

CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DE QUELQUES GÉNOTYPES DE BLÉ TENDRE *TRITICUM AESTIVUM* SSP. *AESTIVUM*

KEBOUR Djamila^{1*}, BOUSSALHIH Brahim², AOUN Omar² et DJENADI Chafika³

1. Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb Blida 1, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie
2. Laboratoire Eau-plante et sol, Département d'Agronomie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, Université Khemis Miliana, rue Thniet El Had, Khemis Miliana, Ain Defla, Algérie
3. INRA A. Mehdi Boualem, Baraki, Alger, Algérie

Reçu le 12/11/2018, Révisé le 28/12/2018, Accepté le 31/12/2018

Résumé

Description du sujet : Etudier ses caractéristiques génétiques qui sont matérialisées extérieurement par les caractères phénotypiques qui constituent un préalable à l'amélioration variétale.

Objectifs : L'utilisation des marqueurs du type SSR et STS pour caractériser 23 génotypes de blé tendre.

Méthodes : Cinq graines de chaque variété sont désinfectées dans un fongicide le Vitavax ® 200FF (Thirame, 200 g/l Carboxine, 200 g/l) (50%) et ont été mises pour germer, elles sont transférées dans des pots contenant 2/3 de terre et un 1/3 de sable et sont placés dans une serre contrôlée (20°C le jour et de 15°C la nuit), et une humidité (60 et 80%). Des feuilles sont coupées à l'aide de ciseaux stériles et mises dans les tubes Eppendorff numérotés. Une extraction d'ADN est faite selon La méthode CTAB modifiée par Udupa *et al.* Une quantification de l'ADN a été réalisée par spectrophotométrie. Une PCR a été réalisée sur un termocycleur applied biosystem. On a utilisé 7 marqueurs : Xwmc44, Xgwm140, Lr34, Lr37, Lr 46, Rht et Iag95.

Résultats : Les gènes Lr46, Lr34 et Rht sont amplifiés, gènes Lr37, Iag95 et Sr31 ne sont pas amplifiés. Les génotypes ont été séparés en groupes qui se rapprochent entre eux par des caractères morphologiques communs.

Conclusion : L'analyse a montré des amplifications pour les caractères de résistance à la rouille brune (Lr46, Lr 34) et de nanisme (*Rht*) et l'absence d' amplifications pour les caractères de la résistance à la rouille brune (Lr37) et de la résistance à la rouille noire (Sr31).

Mots clés: *Triticum aestivum* ; Blé tendre ; Marqueurs moléculaires ; Gènes; Amplifications Morphologie; Caractérisation.

GENETIC CHARACTERIZATION OF SOME TENDING WHEAT GENOTYPES *TRITICUM AESTIVUM* SSP *AESTIVUM*

Abstract

Description of the subject: To study its genetic characteristics which are materialized externally by the phenotypic characters that is to say the morphology, whose knowledge constitutes a preliminary to the varietal improvement.

Objective: The use of SSR and STS markers to characterize 23 genotypes of common wheat.

Methods: five seeds of each variety are sterilized in Vitavax ® 200FF Fungicide Thirame, 200 g/l Carboxine, 200 g/l) (50%) and germinated, transferred to pots containing 2/3 soil and 1/3 sand and placed in a controlled greenhouse (the temperature is 20°C during the day and 15°C at night), and humidity (60 and 80%). At the 3-leaf stage, leaves are cut with sterile scissors and placed in the numbered Eppendorff tubes. DNA extraction is done according to the CTAB method modified by Udupa *et al.* DNA was made spectrophotometrically and on 1% agarose gel. PCR was performed on a biocycle applied cyler. Seven markers were used: Xwmc44, Xgwm140, Lr34, Lr37, Lr46, Rht and Iag95.

Results: Lr46, Lr34 and Rht genes are amplified. However, the Lr37, Iag95 and Sr31 genes are not amplified. The genotypes have been separated into groups that approach each other by common morphological characters.

Conclusion: The analysis showed amplifications for resistance to brown rust (Lr46, Lr 34) and dwarfism (*Rht*) and lack of amplification for rust resistance traits. brown (Lr37) and resistance to black rust (Sr31).

Key words: *Triticum aestivum*; Wheat, Molecular markers; Genoa; Amplifications Morphology, Characterization.

* Auteur correspondant: KEBOUR Djamila, E-mail : djakeb@hotmail.com

INTRODUCTION

Les céréales tiennent, de loin, la première place quant à l'occupation des terres agricoles, parce qu'elles servent d'aliments de base pour une majorité de la population mondiale. [1].

En Algérie, tout comme en Afrique du Nord, ces cultures représentent la principale spéculation et drainent plusieurs activités de transformation, en semoulerie, en boulangerie et en industrie alimentaire. Elles constituent également la base de l'alimentation et occupent une place privilégiée dans les habitudes alimentaires des populations aussi bien dans les milieux ruraux qu'urbains [1].

