

## CARACTERISATION MOLECULAIRE DE QUELQUES ACCESSIONS AUTOCHTONES DE BLE DUR MOYENNANT LES MARQUEURS MICROSATELLITES

BABAY Elyes<sup>1,2</sup>, KHAMASSI Khalil<sup>3\*</sup>, ROUISSI Mustapha<sup>2</sup> et HANANA Mohsen<sup>4</sup>

1. National Gene Bank of Tunisia (BNG), Street Yesser Arafet, Charguia 1, Tunis 1080, Tunisia
2. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Agricultural Applied Biotechnology Laboratory (LR16INRAT06), University of Carthage, Rue Hédi Karray, Menzah 1, Tunis PC 1004, Tunisia
3. University of Carthage, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Field Crop Laboratory (LR16INRAT02), Rue Hédi Karray, PC 1004, Menzah 1, Tunis, Tunisia
4. Laboratory of Extremophile Plants, Center of Biotechnology of Borj-Cédria, B.P. 901, 2050, Hammam-lif, Tunisia

*Reçu le 15/06/2021, Révisé le 22/02/2022, Accepté le 16/04/2022*

### Résumé

**Description du sujet :** Ce travail a été réalisé dans le cadre de l'identification et la valorisation de ressources génétiques rapatriées et conservées à la Banque Nationale de Gènes de Tunisie à partir d'une collection qui date des années 80

**Objectifs :** Ce travail rentre dans un grand projet d'identifier une collection de base à partir d'une énorme collection initiale conservé en ex-situ. Dans ce travail nous avons analysé la diversité génétique de 12 variétés locales et anciennes de blé dur, cultivés en Tunisie.

**Méthodes :** Nous avons utilisé la technique de marquage moléculaire par les microsatellites (SSR) qui nous a permis d'établir le dendrogramme résumant les distances génétiques et les coefficients de similarité existant entre les accessions

**Résultats :** Huit amorces ont générées des profils polymorphes. Le dendrogramme de similarité obtenu nous a permis de dégager deux grands groupes A et B. la présence des variétés dans le même groupe est expliqué soit par leurs pédigrées, leurs caractères morphologiques ou leurs comportements physiologiques. Deux accessions différentes avec une forte ressemblance morphologique possèdent un Coefficient de similarité de 100%, donc grâce à la caractérisation moléculaire nous avons tranché qu'il s'agit de même génotypes conservés dans deux lots avec deux codes différents.

**Conclusion :** Cette analyse génétique donne une idée sur l'identité et la distance génétique entre les variétés et la sélection d'une collection de base ce qui facilite aux améliorateurs la mise en place d'un programme de croisement et d'amélioration génétique pour la création de nouvelles variétés mieux adaptés aux conditions climatiques

**Mots clés :** Blé dur, variétés locales, Diversité génétique, SSR, Dendrogramme de similarité

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME INDIGENOUS DURUM WHEAT ACCESSIONS USING MICROSATELLITE MARKERS

### Abstract

**Description of the subject:** This work was carried out within the framework of the identification and enhancement of genetic resources repatriated and conserved at the National Bank of Genes in Tunisia from a collection that dates back to the 80s.

**Objective:** This work is part of a major project to identify a core-collection from a huge initial collection conserved in ex-situ. In this work we analyzed the genetic diversity of 12 local and old varieties of durum wheat, cultivated in Tunisia.

**Methods:** We used microsatellites (SSR) molecular markers that allowed us to establish the phylogenetic dendrogram, summarizing the genetic distances and the coefficients of similarity existing between accessions.

**Results:** Eight primers generated polymorphic profiles. The similarity dendrogram obtained allowed us to identify two large groups A and B, The presence of varieties in the same group is explained by either their pedigrees, their morphological characters or their physiological behaviours. Two different accessions with a strong morphological resemblance have a Coefficient of Similarity of 100% were find, therefore with the molecular characterization we decided that they are the same genotypes conserved in two batches with two different code.

**Conclusion:** This genetic analysis gives us an idea of the identity and genetic distance between varieties and the selection of a basic collection, which makes it easier for breeders to set up a breeding and genetic improvement program to create new varieties better suited to climatic conditions.

