occurring within *M.truncatula* accessions for EST and GOT enzymatic systems. Whence, a total of 12 alleles and 19 isozyme phenotypes were recorded based on the two enzymes. Whereas, EST isozyme analysis resulted highest variability (three loci with 17 types and 9 alleles) than GOT; which was more conservative (two loci and three alleles attributed to 2 phenotypes). EST is thus considered to be the most appropriate enzyme system for assessing genetic variability. According to Weeden and Wendel (1990), EST is one of the enzymatic systems with a high polymorphism in plants.



On the other hand Comparative analysis of seed protein profiles was a powerful tool for specie identification, clarification of classification and evolution problems, and study of genetic diversity (Ladysynski and Himowitz, 1979). Several researchers examined the usefulness of the seed protein file for classification and evolutionary purposes (Boulter et al. 1966). Boulter, Thorman and Turner (1966) highlighted the advantages of electroacrylamide gel to separate plant protein. The SDS-PAGE method is a suitable technique for distinguishing varieties and is successfully used in the assessment of genetic diversity (Amouri et al. 2014).

The protein label SDS-PAGE (albumin and globulin) showed intra-specific heterogeneity, with 24 and 27 bands of albumin and globulin, respectively. The frequency range of these bands (0-100%) reflects the enormous diversity within the specie. This is due to the fact that these populations do not live in the same climate and therefore have different conditions. Similarly, protein formation can be dependent on Mahnane's climate genetic and agricultural factors (Mahnane, 2009).

However, the features of protein in the different genotypes of *M. truncatula* show that there are quantitative and qualitative differences (Ladizinsky and Hymowitz, 1979), which is very stable and sometimes species-specific (Boulter et al., 1967; Johnson et al., 1965). These same authors, showed a variation in the number, location and intensity of bands in the entry of *M. truncatula*, and so we could say that these bands are controlled by a quantum genetic system. Nevertheless, we found a certain degree of similarity between some types of *M. truncatula* joined. This indicates that despite environmental and genetic differences, the features of the protein were very similar (Le Signor et al., 2005). This is what Osborne (1924) showed that similar proteins are found only in seeds closely related from a plant point of view.

Technological advances in recent years have provided a large number of molecular methods and markers for basic and applied biology. The SSR method "simple sequence replication" or micro-satellites have proven to be very useful in marking, genetic diversity analysis and population genetics analysis in many species (Gupta 2000; Budak et al., 2003). SSRs have been significantly developed in *M. truncatula* and *Lotus japonicus*, two typical types of pulses. In the *Medicago* six programmers, the number of micro-satellite markers available exceeds 1 000 (Diwan et al., 2000; Baquerizo-Audiot et al., 2001; Eujayl et al., 2004; Cho et al., 2009).



Molecular marking techniques have the ability to study various accessions with distinction. The large number of alleles also facilitates population studies. By examining a basic range of Algerian species with two micro-satellite sites, we revealed a significant genetic difference in *Medicago truncatula* types. SSR genotype data for 25 accessions (genetic profiles) belonging to *M. truncatula* were analyzed two (AFctt1 and AFct32) of the five SSR marks resulting in a total of 18 fragments, with 10 bands and 8 bands for AFctt1 and AFct32, respectively. This result was therefore expected given the power of micro-satellite markers to show high mutation rates, which generally reveal fairly high amounts of multiple shapes, especially when used at the species level (Ronfort et al., 2006). In contrast to our results, only one allele per plant was observed using the same SSR site in annual medics (Falahati Anbaran et al., 2006). This is not surprising since annual *Medicago* species are self-fertilizing and it is known that self-fertilization decreases gene flow and consequently increases local differentiation between populations (Charlesworth, 2003).

Interesting information in intraspecific variability on the accessions of *M. truncatula* is obtained with dendrogram based on Jaccard's index generated from every marker binary data matrix. The mean Jaccard's indices; ranged from 0.00 and 0.70 with an average of 0.29 for isozyme markers; varied from 0.05 to 0.62 with an average of 0.32 for albumin, and between 0.00 and 0.50 with an average of 0.23 for globulin; Also, ranged from 0.00 to 0.714 with an average of 0,375 for SSR markers. This wide range of similarity indices confirmed the high degree of diversity among these populations at all these levels.

As we can mention, combining different accessions according to multiple albumin formats highlighted a relative relationship with their geographic environmental origins. In contrast, the other markers based subdivision was not clearly associated with geographical environmental assets to join. Similar results were found by Haddioui (2012) In Morocco *M. truncatula* genotypes, noted that populations did not cluster on the basis of eco-geographic location (Haddioui et al., 2012).

This high genetic variability in *M. truncatula* accessions is justified by the autogamy of this specie; in fact, this result is consistent with many studies of *Medicago* populations (Bullitta et al., 1994; Chandra et al., 2011; Cherifi, 1996; Haddioui et al., 2012; Jenczewski et al., 1999a, 1999b).

In conclusion, the Algerian *M. truncatula* studied revealed a considerable genetic diversity at morphological, biochemical and molecular levels. This can allow a better understanding of

the evolution of these characteristics in this specie. In addition, may be a good genetic source for other improvement programs.