La production de blé et son utilisation ont été fortement liées au développement de l'agriculture et des civilisations. La domestication du blé, plus que n'importe quelle autre culture a permis la production en quantité suffisante pour supporter l'essor des communautés, le développement de la culture, ainsi qu'une croissance continue des populations. De 1930 à 1970, le monde a connu une augmentation importante dans les rendements des cultures, notamment, celle des céréales, grâce à l'application des principes de la génétique et des biotechnologies dans le domaine de l'amélioration des plantes [2].

En Algérie, la production céréalière n'a pas connu cette évolution et celle des blés varie de 1,6 à 1,8 millions de tonnes en 2007. L'Algérie est un des principaux pays importateurs de blé dans le monde, avec une moyenne de 4 millions de tonnes par an, pour couvrir la demande de la démographie croissante (32 millions d'habitants). En effet la consommation annuelle de blé est approximativement de 22 kilogrammes par habitant et par an [3].

A cause de ce déficit en production qui ne couvre pas les besoins des populations, les chercheurs ont mis au point des programmes d'amélioration visant en premier lieu, la sélection de variétés bien adaptées aux conditions pédo-climatiques. Le sélectionneur doit choisir une stratégie d'action en utilisant les ressources génétiques, les méthodes de sélection classiques et les nouvelles technologies de biologie moléculaire et en intégrant au mieux les outils de la biotechnologie, tels que les marqueurs moléculaires.

Afin de préserver, restaurer et valoriser les caractères des génotypes de blé tendre, l'étude de quelques caractéristiques génétiques matérialisées extérieurement par les caractères phénotypiques représentés par la morphologie sont analysés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Sites de l'expérimentation

Notre expérimentation a été réalisée au niveau de la station expérimentale de l'INRAA) (Institut National de Recherche Agronomique Algérie, Baraki, Alger). L'essai a été réalisé dans une serre contrôlée dans le cadre du Projet National de Recherche d'Amélioration du Blé (PNAB).

2. Mise en place de l'essai

Une phase de germination a été réalisée en novembre 2015, les graines des 23 génotypes de blé tendre en vue d'une germination, sont stérilisées dans un fongicide le Vitavax® 200FF (Thirame, 200 g/l Carboxine, 200 g/l) (50%). Cinq graines de chaque variété ont été mises dans des boîtes de Pétri; elles sont arrosées régulièrement et placées à l'obscurité, à température ambiante du laboratoire (25°C). Les plantules ainsi obtenues, sont transférées dans des pots de 3litres, remplis d'un substrat contenant 2/3 de terre et 1/3 de sable; ils sont placés dans une serre contrôlée, sous une température de 20°C le jour et de 15 °C la nuit et une humidité comprise entre 60 et 80%.

3. Génotypage de blé tendre

Au stade juvénile, les feuilles sont prélevées et sont coupées à l'aide de ciseaux stériles et mises dans les tubes Eppendorff au préalable numérotés et placés dans l'étuve à 50-60°C pendant 48 heures.

Les feuilles séchées sont broyées manuellement avec du sable stérilisé jusqu'à l'obtention d'une poudre, puis conservées dans le congélateur à une température de -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

La méthode CTAB modifiée par Udupa *et al.* [4], a été utilisée pour l'extraction d'ADN. Ce protocole permet d'obtenir une grande quantité d'ADN de qualité satisfaisante. Pour chaque 100 ml de la solution CTAB (annexe 5), on rajoute 0.2% de β -mercaptoéthanol et on préchauffe la solution dans un bain Marie à 65°C pendant 10 mn sous hotte, 1400 μ l de CTAB sont apportés en deux à raison de 700 μ l, à chaque échantillon.

Les échantillons sont mixés pendant 1 mn puis incubés pendant une heure à 65°C au bain Marie, en agitant toutes les 15 mn. On ajoute 600 µl de chloroforme alcool isoamylique dans chaque tube qui est agité manuellement pendant 15 mn puis centrifugé à 1300 gravité pendant 15 mn. Nous prélevons 1ml de surnageant dans un nouvel tube eppendorff pour chaque échantillon, où on a ajouté 600 µl d'isopropanol, mixé puis incubé pendant 60 mn à - 4°C.

Après centrifugation à 1300 gravité à 4°C pendant 10 mn, le surnageant est soigneusement jeté. On verse délicatement 1ml d'éthanol à 70% dans des tubes qui sont à nouveau centrifugés à 1300 gravité à 4°C pendant 5 mn. Les tubes sont laissés à sécher sous hotte ; sont repris les culots d'ADN et on ajoute 100 µl d'eau ultra pure et on conserve au congélateur.