**Keywords:** Durum wheat, autochthonous varieties, Genetic diversity, SSR, Dendrogram of similarity

\*Auteur correspondant : KHAMASSI Khalil, E-mail: khalilkhamassi@iresa.agrinet.tn

## INTRODUCTION

Les variétés améliorées de blé sont souvent assez similaires, car elles ont une base génétique relativement étroite. Par conséquent, l'utilisation de différentes sources de diversité dans les programmes de croisement est souvent relatée [1]. Les variétés anciennes, qui sont cultivées depuis des dizaines d'années et qui ont subies une combinaison d'une sélection naturelle et une autre sélection réalisée par les agriculteurs pour certains caractères utiles [2], peuvent contribuer de manière significative à l'amélioration de nouveaux cultivars et à élargir leur base génétique [3 et 4]. Ainsi, les variétés locales représentent une partie très précieuse du patrimoine génétique, car elles couvrent la plupart de la diversité génétique intra-spécifique de l'espèce [5]. Dans le bassin méditerranéen on récolte 75% de la production mondiale du blé dur (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) [1 et 6]. L'activité des améliorateurs de blé est concentrée sur la sélection des variétés ayant une production élevée, tolérantes aux stress biotiques et abiotiques et une qualité technologique recherchés par le consommateur. Les programmes de sélection dépendent de la connaissance des principaux caractères, du système qui contrôle leur héritage génétique et des facteurs environnementaux qui influencent leur expression. En Tunisie, les conditions pédoclimatiques les plus contraignantes et la potentialité du germoplasme à s'adapter à cet environnement, fait de la Tunisie une zone de grande richesse génétique du blé dur [7]. Plusieurs projets de recherche peuvent s'intéresser à l'exploitation de cette diversité génétique pour le développement des variétés mieux adaptées aux contraintes environnementales.

L'analyse de cette diversité génétique serait d'un apport considérable au cours des actions visant la sauvegarde, la conservation et la création variétale. Ainsi, la préservation de la diversité génétique du patrimoine pourrait servir aux sélectionneurs pour la création de variétés futures permettant ainsi d'échapper aux fluctuations de la production céréalière dues aux changements climatiques [8 et 9]. Les marqueurs moléculaires constituent un outil puissant et fiable pour mieux caractériser la diversité des ressources génétiques et de comprendre les différences et les similitudes qui existent entre les génotypes, au niveau de leurs gènes et de décrire la structuration de la variabilité génétique au sein des populations [5]. Dans ce cadre nous allons présenter, l'analyse de la diversité génétique de 12 accessions autochtones de blé dur cultivées en Tunisie depuis des dizaines d'années par le biais de marqueurs moléculaires de type SSR et d'établir le dendrogramme phylogénique pour avoir une idée sur la distance génétique qui les sépare. Ceci nous permet de faciliter la tâche aux sélectionneurs et aux améliorateurs pour la création des nouvelles variétés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel Végétal

Le matériel végétal étudié est le blé dur (*Triticum durum*). Onze accessions sont rapatriées de l'ICARDA (Centre international de recherche agricole dans les zones arides) et conservées à la Banque Nationale de Gènes (BNG) ont été semées dans des pots (Tableau 1). Ces accessions font partie d'une large collection conservée à la BNG.

Tableau 1: Listes des accessions de blé dur analysées

Nom d'accession	Code BNG	Code ICARDA	Information/pédigrée
Souri 428	NGBTUN 6475	IG 127580	Locale : décrite par Bœuf en 1907/1908
Kahla498	NGBTUN 6488	IG 127593	Locale (Barbe noir et ressemble à Jenah khotifa)
Adjini389	NGBTUN 6490	IG 127595	Proviennent de l'australie en 1893
Mahmoudi	NGBTUN 6499	IG 82018	Locale (il existe plusieurs génotypes de Mahmoudi)
Sbei	NGBTUN 6502	IG 82041	Locale : décrite par Bœuf en 1925
SyndyoukXMahmoudi	NGBTUN 6512	IG 82647	Syndyouk 272/Mahmoudi Ap4 ; (Lignée D52-24)
TaganrogAC1	NGBTUN 6557	IG 83197	Ancienne variété répertoriée dans les archives de l'INRAT
CHILI931	NGBTUN 6583	IG 86002	Introduit en Tunisie en 1932
TunsianDurum7	NGBTUN 6594	IG 91932	Archive de l'INRAT
Badri	NGBTUN 6997	IG 97870	Zenati/Bouteille//Mahmoudi/MraniD117 ; (D56-3A)
Amal-72	NGBTUN 7079	IG 97911	Beladi116E/2* Tehuacan60/3/Zenati/Bouteille//Wells/4/TremesMolleE/2* Tehuacan//3/Zenati/Bouteille//Wells