## References

1. Abdelguerfi A, Laouar M (1999). Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral: possibilités de valorisation en région Méditerranéenne.[Autecology and variability of some legumes of fodder and/or pastoral interest: valorization possibilities in Mediterranean region]. *Pastagens e Forragens* 20:81-112.
2. Al-Faifi SA, Migdadi HM, Al-Doss A, Ammar MH, El-Harty EH, Khan MA, Muhammad JM, Alghamdi SS (2013). Morphological and molecular genetic variability analyses of Saudi lucerne (*Medicago sativa* L.) landraces. *Crop & Pasture Science* 64:137-146.
3. Amouri AA, Fyad Lamèche FZ, Yahia N (2014). Genetic diversity of seed storage protein in *Medicago truncatula* genotypes in relation with salt stress tolerance. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7 (2): 55-59.
4. BADRI M., ILAHI H., HUGUET T., AOUANI M.E. (2007). Quantitative and molecular genetic variation in sympatric populations of *Medicago laciniata* and *M. truncatula* (Fabaceae): relationships with eco-geographical factors. *Genet. Res. Camb.* 89: 107-122.
5. Bendiab K, Baaziz M, Brakez Z, Sedra MyH (1993). Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. *Euphytica* 65:23-32.
6. Bonnin I, Prospero JM, Olivieri I (1996). Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. *Genetics* 143:1795-1805.
7. Bonnin, I., Huguet, T., Gherardi, M., Prospero, J. M., & Olivieri, I. (1996). High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany*, 83(7), 843-855.
8. Boulter D, Thurman DA, Derbyshire E (1967). A Disc Electrophoresis Study Of Globulin Proteins Of Legume Seeds With Reference To Their Systematics. *New Phytologists*, 66: 27–36.

9. Boulter D, Thurman DA, Turner BL (1966). The Use Of Disc Electrophoresis Of Plant Proteins in Systematics. *Taxon*, 15: 135.
10. Bullitta S, Floris R, Hayward MD, Loi A, Porqued du C, Veronesi F (1994). Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. *Euphytica* 77:263-268.
11. Chandra A, Verma S, Pandey KC (2011). Genetic similarity based on isozyme banding pattern among fifty species of *Medicago* representing eight sections (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 39:711-717.
12. Charlesworth, D., 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philos.T. Roy. Soc. B.* 358, 1051-1570.
13. Cherifi K (1996). Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill. [Enzymatic polymorphism of some natural populations of *Medicago ciliaris* (L.) Krock and *Medicago intertexta* (L.) Mill]. *Acta Botanica Gallica* 143:155- 165.
14. Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12 (1), 13-15.
15. El Hansali M, Zinelabidine LH, Haddioui A (2007). Variabilité des caractères morphologiques des populations naturelles de *Medicago truncatula* Gaertn. au Maroc.[Morphological characters variability of some natural populations of *Medicago truncatula* Gaertn. in Morocco]. *Acta Botanica Gallic* 154:643-649.
16. Falahati-Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfahany, M., Mohammadi, S.A., Ghareyazie, B( 2006).Study of genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid annual medics using microsatellite markers. *J. Sci. Tech. Agri. Nat. Res.*10, 349-358.
17. Freitas, R.L., R.B. Ferreira and A.R. Teixeira (2000). Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyze structural comparisons within the major classes of globulins. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 51: 341-352.
18. Gupta, P.K., Varshney, R.K (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. 113,163-185.
19. Haddioui A, Zinelabidine LH, Nouri M, Ajal EA, El Hansali M, Hanine H (2012). Genetic diversity of natural populations o *Medicago truncatula* in Morocco using isozyme polymorphism. *World Journal of Agricultural Sciences* 8:13- 19.
20. Heyn CC (1963). *The Annual Species of Medicago*. Magnes Press, Jerusalem.

21. Issolah R, Abdelguerfi A (1999). Variability within 31 spontaneous populations of *Trifolium scabrum* L., nature of relations with factors of the site of origin. In: Etienne M (Ed). 94 IX Meeting of the Fao-Ciheam Sub-Network on Mediterranean Pastures and Fodder Crops. Ciheam-Iamz, Badajoz pp 123-127.
22. Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J (1999a). Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *American Journal of Botany* 86:677-687.
23. Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J (1999b). Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Molecular Ecology* 8:1317-1330.
24. Ladizinsky G, Hymowitz T (1979). Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54: 145–151.
25. Lesins KA, Lesins I (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae). A Taxogenetic Study. The Hague, London.
26. Mahnane W (2009). Appréciation De La Diversité Génétique Du Genre *Rétama* Par Les Marqueurs Biochimiques. Mémoire En Vue De L'obtention Du Diplôme De Magistère. Université Mentouri Constantine.
27. Malaviya DR, Roy AK, Kaushal P, Kumar B, Tiwari A (2008). Genetic similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding pattern. *Plant Systematics and Evolution*, 276(1-2):125-136
28. Osborne, T.B (1924). The vegetable proteins. Longmans. Green & Co, London. pp. 1-156.
29. Ping Li1, Yunwen Wang, Xiaolong Sun, Jianguo Han (2009), Using microsatellite (SSR) and morphological markers to assess the genetic diversity of 12 *falcata* (*Medicago sativa* spp. *falcata*) populations from Eurasia, *Journal of Biotechnology* 2102-2108.
30. Quezel P, Santa S (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. [New flora of Algeria and the southern desert regions]. CNRS, Paris.
31. Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M (2006). Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 6, 28.