La quantification de l'ADN ainsi que les tests de quantité et de qualité ont été réalisés par spectrophotométrie et sur gel d'agarose à 1%. Une lecture de densité optique (DO) a été réalisée pour la concentration de l'ADN dans chacun des tubes. Une lecture de l'absorbance effectuée des acides nucléiques à 260 nm à 280 nm , afin de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extraite. Des dilutions ont été effectuées pour obtenir une concentration nécessaire pour un bon déroulement de la PCR. Le gel d'agarose à 1% est coulé dans la cuve, une fois refroidi, il est placé dans une cuve pleine de tampon de migration TBE ×1 jusqu'à recouvrir légèrement le gel.

Le mix d'ADN (3 µl d'ADN + 4 µl de H₂O et 3 µl de bleu de bromophénol) est déposé dans les puits (7 µl pour les échantillons d'ADN et 5 µl pour marqueur de taille).

La migration est effectuée en deux étapes à 80 V au démarrage, puis augmentée à 120 V. La révélation des bandes a été réalisée avec BET puis observée sur une lampe UV.

4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR a été réalisée sur un thermocycleur applied biosystem, le mix réactionnel pour chaque amplifiat. Le mix est composé d'eau ultra pure, dNTPs (0,2mM) et MgCl₂. A ce mix, on rajoute l'amorce d'ADN matrice et la Taq DNA polymérase, le volume final est 10 µl (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition du mix réactionnel

Composition	Pour 1 échantillon	Pour n échantillons
Eau ultra pure	4,975 µl	157,5 µl
5× Buffer	2µl	72 µl
MgCl ₂	0,6µl	21,6 µl
DNTP	1µl	36 µl
Amorce	1µl	36 µl
Taq polymérase	0,025µl	0,9 µl
ADN	1µl	/

Les amplifications sont réalisées selon des différents programmes de la PCR, basés sur la température ainsi que sur le temps. La température d'hybridation de chaque amorce dépendant T_m des paires d'amorces (Tableau 2) et le temps de chaque étape dépend de la taille des amplifiats. Un set de 7 paires d'amorces a été testé pour l'évaluation du polymorphisme des génotypes représentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Microsatellites testés pour l'analyse des génotypes de blé tendre

	Locus	Amorce gauche 5' 3' Amorce droite 5' 3'	T° d'hybridation	Type de marqueur
M1	Xwmc44 Lr46	GGTCTTCTGGGCTTTGATCCT GTTGCTAGGGACCCGTAGTGG	61 °C	SSR
M2	Xgwm140 Lr46	ATGGAGATATTTGGCCTACAA CATTGACTTCAAGGCGTGACA	60 °C	SSR
M3	Lr34	AGCTATGCTTCACGAGGAAG CTCCTCTTTATATCGCGTCCC	55 °C	STS
M4	Lr37	AGGGGCTACTGACCAAGGCTTGCA GCTACAGCAGTATGTACACA AAA	65 °C	STS
M5	RhtB1b	GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG CATCCCCATGGCCAT CTC GAG CTA	58 °C	STS
M6	RhtD1b	CGCGCA ATTATTGGCCAGAGA TAG CCCCATGGCCAT CTC GAGCTG CTA	58 °C	STS
M7	Iag95	CTCTGTGGATAGTTACTTGATCGA CCTAGAACATGCATGGCTGTTACA	60 °C	STS

La révélation des échantillons a été réalisée sur gel d'acrylamide à 30% pour une meilleure résolution des bandes. Cette étape est initiée par le traitement des plaques en verre au NaOH pendant 2 mn, puis rincées à l'eau distillée. Le coulage de gel est effectué après un bon serrage des plaques ; puis laissé pendant 2 heures pour une bonne polymérisation. Les plaques sont déposées dans une solution de tampon TBE ($\times 0,5$). Le mix PCR (10 μ l de mixte +5 μ l de bleu acrylamide) est déposé dans chaque puits : 7 μ l pour les échantillons de mix et 5 μ l pour marqueur de taille, la migration se déroule sous une tension de 300 volts pendant 4 heures. La visualisation des bandes a été réalisée dans des bains de BET. L'appareil lampe UV Trans-illuminateur a été utilisé pour la visualisation des amplifiats des amorces.

RÉSULTATS

1. Génotypage

1.1. Analyse de la quantification d'ADN

Le tableau 3, représente la quantification au spectrophotomètre des extraits d'ADN des variétés du blé tendre étudiées. Dans l'ensemble, il est noté que les quantités d'ADN obtenues après extraction sont comprises entre 17,5 μ g/ μ l et 763,2 μ g/ μ l avec un rapport 260/280 nm inférieur à 1,8 pour la majorité des échantillons, ce qui reflète la présence des ARN dans nos échantillons, puisqu'on n'a pas utilisé de l'ARNase lors de l'extraction.

La présence des ARN dans nos échantillons n'a pas agi sur le bon déroulement de l'amplification des SSRs.