## 2. Extraction de l'ADN

Les génotypes ont été semés dans des pots pendant une dizaine de jours. Les jeunes feuilles de chaque accession ont été prélevées et déplacées dans une bombonne d'azote liquide afin d'éviter la dégradation d'ADN, ensuite lyophilisée. Un petit morceau de feuilles de chaque génotype est placé dans un tube eppendorf de 2 ml contenant des billes en céramique et broyé à l'aide du broyeur automatique. Dans chaque tube on a ajouté 0.8 ml de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 0,2%  $\beta$ -mercaptoéthanol). Les tubes ont été incubés à 65 °C pendant 45 minutes, avec des légères agitations par inversion toutes les 10 min. Après un repos de 5 min dans la température ambiante, on a ajouté dans chaque tube 450  $\mu$ L de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) puis on agite par inversion 10 min. Les échantillons ont été centrifugés pendant 15 min à 12000 rpm à température ambiante (20°C). Après, on a transféré le surnageant dans un nouveau tube auquel on a ajouté 20  $\mu$ L d'RNase (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) et incubé à 37°C pendant 30 minutes avant d'ajouter 450  $\mu$ L de chloroforme : alcool isoamylique (24:1) et procéder à la centrifugation (12000 rpm pendant 10 min à 20°C). Après, le surnageant est transféré dans un nouveau tube eppendorf. Un volume identique d'isopropanol est ajouté au surnageant pour précipiter l'ADN.

Centrifuger à 5000 tour par min pendant 10 minutes à 4°C pour précipiter l'ADN au fond de tube. Jeter le surnageant et laver le culot d'ADN avec 70% éthanol contenant 10 mM d'acétate d'ammonium. Continuer à agiter pendant 10-20 minutes à température ambiante. Centrifuger à 8000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Sécher le culot d'ADN et dissoudre dans 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Et enfin vérifier la concentration d'ADN par spectrophotomètre ou par gel d'agarose

## 3. Amplification des microsatellites (Simple Sequence Repeat : SSR)

L'analyse SSR pour chaque échantillon a été réalisée en utilisant 100 ng d'ADN. Onze paires d'amorces ont été utilisées pour étudier la diversité génétique de ces 11 accessions tunisiennes de blé dur, seulement 8 amorces ont donné des bandes claires et polymorphes. Un mélange réactionnel décrit dans le tableau 2 a été utilisé. L'amplification par PCR a été réalisée dans un thermocycleur (BIO-RAD, USA) selon un programme composé de 35 cycles (Tableau 3). Les produits PCR amplifiés par chaque amorce sont séparés selon leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel d'agarose 3%. Un marqueur de taille 1kb plus (1kb plus DNA Ladder) ou 100 pb est utilisé pour estimer la taille des amplicons après leurs séparations. La révélation est faite par excitation d'ultraviolet court moyennant un transilluminateur.

Tableau 2: Mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR

Composant	Concentration	Volume
ADN	50ng / $\mu$ l	2 $\mu$ l
Mango taq buffer	5 fois	0.2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0.8 $\mu$ l
DNTP	2mM	0.7 $\mu$ l
Amorces forward	2.5 mM	2.5 $\mu$ l
Amorces reverse	2.5 mM	2.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		qsp 25

Qsp : quantité suffisante pour

Tableau 3: Les étapes de la PCR

	95°C (3 min)		
	Dénaturation	Hybridation	Elongation
35 cycles	1min, 94°C	1,45 min, Ta°C	2 min, 72°C
Post élongation	72°C (10min)		

Ta : Température d'hybridation

## 4. Analyse statistique

Seulement les bandes claires et nettes ont été prises en considération. Les profils sont transformés en une matrice binaire (présence (1) ou absence (0) de bandes). La matrice de similarité a été réalisée et le dendrogramme a