32. Signor C, Gallardo K, Prosperi J M, Salon C, Quillien L, Thompson R, Duc G (2005). Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. *Plant Genetic Resources*, 3(1): 59–71.
33. Singh, N.K., K.W. Shepherd and G.B. Cornish(1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 14: 203-208.
34. Small E (2010). *Alfalfa and relatives: Evolution and classification of Medicago*. NRC Research Press, Canada.
35. Small E, Jomphe M (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67:3260-3294.
36. Smith J.S.C. Smith O.S (1989) The description and assessment of distances between inbred lines of maize: II The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica*, 34:151\_161.
37. Weeden NF, Wendel JF (1990). Genetics of plant isozymes, In: Soltis DE, Soltis PE (Eds). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland pp 46-72.
38. Zivkovic B, Radovic J, Sokolovic D, Xiler B, Banjanac T, Strbanovic R (2012). Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. *Industrial Crops and Products* 40:285-291.



*Synthèse  
et  
Conclusion générale*

Rappelons que la démarche entreprise repose sur plusieurs approches morphologiques, enzymatiques, protéiques et moléculaires pour mieux comprendre la diversité génétique au sein des populations naturelles de *Medicago truncatula*.

Cette synthèse aborde les caractéristiques des populations, leur différenciation génétique, les relations entre accessions et la corrélation entre les différents marqueurs utilisés pour 29 accessions de *M. truncatula*.

La population échantillonnée correspond à 29 accessions appartenant à l'espèce *M. truncatula*, collectées sur 29 sites écogéographiques différents dans le nord de l'Algérie. Cette série couvre un large éventail d'étages bioclimatiques, d'humide à sec, et connaît diverses limitations abiotiques.

Un total de 24 accessions de *M. truncatula* ont été évaluées morphométriquement à l'aide d'un comparateur à cadran avec une précision de 0,01 mm. Pour chaque accession, 12 caractères quantitatifs liés aux graines, aux gousses et aux cotylédons ont été analysés : taille des gousses, taille et poids des graines à 1000 graines (WTS) et rapport poids des graines sur poids des gousses (RW). Cette étude a montré des différences relatives entre les paramètres biométriques sous l'influence de facteurs environnementaux et climatiques, et a permis d'identifier les critères morphologiques les plus discriminants. En effet, la plupart de ces caractères ont participé fortement à la discrimination de toutes les accessions dans six groupes distincts. Ce regroupement s'est avéré incompatible avec l'emplacement éco-géographique des accessions.

Sur la base des résultats obtenus (tableau 3), la surface de la première feuille (AFL) est la plus variable avec une moyenne de 23,70 m<sup>2</sup> et un facteur de variation égal à 58,38%. Suivie par SP avec une moyenne de 5,47 et un facteur de variation de 2,31%. Quant au poids de mille graines (WTS) oscillaient entre 2 g et 5 g.

Les traits utilisés en biométrie sont de nature polygénique et impliquent des niveaux phénotypiques complexes qui peuvent être influencés par l'environnement ainsi que sélectionnés. Ainsi, les caractères biologiques, surtout s'ils sont peu nombreux et ne concernent que peu d'aspects du développement, comme c'est le cas ici, peuvent fournir des indications sur la diversité du milieu colonisateur et les pressions de sélection subies par les espèces étudiées.

L'approche enzymatique a montré une grande diversité génétique au sein de l'espèce *M. truncatula*. Les deux systèmes enzymatiques EST et GOT étudiés ont généré 12 bandes et 19 phénotypes. Les estérases ont révélé 9 bandes réparties à travers trois loci produisant 17 phénotypes. Par conséquent, ce système enzymatique s'est avéré plus polymorphe que la glutamate oxaloacétate transaminase avec 3 bandes, réparties en 2 loci produisant 2 phénotypes. La grande variabilité des estérases par rapport aux autres systèmes enzymatiques a été confirmée dans plusieurs recherches (Lange et SchifinoWittmann 2000; Malaviya et al. 2005). Au niveau des protéines, un nombre élevé de bandes a été enregistré pour les albumines (24 bandes) et les globulines (27 bandes).

L'importance de la diversité interspécifique par les marqueurs enzymatiques et protéiques a été démontrée par la topologie des dendrogrammes issues de chaque marqueur. Les coefficients de la distance génétique sont basés sur la variation enzymatique, varient entre 0.00 et 0.70 avec une moyenne de 0.29.

Quant aux protéines, les coefficients de Jaccard s'étendent de 0.05 et 0.62 avec une valeur moyenne  $d = 0.32$  pour les albumines et de 0.00 et 0.50 avec une moyenne de 0.23 pour les globulines. Dans le cadre de cette étude, nous avons constaté un certain degré de similitude entre certaines accessions de *M. truncatula*. Des études antérieures au niveau intrinsèque ont également révélé que, malgré les différences écologiques et génétiques, les caractéristiques de la protéine sont très semblables (Le Signor et al. 2005).