Tableau 3 : Quantités d'ADN extraits obtenues par spectrophotomètre

Génotype	[ADN] μ g/ μ l	260/280	260/230
G1	281,1	1,89	1,88
G 2	225,1	1,74	1,64
G 3	102,9	1,75	1,63
G 4	585,5	1,45	1,20
G 5	179,9	0,96	1,02
G 6	150,2	1,53	1,36
G 7	689,4	1,58	1,35
G 8	17,5	1,74	0,35
G 9	401,7	1,36	1,37
G 10	625,2	1,32	1,10
G 11	213,2	1,54	1,28
G 12	487,9	1,96	1,49
G 13	94,7	1,91	1,75
G 14	219,4	1,67	1,13
G 15	313,5	1,59	1,17
G 16	618,2	1,86	1,25
G 17	537,1	1,22	1,18
G 18	536,2	1,29	1,11
G 19	615,5	1,18	0,68
G 20	763,2	/	/
G 21	369,1	1,38	1,38
G 22	620,2	/	/
G 23	455	1,82	1,75

L'ADN extrait des différents échantillons des parents simples a été quantifié en premier sur gel d'Agarose à 1 %, l'objectif est la confirmation de la qualité et la quantité d'ADN. La visualisation des gels (Fig. 1) montre la présence d'ADN de bonne qualité et en quantité suffisante pour les prochaines analyses.

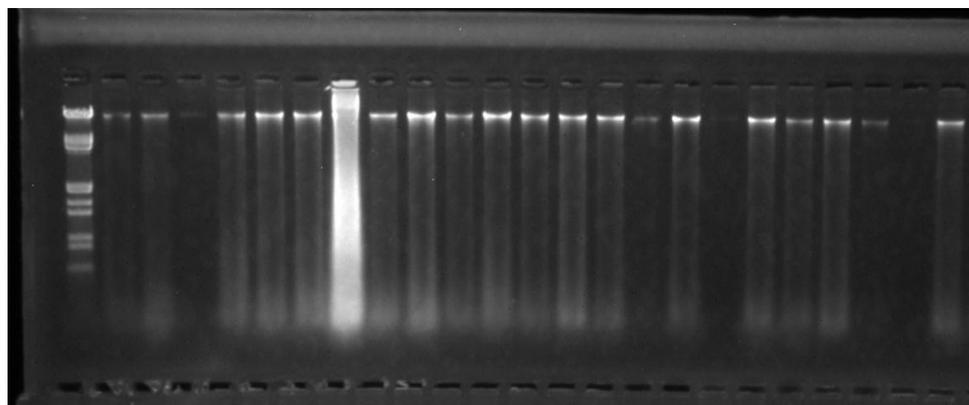


Figure 1 : Analyse d'extraction d'ADN génomique totale des parents sur gel d'agarose à 1%, 120 volts pour migration pendant 1h 30mn, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 1Kb.

1.2. Analyse du polymorphisme des génotypes avec 7 marqueurs

1.2.1. Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 46 avec les marqueurs Xwmc44 et Xgwm140.

Deux marqueurs SSR Xwmc44 et Xgwm140 ont été testés pour l'analyse du polymorphisme des 23 génotypes pour le gène de résistance à la rouille brune. L'analyse du gel montre la présence des amplifications de la bande à environ 250 pb chez la plupart des génotypes : Arz, Anza, Rmada, Paula, Compair (Fig. 2 et 3).

1.2.2. Génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 34

L'analyse du gel d'acrylamide du gène Lr34 (Fig. 4), montre la présence des amplifications de la bande à environ 125 pb pour la majorité des génotypes : Arz, Anza, Dhawer, HD, Paula, Compair, etc. Ce résultat confirmera que ces génotypes seraient résistants à la rouille, nous pouvons supposer que ce gène est dominant, donc les génotypes sont homozygotes pour ce caractère. L'absence d'amplifiats à 125 pb pour les autres génotypes Ben Mabrouk, Marroco, Rmada et Yoko indique que ces génotypes seraient susceptibles à la rouille et donc le gène semble récessif.

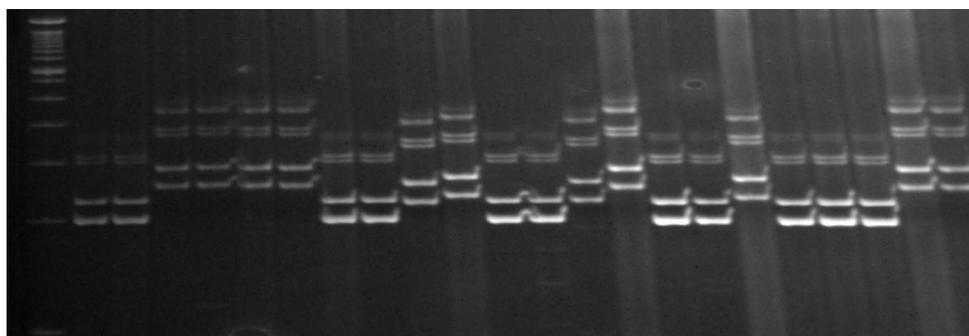


Figure 2 : Polymorphisme des génotypes pour le gène Lr 46 avec le marqueur Xgwm 44
1 : Compair, 2 : Dhawer/Nesser, 3 : TC*6x/Exchange, 4 : WBLL1*2/TUKURU, 5 : Buck buck, 6 : Dhawer, 7 : Paula, 8 : Benmabrouk, 9 : Sahal, 10 : Stylet, 11 : Babax#1, 12 : Annuello, 13 : Pastor, 14 : Compare, 15 : Selkirk/6*TC(RL6013), 16 : Pavon, 17 : AinAbid, 18 : HD, 19 : Rmada, 20 : ARZ, 21 : Anza, 22 : Yoko, 23 : Super Kauz . Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.