été construit avec le logiciel NTSYSpc-2.02j [10]. Les constructions phylogénétiques sont basées sur la méthode des distances génétiques UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) [11] fondée sur l'indice de Sokal et Michener (Simple Matching).

le degré du polymorphisme, est désigné sous le nom de polymorphisme Information Content (PIC). Il renseigne sur l'aptitude d'une amorce à générer un polymorphisme entre les génotypes étudiés (tableau 4) [12]. Il est calculé par la formule ci-dessous :  $PIC = 1 - \sum(P_{ij})^2$ . Où  $P_{ij}$  est la fréquence du  $i^{ème}$  bande révélée par le  $j^{ème}$  amorce,  $P_{ij}$  est sommée à travers toutes les bandes révélées par les amorces

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1. La diversité génétique analysée par les marqueurs SSR

Seize paires d'amorces ont été utilisé pour étudier la diversité génétique des 11 accessions locale tunisiennes de blé dur.

Parmi ces amorces, seulement trois ont générés des profils monomorphes, huit amorces ont générés des profils polymorphes (tableau 4). Au total 108 bandes polymorphes ont été obtenues, soit une moyenne de 9,81 bandes par accessions et 13,5 bandes par amorces. Pour chaque accession et pour chaque amorce, les bandes polymorphes, à un niveau déterminé de migration, sont notées par 1 (présence de bande) et 0 (absence de bande). Ainsi pour chaque amorce, nous avons mesuré le degré de polymorphisme à travers le calcul le PIC (Polymorphism Information Content). Il traduit la capacité de discrimination de polymorphisme pour chaque marqueur en fonction du nombre d'allèles au niveau d'un locus (tableau4 et tableau5). La valeur de PIC varie entre 0,29 pour l'amorce wmc110 et 0,69 pour l'amorce wmc789 et une valeur moyenne de PIC = 0,4.

Tableau 4 : Nombres de fragments générés par chaque amorce SSR

Marqueur	Séquence : 5'-3'	Nombre d'allèle	Pic	Température d'hybridation
Wmc 110	F: gcagatgagttgagttggattg R : gtacttggaactgtgttggg	3	0,289	61
Wmc 156	F : gcctctaggagaaaaactaaca R : tcaagatcatacctcccac	2	0,316	51
Wmc 168	F : aacacaaaagatccaacgacac R : cagtatagaaggattttgagag	3	0,474	51
Wmc 238	F : tcttctgcttaccacaacaca R : tactgggggatcgtggatgaca	2	0,316	61
Wmc 329	F : acaaaggtgcattcgtaga R : aacacgcatcagtttcagt	2	0,375	51
Wmc 553	F : cggagcatgcagctagtaa R : cgctgcagaattcaacac	3	0,482	61
Wmc 619	F : ttcctttccccttttccg R : tacaatgccacgagcacct	3	0,289	61
Wmc 798	F:gtgtgtagttagctgccaag R:gtagcatggcacatagaagcag	4	0,697	61
Moyenne	-	2,75	0,4	-

### 2. Dendrogramme

Le dendrogramme obtenu (Fig. 1) basé sur la matrice de similarité (Tableau 5) présente des informations sur les relations génétiques entre les différentes accessions en fonction de la

distribution allélique des loci. Le coefficient de similarité varie de l'ordre de 52% à 100%. Une coupure (un trait) sur le dendrogramme au niveau de 56,8% de similarité, nous a permis d'obtenir deux principaux groupes (A et B).