En ce qui concerne les microsatellites, les deux amorces analysées (AFctt1 et AFct32) ont permis d'identifier une grande diversité génétique. Un total de 18 bandes allant de 17 à 187bp a été recensé, avec 10 et 8 bandes pour AFctt1 et AFct32, respectivement. Ce résultat était prévisible vu le taux élevé de mutations qui caractérise les marqueurs microsatellites, ce qui généralement révèle un assez grand polymorphisme (Ronfort et al. 2006). L'importance des marqueurs moléculaires a été démontrée par la topologie du dendrogramme. Les coefficients de dissimilarité de Jaccard variaient de 0.00 à 0.714 avec une moyenne de 0.375.

### **Conclusion**

Ce travail de caractérisation génétique n'est pas une fin en soi. Il n'est qu'un début et complément pour des recherches qui vont dans le sens de la valorisation des ressources génétiques des espèces appartenant aux genres *Medicago*. Des études complémentaires



basées sur d'autres marqueurs (cytogénétiques, morphologiques, moléculaires,...) seront intéressantes pour enrichir ce travail.

Les données fournies par les marqueurs utilisés dans cette étude sont parfois contradictoires. Il serait nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de caractères de chaque marqueur et de les appliquer à un plus grand nombre d'accessions, afin d'avoir des précisions sur les relations évolutives de ces dernières.



*ANNEXES*



**ANNEXE 2. Caractères morphologiques et des paramètres écologiques des populations de *M. truncatula*.**

N	Accessions	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LFL	BFL	AFL	Alt	Pm	Tm	TM	Q2
1	Mt1	5,68	6,83	1,86	4	3,41	1,76	4,04	2,03	1	6,01	2,81	16,89	795	454	1,9	31,7	52,26
2	Mt2	5,35	5,90	1,46	5	3,53	1,78	3,76	2,58	1	7,54	2,43	18,32	1010	492	0,4	30,8	55,51
3	Mt3	3,83	5,27	0,85	4	2,82	1,51	2,18	2,56	1	6,76	3,21	21,70	883	462	0,4	31,3	51,28
4	Mt5	6,25	6,35	2,15	6	3,48	1,81	4,56	2,12	2	9,02	3,96	35,72	257	593	6	33,5	73,96
5	Mt6	5,50	6,69	1,81	6	3,32	1,93	3,71	2,05	2	6,08	2,68	16,29	537	506	0,2	30,9	56,53
6	Mt8	4,88	5,53	1,26	1	2,80	1,44	3,19	2,53	1	5,19	2,35	12,20	850	558	3	32,2	65,55
7	Mt9	6,38	6,54	2,73	5	3,68	1,83	4,96	1,82	3	7,34	2,86	20,99	429	704	3,2	31,4	85,63
8	Mt10	5,41	6,02	2,06	4	3,25	1,63	3,26	1,58	1	8,40	3,22	27,05	757	568	2,5	31,3	67,65
9	Mt11	5,47	5,66	2,20	5	3,39	1,77	3,98	1,81	1	7,38	2,67	19,70	831	742	4,4	31,1	95,32
10	Mt12	7,86	7,72	4,21	9	3,55	1,96	4,99	1,19	1	8,19	3,82	31,29	3	670	7,6	29,8	103,52
11	Mt13	7,02	7,27	3,33	7	3,61	1,85	4,78	1,44	3	8,64	3,47	29,98	172	762	6,9	28,4	121,57
12	Mt14	4,76	5,17	1,50	5	3,08	1,62	3,34	2,23	1	7,31	3,81	27,85	1022	482	1	31,3	54,56
13	Mt15	4,84	5,13	1,45	6	3,24	1,66	3,80	2,62	1	6,58	2,76	18,16	1089	473	0,3	31,7	51,67
14	Mt16	5,67	5,41	2,01	4	3,27	1,68	4,27	2,12	2	5,73	2,79	15,99	997	495	0,2	31,1	54,95
15	Mt17	5,47	5,67	1,75	5	3,24	1,65	3,68	2,10	2	7,01	2,12	14,86	907	368	1,6	33,4	39,69
16	Mt18	7,48	6,64	4,84	5	4,04	1,99	5,66	1,17	2	7,91	3,55	28,08	504	409	3,1	32,6	47,55
17	Mt20	6,54	7,46	4,95	6	3,70	2,03	5,29	1,07	2	8,04	3,03	24,36	196	626	8,4	30,1	98,95
18	Mt21	6,89	7,39	2,73	6	3,75	2,03	4,94	1,81	2	9,06	3,74	33,88	385	736	2,5	30,6	89,84
19	Mt22	7,64	8,98	4,79	8	3,80	2,06	5,02	1,05	2	7,98	3,26	26,01	575	609	1,1	30,1	72,03
20	Mt23	8,23	10,23	5,54	6	4,14	2,14	6,53	1,18	2	10,17	4,00	40,68	281	368	7,5	29	58,71
21	Mt24	5,75	5,49	1,69	5	3,34	1,61	3,90	2,31	2	6,27	2,61	16,36	946	335	0,7	32,6	36,02
22	Mt25	8,55	8,21	5,52	7	3,79	1,97	5,11	0,93	1	10,58	3,07	32,48	70	791	7	30,9	113,52
23	Mt26	7,32	7,52	3,47	6	3,68	1,97	4,52	1,30	3	6,53	2,38	15,54	135	405	6,6	32,6	53,43
24	Mt27	6,77	6,44	2,20	6	3,31	1,68	3,91	1,78	1	7,48	3,23	24,16	798	564	1,9	32,1	64,06





**ANNEXE 5. Révélation des enzymes**

D'après Bendiab et al. 1993

Estérases (EST). E.C. 3.1.1.