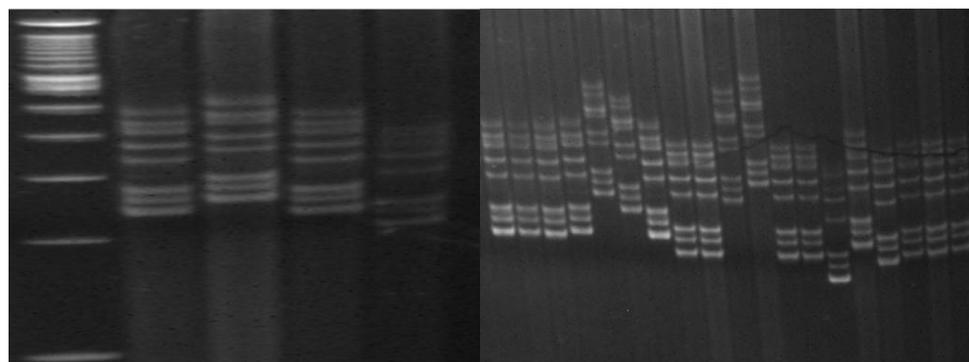


Figure 3 : Polymorphisme des génotypes pour le gène Lr 46 avec le marqueur Xgwm140
1 : Compair ; 2 : Dharwer/Nesser ; 3 : TC*6x/Exchange ; 4 : WBLL1*2/TUKURU ; 5 : Buck buck ; 6 : Selkirk/6*TC ; 7 : Paula ; 8 : Benmabrouk ; 9 : Sahal ; 10 : Stylet ; 11 : Babax#1 ; 12 : Annuello ; 13 : Pastor ; 14 : Yoko ; 15 : Dharwer ; 16 : Marroco ; 17 : AinAbid ; 18 : HD ; 19 : Rmada ; 20 : ARZ ; 21 : Anza ; 22 : Compare ; 23 : SuperKauz . Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.

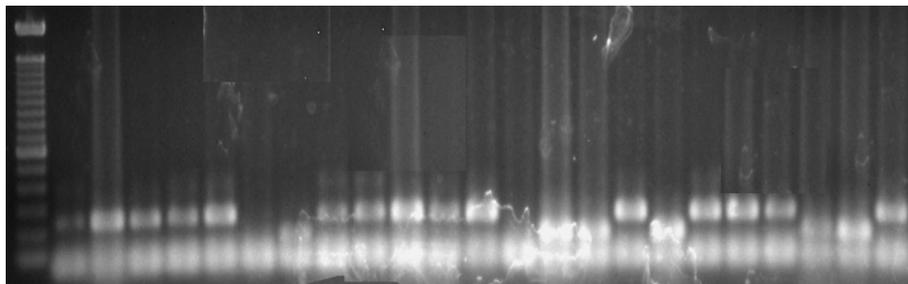


Figure 4 : Polymorphisme des génotypes avec marqueur STS pour le gène Lr34 :
 1: Pastor; 2:Parula ; 3:Annuollo; 4:Dharwer/Nesser; 5:Styler; 6:Rmada; 7:Yoko;
 8 :WBLL1*2/TUKURU ; 9 :Sahel; 10:BuckBuck; 11:Anneollo ; 12:Compair;
 13:Benmabrouk ; 14:TC*6x/Exchange; 15:Super Kauz; 16:TC*6x/Exchange;
 17: Selkirk/6*TC; 18:Pavon76; 19:Babax #1; 20:Marroco ; 21:Rmada ;22: ARZ ;
 23: ANZA . Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide,
 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence
 d'un marqueur de taille 100pb.

1.2.3. Génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 37

L'analyse du gel d'acrylamide du gène Lr37 (Fig. 5), montre l'absence des amplifications de la bande à environ 259 pb pour la majorité des génotypes Arz, Anza, Dhawer, HD, Paula, Compair, Yako, etc.

Ce résultat suppose que ces génotypes seraient sensibles à la rouille. Nous avons analysé la présence des amplifications seulement sur 5 génotypes Annuollo, Morocco, Buck Buck, Styler et Anza ; sur la base de leur généalogie nous avons supposé que ces génotypes pourraient avoir le fragment de *Triticum ventricosum* [16].