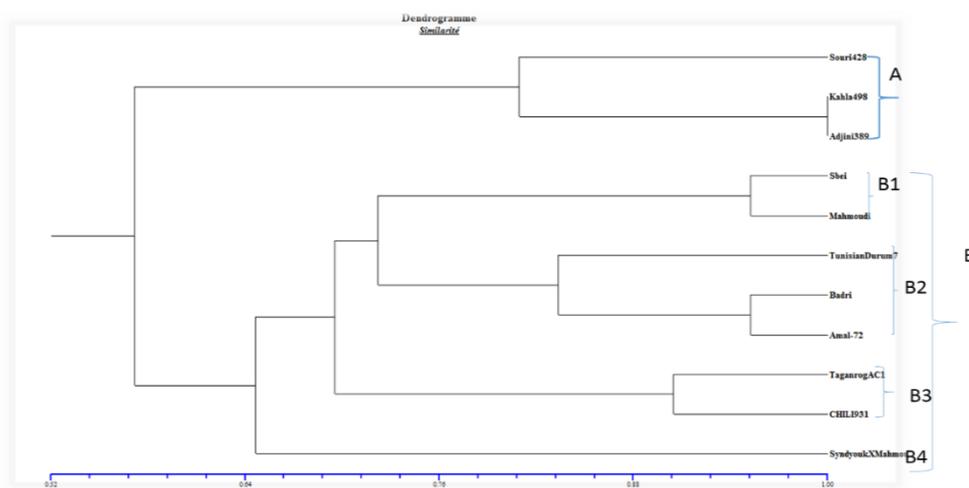


Figure 1 : Dendrogramme de similarité

Tableau 5 : Matrice de la similarité (SSR)

	Souri 428	Kahla 498	Adjini 389	Mahmoudi	Sbei	SyndyoukX Mahmoudi	Taganrog AC 1	Chili 931	Tunisian Durum 7	Badri	Amal-72
Souri 428	1,000										
Kahla 498	0,810	1,000									
Adjini 389	0,810	1,000	1,000								
Mahmoudi	0,619	0,810	0,810	1,000							
Sbei	0,571	0,762	0,762	0,952	1,000						
SyndyoukX Mahmoudi	0,476	0,476	0,476	0,667	0,714	1,000					
Taganrog AC 1	0,381	0,476	0,476	0,667	0,714	0,619	1,000				
CHILI 931	0,476	0,571	0,571	0,762	0,714	0,619	0,905	1,000			
Tunisian Durum 7	0,476	0,571	0,571	0,667	0,619	0,524	0,619	0,714	1,000		
Badri	0,524	0,619	0,619	0,810	0,762	0,667	0,667	0,762	0,857	1,000	
Amal-72	0,476	0,571	0,571	0,762	0,714	0,714	0,619	0,714	0,810	0,952	1,000

Le groupe A est composé des accessions Sour428, Kahla et Adjini. Le Groupe B comprend les génotypes Sbei, Mahmoudi, Tunisian Durum 7, Badri, Amal72, TaganrogAC1 et de CHILI93 et Syndyouk X Mahmoudi.

Le groupe B contient 4 sous-groupes : Le sous-groupe B1 comprend les accessions Sbei et Mahmoudi.

Le sous-groupe B2 est formé par les génotypes Tunisian Durum 7, Badri et Amal72. Le sous-groupe B3 est composé des génotypes TaganrogAC1 et de CHILI93. Le groupe B4 ne renferme qu'une seule accession, Syndyouk X Mahmoudi.

**2.1. Groupe A**

Ce groupe renferme les accessions Sour428, Kahla et Adjini avec un coefficient de similarité de l'ordre de 81% (Tableau 5) ce groupe renferme donc les accessions les plus anciennes [13 et 14]. Cette similarité peut être expliquée par certaines caractéristiques morphologiques en commun partagées entre Sour428 et Adjini, tel que la couleur et la forme de l'épi, il est possible de suggérer que la forme et la densité des épis, ainsi que la couleur des glumes étaient

les principaux traits clés qui déterminent la subdivision entre les variétés locales tunisiennes et les cultivars de blé dur, comme l'ont récemment suggéré [15], [16 et 17]. En effet, d'après quelques travaux antérieurs, réalisés dans nos laboratoires et non publié encore, ces accessions présentent le même comportement vis-à-vis du stress thermique et salin. Kahla et Adjini présentent un coefficient de similarité de 100% (Tableau 5 et Fig. 1). Ces deux accessions sont identiques morphologiquement et physiologiquement mais ils sont conservés à la BNG sous deux codes et deux appellations différentes. Notre analyse moléculaire a confirmé l'hypothèse qu'il s'agit de la même accession conservé sous deux différents codes et ceci pourrait être du a une faute d'étiquetage.

**2.2. Groupe B**

Le groupe B est subdivisé en deux sous-groupe B1 et B2

**-Sous-groupe B1**

Il est formé par les deux accessions Sbei et Mahmoudi. Elles sont liées par un coefficient de similarité(CS) de l'ordre de 95.2%.