- 0.03 g  $\alpha$ -Naphthylacétate (se dissout dans l'acétone à 50%)
- 100 ml (q.s.p) de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2

Incuber 15 minutes à 37°C.

- Rincer le gel deux fois avec de l'eau courante

Incuber 20 min dans la solution de coloration :

- 0.14 g Fast Blue RR salt
- 25 ml de tampon Tris-HCl pH 7,2
- 100 ml (q.s.p) H<sub>2</sub>O.

Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT) = Aspartate aminotransferase (AAT).

E.C. 2.6.1.1

- 0.25 g Acide -L- Aspartique
- 0.1 g Acide alpha-cétoglutarique
- 50 ml de tampon Tris-Hcl 0,5 M, pH 7,2
- 100 ml (q.s.p) H<sub>2</sub>O

Incuber 15 min à 37°C puis rincer avec de l'eau courante et rajouter la solution de coloration :

- 0.2 g Fast Blue BB
- 25 ml de tampon Tris-Hcl 0,5M, pH 7,2
- 100 ml (q.s.p) H<sub>2</sub>O

Incuber à 37 °C jusqu'à l'apparition des bandes.

**ANNEXE 6. Séparation des albumines et des globulines par SDS-PAGE**

Solutions pour la préparation des gels

Tampon Tris-HCl pH : 8,8 (Conserver à 4°C)

- Tris 60.57 g
- Eau distillé ~ 400 mL
- Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant ~ 8 à 10 mL
- Eau distillée Qsp 500 mL

Tampon Tris-HCl pH : 6,8 (Conserver à 4°C.)

- Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 30.285 g
- Eau distillée ~200 mL
- Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant ~ 19,5 mL
- Eau distillée Qsp 250 mL

Solution stock de SDS à 10% Stocker à température ambiante

- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1 g
- Eau distillée Qsp 10 mL

Solution d'ammonium persulfate (APS) à 1% (A préparer le jour même)

- APS (stocké au frigo) 0,2 g
- Eau distillée Qsp 20 mL

**Gel de séparation** (migration= running gel) à 12,52%

- Acrylamide 40% 12.4 mL
- Bisacrylamide 2% 2.4 mL
- Eau permutée 8.6 mL
- Tampon Tris-HCL pH 8.8 15.2 mL



- SDS 10% 0.4 mL
- APS 1% 1 mL
- TEMED 0.02 mL
- Volume total 40 mL

**Gel de concentration** (stacking gel) à 5%

- Acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8) 0.5 mL
- Eau permutée 3.25 mL
- Tampon Tris-HCL pH 6.8 1.25 mL
- SDS 10% 0.14 mL
- APS 20% 25 µL
- TEMED 4 µL

**Tampon d'électrophorèse** (Stocker à température ambiante)

- |                 |         |
|-----------------|---------|
| - Glycine       | 70.55 g |
| - Tris          | 15 g    |
| - SDS           | 5 g     |
| - Eau distillée | Qsp 5 L |

Le tampon des cuves doit être renouvelé lorsque le voltage dépasse 500V en fin de migration (environ 20 utilisations), prévoir 4 litres par cuve. Prévoir 1 litre pour le bac supérieur à chaque électrophorèse

**Solution de coloration** (pour les gels monodimensionnels), à préparer le jour même

- |   |            |
|---|------------|
| - TCA                                     | 30 g       |
| - Solution mère de Bleu de Coomassie R250 | 12.5 mL    |
| - Eau distillée                           | Qsp 250 mL |

Bien mettre en agitation avant utilisation

**Solution mère de Bleu de Coomassie R250**

- |                          |      |
|--------------------------|------|
| - Bleu de Coomassie R250 | 10 g |
|--------------------------|------|

- Ethanol 95°

Qsp 1 L

Laisser en agitation au moins 2 heures. Filtrer cette solution avec un filtre plissé n°3.

**Attention :** mettre en premier l'alcool dans le bêcher avec un barreau aimanté en agitation, puis mettre le bleu de Coomassie dans le bêcher en agitation (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant).

**ANNEXE 7. Protocole de germination**

- Mettre les grains dans 5 volumes de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), concentré pendant 8 min avec une agitation intermittente.
- Mettre les grains dans 5 volumes de 5% de sodium hypochlorite pendant 3 min - Décanter l'eau de javel sous des conditions stériles (haute à flux laminaire).
- Rincer les grains par de l'eau distillée stérile 6 à 8 fois.
- incuber les graines pendant 1 heure dans le dernier rinçage.
- une fois gonflée, elles sont déplacé sur du milieu agar (7g/l) (6.7% d'agar) et incubé à 4°C pendant 3jours, puis à 14°C pendant 24 heures à l'abri de la lumière.