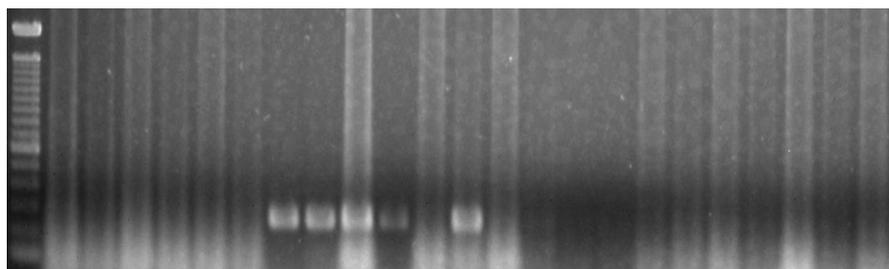


Figure 5: Polymorphisme des génotypes avec le marqueur STS pour le gène Lr37
 1 :TC*6x/Exchange ; 2 :Benmabrouk;3:HD;4:Dharwar Dry/Nesser ; 5: Selkirk/6*TC(RL6013) ;
 6: Pastor ; 7: Annuollo ; 8: Morocco ; 9 : Buck Buck.; 10:styler ; 11 : Babax #1 ; 12 : ANZA
 ;13:Parula;14:Compare;15:SuperKauz;16 :AinAbid;17 :Sahel ; 8 :Rmada ; 19 :Dhawer ;
 20 : Yoko ;21: ARZ ;22 : Pavon76;23 :WBLL1*2/TUKURU. Analyses par électrophorèse
 sur gel de polyacrylamide, 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV
 en présence d'un marqueur de taille 100pb.

1.2.4. Génotypage pour le gène de résistance à la rouille noire Sr31 par le marqueur Iag 95

L'analyse du gel d'acrylamide du gène Sr31 montre l'absence des amplifications de la bande à environ 207 pb pour la majorité des génotypes (Arz, Anza, Dhawer, HD, Paula; Compair) (Fig. 6). Ce résultat confirmera que ces génotypes seraient sensibles à la rouille noire.

La présence de gènes de résistance à la rouille noire, ils ont également souligné la nécessité des marqueurs plus fiables et plus efficaces pour identifier les gènes de résistance aux maladies [22].

La rouille noire est l'une des maladies la plus dévastatrice qui touche le blé dans le monde entier. En Amérique du Nord, les dernières épidémies ont été enregistrées en 1955, depuis lors, la rouille noire a été sous contrôle par l'utilisation de cultivars résistants et l'éradication des hôtes alternatifs. Les cultivars résistants ont toujours été un contrôle efficace de cette maladie dans le monde entier. Mais en 1999, une nouvelle race de *Puccinia graminis f. sp. tritici*, l'agent responsable de la rouille noire, a été détectée en Ouganda qui était virulente contre les gènes de résistance traditionnels de blé Sr31 [23].

Cette race a été dénommée TTKS, ou encore Ug99. En 2003, la race Ug99 a été trouvée au Kenya et en 2007 au Yémen [24, 25].

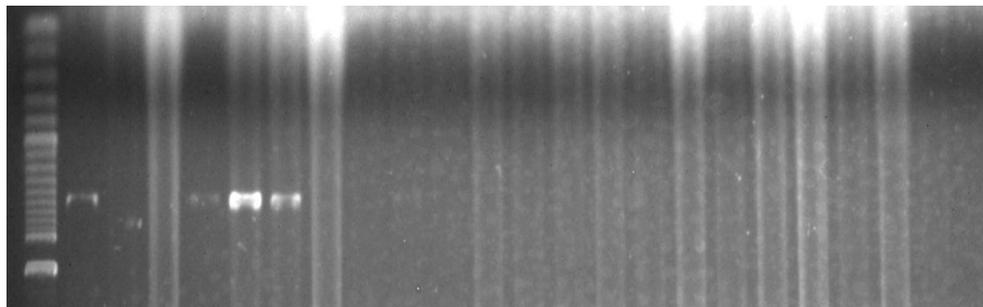


Figure 6 : Polymorphisme des génotypes avec le marqueur STS Iag pour le gène Sr31
 1 :TC*6x/Exchange ; 2 :Benmabrouk; 3:HD; 4:Dharwardry/nesser; 5:Selkirk/6*TC(RL6013) ;
 6: Pastor ;7:Pavon76 ; 8:Morocco ; 9 :WBLL1*2/TUKURU ;10:Styler ; 11 : Babax #1 ; 12 : ANZA;
 13: Parula ;14: Compare ; 15 : Super Kauz ;16 :Ain Abid ; 17 :Sahel ; 18 :Rmada ; 19 :Dhawer ;
 20 : Yoko;21 :ARZ ; 22 :Annuollo ;23 :BuckBuck. Analyses par électrophorèse sur gel de
 polyacrylamide, 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence
 d'un marqueur de taille 100pb.