Deux variétés tunisiennes locales [14 et 18], leur regroupement dans la même classe pourrait être expliqué par le fait qu'elles partagent plusieurs caractères morphologiques tels que la couleur blanche de glumes et les barbes noires)

#### **-Sous-groupe B2**

Ce groupe comprend Tunisian Durum 7, Badri et Amal72. Ces variétés sont les fruits des premières sélections et d'amélioration génétique qui ont commencés au début des années 1970 et après la Révolution verte. Les variétés locales de blé dur ont été progressivement abandonnées et remplacées par des cultivars modernes génétiquement uniformes améliorés [19]. En examinant le pedigree de ces génotypes, nous remarquons que Badri et Amal72 ont deux parents directs en commun, Ce qui pourrait expliquer leur présence dans le même groupe avec un coefficient de similarité élevé (CS=95,2%). Ces parents en commun sont Zenati et Bouteille. D'après leurs pedigrees Badri (Zenati/Bouteille/Mahmoudi/MraniD117)Amal72 (Beladi116E/2\*Tehuacan60/3/Zenati/Bouteille/Wells/4/TremesMolleE/2\*Tehuacan/3/Zenati/Bouteille/Wells).

Nous ne possédons pas des données concernant le pedigree ou l'origine de Tunisian Durum 7. Le rapprochement entre les trois génotypes peut être dû à certains caractères agro-physiologique tel que la taille de la plante et sa précocité de cycle végétative ce qui favorise leurs tolérances à la sécheresse.

#### **-Sous-groupe B3**

Le sous-groupe B3 est composé de TaganrogAC1 et de CHILI931. Ces deux accessions présentent un coefficient de similarité de 90,5%. Bien que nous ne disposions pas des informations concernant leurs pedigrees, en plus ces deux variétés ont deux origines différentes : Taganrog est d'origine russe tandis que Chili est introduite en Tunisie en 1932 à travers un lot de grain commercial provient de Marseille (France) [14]. Probablement, leurs regroupement vient du fait qu'elles partagent quelques caractères agro-morphologiques tels que : (i) La même couleur des graines (blanc-ambéré), (ii) Le taux de rendement (nombre de graines par épis et poids de 1000 graines=40-43), (iii) Presque le même taux de protéine (17-18%), (iv) Résistantes à la *Septoria Tritici*.

Avec ce taux de protéine élevés, nous pouvons prédire qu'elles possèdent une bonne qualité nutritionnelle et technologique.

D'après nos ancêtres le couscous de Chili est très apprécié pour sa qualité technologique et organoleptique.

#### **- Sous-groupe B4**

Il comprend seulement Syndyouk X Mahmoudi. Cette accession est issue du croisement de Syndyouk (le Syndyouk 272, venant de la collection Vilmorin) et Mahmoudi qui est une population locale avec diverses origines signalées. Ceci explique peut-être son éloignement des autres accessions avec un coefficient de similarité de 47%.

### **CONCLUSION**

Au cours de notre étude, nous avons essayé de faire une caractérisation moléculaire de quelques accessions locales de blé dur moyennant les marqueurs microsatellites, associés à une étude approfondie sur les caractéristiques et les données passeport de chaque variété. Onze paires d'amorces ont été utilisées. Le dendrogramme obtenu nous a permis de dégager deux grands groupes. Les marqueurs moléculaires de types SSR peuvent faciliter la gestion de la collection entière constituée par des milliers d'échantillons de ressources phytogénétiques du blé dur conservés en ex-situ dans les chambres froides afin d'optimiser leur utilisation et leur exploitation. L'analyse de cette diversité génétique a un apport considérable pour la conservation et la création variétale. Les informations issues à partir de notre travail sur l'identité de chaque variété et la distance génétique par rapport aux autres génotypes est très importantes pour les sélectionneurs. Ces informations associées aux caractères agro-morphologiques et physiologiques, de chaque variété déjà disponible sur la base de données de la banque de gènes tunisienne, pourrait servir aux améliorateurs la création des variétés futures qui peuvent échapper aux fluctuations de la production dues aux changements climatiques.