*ANNEXE 8. Extraction de l'ADN*

D'après la méthode de Doyle et Doyle 1990.

- Préchauffer le tampon CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol dans un bain marie à 65 °C.
- Broyer le matériel végétal (environ 150 mg) dans un mortier avec l'azote liquide (manipuler avec les gants)
- A l'aide de spatule, transférer le broyat dans un tube à vis (mettez les tubes contenant le broyat dans l'azote liquide, bien fermer les tubes)
- Ajouter 900 µL de tampon CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol préchauffé à 65 °C.
- Homogénéiser au vortex et incuber 60 min dans un bain marie à 65 °C avec agitation.
- Centrifuger 15 min à 10 000 rpm à 4 °C.
- Récupérer le surnageant (≈ 800 µL) dans un nouveau tube d'ependorf de 2 mL (stocker le culot à 4 °C à l'abri de la lumière).
- Ajouter 800 µL (1 vol) chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)
- Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites).
- Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse supérieur à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf. (Éviter de prendre la couche blanche au milieu).

Pour un meilleur résultat, répéter cette la dernière étape :

- Ajouter 800 µL (1 vol) chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1). Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites). Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C. Récupérer la phase aqueuse supérieur à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf.
- Ajouter 3 à 5 µl de RNase A (10 mg/ml), agiter par inversion et incuber 30 min à 37 °C.

- Ajouter 540  $\mu$ l (2/3 Vol) d'Isopropanol froid (-20°C)
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche.
- Laisser précipiter à -20 °C pendant 5 à 10 min.
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm à 4 °C.
- Eliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette)
- Ajouter 500  $\mu$ l de Solution de lavage 1.
- Incuber pendant 15 min à température ambiante.
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Eliminer le surnageant et ajouter 500  $\mu$ l de solution de lavage 2.
- Ne pas incuber plus de 5 min
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Eliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min.
- Suspender le culot d'ADN dans 100  $\mu$ l de TE 0.1X
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4 °C avant dosage.

#### Solutions et tampons

Tampon CTAB 2X (pH 8) (Stocker à température ambiante)

- CTAB 20 g 2 % (p/v)
- Tris de base 12.11 g 100 mM
- Na<sub>2</sub> EDTA 7.44 g 20 mM
- NaCl 81.8 g 1.4 M
- PVP 40 10 g 1 % (p/v)
- H<sub>2</sub>O up Qsp 1 L

- Commencer par dissoudre le CTAB à la chaleur (50°C) dans 800 ml d'eau up, puis ajouter dans l'ordre les autres produits. - Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl 1 M, puis compléter le volume à 1 litre. - Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.

Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1) Pour 25 ml : Ajouter 24 ml Chloroforme + 1 ml Alcool isoamylique

Tampon de dissolution d'ARNase

- Tris 0,12 g 10 mM
- NaCl 0,88 g 15 mM
- H<sub>2</sub>O up Qsp 1 L
- Mettre sous agitation dans 900 ml d'eau up.
- Ajuster le pH à 7.5 par addition d'HCl puis compléter au volume final avec l'eau ultra pure.
- Aliquoter en bouteilles et stériliser 20 min à 120°C. - Stocker à température du laboratoire.

RNAse A (10 mg/ml)

- Dissoudre 100 mg de RNAse A dans 10 ml de ce tampon de dissolution.
- Aliquoter en tubes vissables de 2 ml
- Traiter 15 min à 100 °C au bain marie
- Laisser refroidir à température du laboratoire - Stocker au congélateur à -20 °C.

Solution Lavage 1

- Acétate de Sodium 1.6 g 200 mM
- Eau distillée 24 mL
- Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol
- Ethanol 100 % Qsp 100 mL

TE 1X (pH 8)

- Tris de base 0.12 g 10 mM
- Na<sub>2</sub> EDTA 0.04 g 1 mM
- H<sub>2</sub>O up Qsp 100 ml
- Ajouter de l'H<sub>2</sub>O up jusqu'à 90 % du volume
- Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl fumant.
- Compléter le volume.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120 °C.

Stocker à température ambiante.

Les concentrations mentionnées correspondent aux concentrations finales. Remplir une fiche solution en notant toutes les informations disponibles. Noter date, nom du produit et numéro du lot de la solution sur le flacon.

***ANNEXE 9. CONTROLE DE QUALITE « Electrophorèse sur gel d'agarose »***

- Préparer un gel d'agarose 0.8% dans du TBE 1X
- Déposer 5  $\mu$ L (soit 500 ng) de chaque échantillon
- Faire migrer l'ADN 15 min. à 100V
- Colorer le gel d'agarose 10 min. dans une solution BET à 2  $\mu$ g/mL

Attention : le BET est un mélange puissant, respecter les consignes de sécurité et travailler avec des gants

- Prendre une photo du gel sous UV

Attention : les UV peuvent causer des brûlures graves, respecter les consignes de sécurité



**ANNEXE 10. Protocole expérimental pour l'analyse de l'ADN par SSR**

Préparer le mélange réactionnel (ou « Mix ») comme suit :