1.2.5. Génotypage pour le gène de nanisme (Rht)

Deux marqueurs STS Rht-D1b et Rht-B1b ont été testés pour l'analyse du polymorphisme des 23 génotypes pour le gène de nanisme. L'analyse du gel montre la présence des amplifications de la bande à environ 250 pb chez la plupart des génotypes : Arz, Anza, Anneollo, Yoko, Dhawer, Sahl et Ain Abid. Alors que les génotypes Rmada, Pastor, Babax, Dhwer/Nesser n'ont aucune amplification (Fig. 7).

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

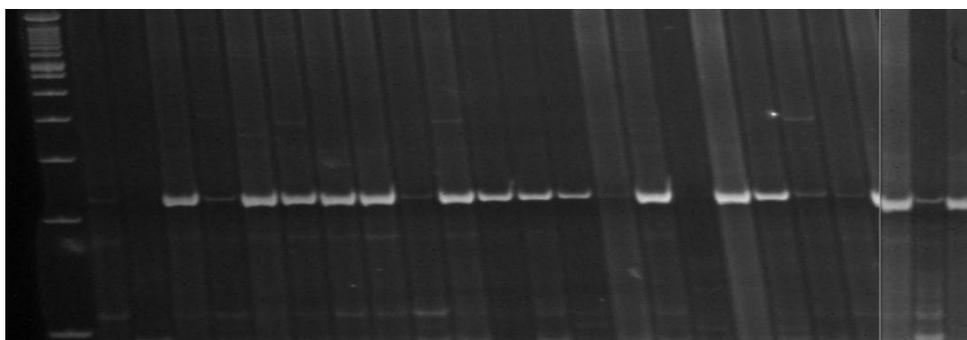


Figure 7: Polymorphisme des génotypes avec le marqueur STS pour le gène Rht
 1 :Compair ; 2 :Dhwer/Nesser ;3 :WBLL1*2/TUKURU; 4 :Super Kauz; 5 : Pavon ; 6:Dhawer ;
 7 : Benmabrouk ; 8 : TC*6x/Exchange ; 9: Stylet ; 10 : Babax #; 11 : Paula ; 12 :Pastor ; 13 : Anneollo ;
 14 :Marroco ;15 :Yoko ;16:Rmada ;17: HD ; 18 : Sahal ; 19 : Selkirk/6*TC -(RL6013) ; 20 : buck buck ;
 21 : ARZ ; 22 :Anza; 23 :AinAbid. Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, 200volts pour
 migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.

DISCUSSION

1. Analyse de la quantification d'ADN par spectrophotométrie

L'analyse du rapport 260/280 nm et 260/230 nm montre la pureté d'ADN en protéine et en ARN respectivement, pour cette évaluation nous avons utilisé les normes suivants Nolan *et al.* [5] :

- (i) 1,7< Contamination protéique,
- (ii) 1,8~2 ADN pure,
- (iii) 2> Présence d'ARN.

L'analyse des échantillons montre une concentration assez élevée d'ADN à une dilution de 1/4 pour la majorité des échantillons, d'où la nécessité d'une dilution, pour une concentration finale de 20 µg/ µl pour la PCR.

2. Analyse de la quantification d'ADN sur gel d'agarose

En revanche ces gels (Fig. 1), montrent l'absence totale de contamination protéique, ce qui confirme les résultats de quantification par spectrophotomètre, en revanche, nous avons observé la présence d'ARN (smear), ceci s'explique par le fait que nous n'avons pas éliminé les ARN par l'ARNase lors de l'extraction selon le protocole modifié par Udupa *et al.* [4].

3. Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 46 avec les marqueurs Xwmc44 et Xgwm140

Ce résultat supposera que ces génotypes seraient résistants à la rouille, alors que les génotypes Dhawer, Stylet, Sahel et Yoko ne présentent aucune amplification, ce qui traduit que ces génotypes seraient susceptibles à la rouille. Lr46 est un gène de résistance à la rouille (slow rusting). Ce gène ne confère pas à la plante une résistance à toutes les races de rouille brune (*Puccinia triticina*), mais permet de retarder le processus de l'infection ou de réduire le développement des symptômes causés par un large éventail de race de rouilles sur plantes adultes [6]. Lr46 a été décrit pour la première fois en 1988, par Singh *et al.* [7]. Dans le cultivar Pavon76. William *et al.* [8], ont également constaté que Lr46 a été étroitement lié ou pléiotropique à un gène de résistance à la rouille jaune Yr29. Martínez *et al.* [6], ont montré que la période de latence des plantes adultes infectées était significativement plus faible chez les plantes portant Lr46 par rapport aux témoins sans gene [8].

4. Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 34

Plus de 60 gènes Lr et QTL ont été décrits dans le blé [9]. Toutefois, beaucoup d'entre eux sont des gènes spécifiques à la race (gène pour gène) et actuellement plusieurs sont utilisés par les améliorateurs. Cependant, la résistance fournie par ces gènes peut être de courte durée car les rouilles sont en constante évolution d'acquérir la virulence contre ces gènes, d'où la nécessité de pyramider dans les nouveaux cultivars des "slow rusting" gènes.