### **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1]. Babay E., Mnasri S, Khamassi K., Ichrak O. & Hanana M. (2019). Morphological and end-use quality characterisation of tunisian durum wheat. *Revue Agrobiologia*. 9(2): 1560-1567
- [2]. Belay, G., Tesemma, T., Bechere, E. & Mitiku, D. (1995). Natural and human selection for purple grain tetraploid wheats in the Ethiopian highlands. *Genet. Res. Crop Evol.* 42: 387-391
- [3]. Babay E., Chaabane R., Mzid-Abdmouleh R., Ben Naceur M. (2015). Diversity of tunisian bread wheat genotypes revealed by Morpho-agronomical and microsatellite markers. *Biosci. J.*, 31(3): 701-708

- [4]. Tesemma T., Tsegaye S., Belay G., Bechere E. & Mitiku D. (1998). Stability of performance of tetraploid wheat landraces in the Ethiopian highland. *Euphytica*. 102: 301-308
- [5]. Zou Z.T. & Yang, W.Y. (1995). Development of wheat germplasm research in Sichuan province. *Crop Genet. Res.* 2: 19-20.
- [6]. Impiglia, A., Nachi, M.M., Cubero, J.I. & Martín, L.M. (1998). Variation for high molecular weight (HMW) glutenin subunits in a world collection of durum wheat landraces. In: Jaradat AA (ed) *Triticeae III*. Science Publishers, Inc, Enfield, NH, USA, 245-252.
- [7]. Babay E., Hanana M, Mzid R., Ben Haj-Salah H., Rodriguez-Quijano M, Ghorbel A. & Slim-Amara H. (2014). Diversité génétique et qualité technologique du blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn.) Cultivé en Tunisie. *Journal of new sciences*. 4: 33-43.
- [8]. Babay E., Khamassi K., Sabetta W., Miazzi MM., Montemurro C., Pignone D., Danzi D., Finetti-Sialer MM. & Mangini G. (2020). Serendipitous In Situ Conservation of Faba Bean Landraces in Tunisia: A Case Study. *Genes*, 11, 236. doi:10.3390/genes11020236.
- [9]. El-Rawy M. & Hassan MI. (2021). Assessment of Genetic Diversity in Durum and Bread Wheat Genotypes Based on Drought Tolerance and SSR Marker. *Plant Breed. Biotech.* 9(2): 89-103.
- [10]. ROHLF, F. J. (1998). NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system Version 2.0. *Applied Biostatistic*, New York, N.Y.
- [11]. Nei M. & Li WH. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 5269-5273.
- [12]. Botstein D., White R., Skolnick M. & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- [13]. Boeuf F., (1925). Contribution à l'étude du blé dur, particulièrement des variétés cultivées en Tunisie. *Annales Service Botanique Tunisie*.
- [14]. Deghaïs M., Kouki, M., Gharbi M. S. & El Felah M. (2007). Les Variétés de céréales cultivées en Tunisie, *National Imprimerie of Edition* (Eds), Tunisia, P. 445.
- [15]. Robbana, C., Kehel, Z., Ammar, K., Guzmán, C., Naceur, M.B. & Amri A. (2021). Unlocking the patterns of the Tunisian durum wheat landraces genetic structure based on phenotypic characterization in relation to farmer's vernacular name, *Agronomy* 1. 634. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040634>.
- [16]. Ouaja, M., Bahri, B.A., Aouini, L., Ferjaoui, S., Medini, M., Marcel, T.C. & Hamza, S. (2021). Morphological characterization and genetic diversity analysis of Tunisian durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum) accessions, *BMC Genom. Data* 22 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12863-021-00958-3>
- [18]. Emile M. (1950). Les principales espèces et variétés de Blé cultivées en Afrique du Nord.
- [17]. Babay, E., Khamassi, K., Rouissi, R. & Hanana, M., (2022). Agronomic and Genetic Diversity of Tunisian Local Durum Wheat Accessions. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)* e-ISSN: 2319-2380, p-ISSN: 2319-2372. Volume 14, Issue 6 Ser. III (June 2021), PP 31-38 [www.iosrjournals.org/10.9790/2380-1406033138](http://www.iosrjournals.org/10.9790/2380-1406033138)
- [19]. Bonjean, A.P. & Angus W. J. (2001) *The world wheat book: A history of wheat breeding*, Lavoisier Publishing, Paris, 2001.