- Eau pure stérile 6.5  $\mu$ L
- Tampon 10X 3  $\mu$ L
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM 1.2  $\mu$ L
- dNTP mix 10 mM 2.4  $\mu$ L
- Amorces (sens et anti-sens) 10  $\mu$ M 1.8  $\mu$ L
- Taq (2.5 U) 0.3  $\mu$ L
- ADN (50 ng/ $\mu$ L) 3  $\mu$ L

Volume finale 20  $\mu$ L

Réaliser l'amplification selon le programme suivant :

Etape	Température °C	Temps	Nombre decycles
Dénaturation initiale	95	5 min.	1
Dénaturation	94	45 s	35
Hybridation	55	45 s	
Elongation	72	1 min.	
Elongation finale	72	10 min.	1

**Gel de Polyacrylamide à 8%**

- Acrylamide-bisacrylamide (29 :1) 3.2 mL
- Tampon TBE 5X 2.4 mL
- Eau distillée 6.4 mL
- APS (10%) 200  $\mu$ L
- TEMED 10  $\mu$ L

**Tampon TBE 10X**

- Tris 108 g
- Borate 55 g
- EDTANa<sub>2</sub> 7.44 g
- Eau distillée Qsp 1 L

**Tampon de migration**

- TBE 0.5X

**Solution de révélation**

- BET (2mg/mL) 100 µL
- Eau distillée 100 mL

**ATTENTION :** Le bromure d'éthidium (BET) est dangereux par contact, inhalation et ingestion (agent mutagène), porter des gants doubles en latex ou des gants simples en nitrile.

# *Résumés*

## Résumé

Cette étude a été réalisée pour identifier les similarités et les différences entre 29 accessions de l'espèce *Medicago truncatula*, qui ont été collectées dans différents sites éco-géographiques représentatifs du Nord Algérien, en utilisant des marqueurs morphologiques, protéiques, enzymatiques et moléculaires. Pour l'analyse morphologique, des analyses en composantes principales (PCA) ont été réalisées à travers 12 caractères biométriques, la majorité de ces caractères contribuent à la discrimination des accessions étudiées et présentent une forte diversité génétique entre les populations étudiées et montrent une certaine corrélation éco-géographique. Pour l'analyse biochimique, la variabilité des deux systèmes enzymatiques EST et GOT et des fractions d'albumines et de globulines a été analysée par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'évaluation montre que l'analyse des isozymes EST a donné lieu à la plus grande variabilité (trois loci avec 17 types et 9 bandes) que GOT (deux loci et trois bandes attribuées à 2 phénotypes). D'autre part, les résultats ont démontré une grande variabilité des protéines d'albumine et de globuline dans cette espèce, avec 24 et 27 bandes ont été détectées pour les deux fractions respectivement. En ce qui concerne les microsatellites, une forte variation enregistrée pour les deux amorces analysées (AFctt1 et AFct32), produit 18 fragments allant de 10 et 8 bandes pour AFctt1 et AFct32 respectivement. Les dendrogrammes basés sur l'indice de Jaccard ont montré des larges gammes d'indices de similarité pour les différents marqueurs analysés, ce qui confirme le haut degré de diversité entre ces accessions. En revanche, une faible association avec l'origine géographique des accessions a été observée. Les résultats montrent qu'il existe une diversité génétique entre les populations de *M. truncatula* en Algérie. La détermination de cette différence est attribuée aux marques utilisées.

**Mots clés :** *Medicago truncatula*, diversité génétique, traits morphologiques, protéines, isozymes, marqueurs moléculaire.

### Abstract

This study was carried out to identify similarities and differences between 29 accessions of the species *Medicago truncatula*, which were collected in different eco-geographic sites representative of the Algerian North, using morphological, protein, enzymatic and molecular markers. For the morphological analysis, principal component analyses (PCA) were carried out through 12 biometric characters, the majority of these characters contribute to the discrimination of the studied accessions and present a strong genetic diversity between the studied populations and show a certain eco-geographical correlation. For the biochemical analysis, the variability of the two enzyme systems EST and GOT and of the albumin and globulin fractions was analyzed by the polyacrylamide gel electrophoresis technique. The evaluation shows that the analysis of EST isozymes gave rise to the greatest variability (three loci with 17 types and 9 bands) than GOT (two loci and three bands attributed to 2 phenotypes), On the other hand, the results showed a great variability of albumin and globulin proteins in this specie, with 24 and 27 bands were detected for the two fractions respectively. Regarding microsatellites, a strong variation recorded for the two primers analyzed (AFctt1 and AFct32), producing 18 fragments ranging from 10 and 8 bands for AFctt1 and AFct32 respectively. Dendrograms based on Jaccard's index showed wide ranges of similarity indices for the different markers analyzed, confirming the high degree of diversity among these accessions. On the other hand, a weak association with the geographical origin of the accessions was observed. The results show that there is a genetic diversity between the populations of *M. truncatula* in Algeria. The determination of this difference is attributed to the marks used.

**Keywords:** *Medicago truncatula*, genetic diversity, Morphological traits, Proteins, isozymes, Molecular markers.

## ملخص

أجريت هذه الدراسة لتحديد أوجه التشابه والاختلاف بين 29 انضمام *M. truncatula* . التي جمعت في شمال الجزائر باستخدام العلامات المورفولوجية؛ البروتينات؛ الأنزيمات و الجزيئات. بالنسبة للتحليل المورفولوجي، أجريت تحليلات المكونات الرئيسية (ACP) من خلال 12 خاصية بيومترية، تساهم غالبية هذه الخصائص في التمييز بين الانضمامات التي تمت دراستها وتشكل تنوعا وراثيا عاليا بين المجموعات المدروسة وتظهر بعض الارتباط الايكوجغرافي. لتحليل المواد الكيميائية الحيوية، تم تحليل تغير النظامين الهضمي (EST) والحواس وكسور الألبومين والغلوبيولين بواسطة تقنية الفصل الهلامي المتعدد الأكريلاميد، يوضح التقييم أن تحليل أيزوزيم (EST) أدى إلى أعلى درجة من التباين (ثلاثة مواقع بها 17 أنواع و 9 نطاقات) من GOT الذي حصل على (اثنان موقعان وثلاثة نطاقات تنسب إلى 2 طرز ظاهرية)، وقد أظهر dendrogramme استنادا إلى مؤشر Jaccard مجموعة واسعة من مؤشرات التشابه من 0.00 إلى 0.70 بمتوسط 0.29 التي أكدت الدرجة العالية من التنوع بين هذه المجموعات على مستوى أيزوجيمي وافترضت أنه لا علاقة بين التشابه الجيني والبعد الجغرافي لإنضمام *M. Truncatula*. ومن ناحية أخرى، أظهرت النتائج تقلبية عالية لبروتينات ألبومين والغلوبيولين في هذا النوع ، حيث تم اكتشاف 24 و 27 شريط للكسرين على التوالي. يتم تحديد التباين من خلال التصنيف الهرمي للانضمام، وهو ارتباط قوي بين تعدد الأشكال الناتج عن كسرين من البروتين (ألبومين و غلوبيلين)، ولوحظ وجود ارتباط ضعيف بالأصل الجغرافي للانضمامات. وفيما يتعلق ب Microsatellites ، يلاحظ وجود اختلاف كبير بين البادمين اللذين تم تحليلهما (AFct1 و AFct32)، ينتج 18 شريط تتراوح بين 10 و 8 أشرطة بالنسبة لAFct1 و AFct32 على التوالي. ويتم تفسير هذه النتيجة بارتفاع معدل الطفرات التي تميز مؤشرات Micro-satellite وتبين النتائج وجود تنوع جيني بين مجموعات *M truncatula* في الجزائر، وينسب تحديد هذا الفرق إلى العلامات المستخدمة.

**الكلمات المفتاحية:** التنوع الجيني، الصفات المورفولوجية، البروتينات، الإيزوزيمات، العلامات الجزيئية.

Année universitaire : 2021-2022

Nom : **MEBARKI**  
prénom: **RAYEN**

**MILES**  
**SARA**

Thème : **Diversité génétique chez *Medicago truncatula* par marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires**

Diplôme : Master en sciences biologiques spécialité Biochimie

### Résumé

Cette étude a été réalisée pour identifier les similarités et les différences entre 29 accessions de l'espèce *Medicago truncatula*, qui ont été collectées dans différents sites éco-géographiques représentatifs du Nord Algérien, en utilisant des marqueurs morphologiques, protéiques, enzymatiques et moléculaires. Pour l'analyse morphologique, des analyses en composantes principales (PCA) ont été réalisées à travers 12 caractères biométriques, la majorité de ces caractères contribuent à la discrimination des accessions étudiées et présentent une forte diversité génétique entre les populations étudiées et montrent une certaine corrélation éco-géographique. Pour l'analyse biochimique, la variabilité des deux systèmes enzymatiques EST et GOT et des fractions d'albumines et de globulines a été analysée par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'évaluation montre que l'analyse des isozymes EST a donné lieu à la plus grande variabilité (trois loci avec 17 types et 9 bandes) que GOT (deux loci et trois bandes attribuées à 2 phénotypes). D'autre part, les résultats ont démontré une grande variabilité des protéines d'albumine et de globuline dans cette espèce, avec 24 et 27 bandes ont été détectées pour les deux fractions respectivement. En ce qui concerne les microsatellites, une forte variation enregistrée pour les deux amorces analysées (AFctt1 et AFct32), produit 18 fragments allant de 10 et 8 bandes pour AFctt1 et AFct32 respectivement. Les dendrogrammes basés sur l'indice de Jaccard ont montré des larges gammes d'indices de similarité pour les différents marqueurs analysés, ce qui confirme le haut degré de diversité entre ces accessions. En revanche, une faible association avec l'origine géographique des accessions a été observée. Les résultats montrent qu'il existe une diversité génétique entre les populations de *M. truncatula* en Algérie. La détermination de cette différence est attribuée aux marques utilisées.

**Mots clés:** *Medicago truncatula*, diversité génétique, traits morphologiques, protéines, isozymes, marqueurs moléculaires.

**Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri – Constantine**

### Jury d'évaluation :

**Rapporteur:** Mme. MEDOUKALI Imane (MCB - UFM Constantine).

**Examineur 1 :** M. MOKRANI El Hassen (MCB- UFM Constantine).

**Examineur 2 :** Mme. TENIOU Soumia (MAA- UFM Constantine).