Selon Singh & Huerta-Espino [10], Lr34 est un slow rusting gène qui offre une résistance des plantes adultes durable et non spécifique. Les travaux de Suenaga *et al.* [11] et Krattinger *et al.* [12], ont montré que Lr34 est le même gène que Yr 18 (résistance à la rouille jaune) ; PM38 (résistance à l'oidium) et Ltn1 (nécrose des feuilles).

Lr34 a été décrit la première fois par [13] par dans le cultivar Frontana. Il est situé sur le bras court du chromosome 7D, à proximité de locus Xgwm295 [14]. Le phénotype de gène Lr34 comprend une plus longue période de latence [15].

5. Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 37

Lr37 est un gène de résistance à la rouille des feuilles (slow rusting) originaire de *Triticum ventricosum*, ce gène de résistance est situé dans le segment 2NS (chromosome 2N). Ces gènes fournissent à la plante une large résistance à toutes les races de rouille (*Puccinia triticina*) et peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres gènes de résistance à la rouille [17]. La présence de gène de résistance Lr 37 confère une résistance exprimée tout au long du cycle de croissance de la plante (résistance des plantes adultes) [18]. Lr 37 réduit significativement la gravité de l'infection par la rouille brune (réduction de 61% de la gravité). L'amélioration de la résistance des lignées iso géniques Lr37 a entraîné des augmentations significatives du rendement. Les données moléculaires et sur le terrain ont confirmé que le segment chromosomique 2NS comprenait les gènes de résistance Lr37 [16]. La présence de Lr37 est adaptée à enrichir une base génétique pour la résistance à la rouille des feuilles dans le matériel génétique du blé. De plus, en tenant compte du fait que Lr37 est lié aux gènes Sr38, Yr17 été conféré à une résistance à la rouille jaune (*Puccinia striiformis Ovest F. sp. tritici*), à la rouille noire (*Puccinia graminis Pers. Eriks tritici f.sp. et E. Henn.*) et aux nématodes à kystes (*Heterodera avenae Woll.*). Il a été indiqué que ce fragment de chromosome introgressé peut être très utile dans le développement de nouvelles variétés de blé [19, 20 et 21].

6. Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille noire Sr31 par le marqueur Iag 95

Sr31 est le principal gène de résistance primaire contre la souche Ug99 utilisé dans le monde entier qui réduit efficacement la quantité de rouille du blé tendre. Il assure donc la protection du blé contre cette maladie et il a un intérêt pour l'économie car les maladies peuvent affecter le rendement des cultures, leur qualité et/ou leur commerce [23].

7. Analyse des résultats du génotypage pour le gène de nanisme (Rht).

Les gènes Rht-B1b et Rht -D1b ont pour origine la variété japonaise Norin10, ils ont été d'abord transférés dans les cultivars américains, puis dans les lignées mexicaines du CIMMYT et plus tard à de nombreux autres pays [24]. Ces gènes Rht-B1b et Rht -D1b sont des gènes-insensibles aux GA (Gibbérellines), les allèles conférant les phénotypes nains sont Rht -B1b et Rht-D1b [12]. Les performances agronomiques des gènes Rht-B1b et Rht -D1b dans une série de 140 lignées recombinant (LR) dérivées d'un croisement Kaus X MTRWA116 dans trois environnements : sous irrigation, partiellement irriguée et sous régime pluviale sur deux ans. Le rendement en grain élevé a été obtenu sous le régime irrigué avec combinaison de gènes (Rht-B1b + Rht-D1b) [11].

CONCLUSION

En Algérie, le blé occupe une place importante dans l'alimentation, malheureusement son rendement reste faible, d'où l'importance des variétés performantes, adaptées aux conditions du milieu de bonne qualité et résistantes aux maladies notamment la rouille. Les efforts de la recherche sur le blé tendre sont à la mesure de l'importance économique de cette culture. En effet, malgré le faible polymorphisme observé, la taille et la complexité du génome du blé tendre, des cartes génétiques ont été élaborées et plusieurs caractères ont été étiquetés en utilisant les différentes techniques de marquage moléculaires. Aujourd'hui, avec le marquage moléculaire, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour le sélectionneur. La disponibilité de marqueurs moléculaires permettant de suivre les gènes influençant les performances a ouvert la voie à une amélioration des évaluations.

Ainsi, la sélection assistée par marqueur (SAM) n'est possible que si les marqueurs moléculaires sont facilement utilisables et informatifs. Cependant, les variétés traditionnelles du blé nécessitent actuellement de très nombreux traitements phytosanitaires pour lutter contre les maladies cryptogamiques, comme les rouilles. La création de nouvelles variétés, portant des facteurs de résistance à ces maladies issue de variétés résistantes cultivées ou apparentées au blé, présente une alternative prometteuse pour limiter les intrants à la culture du blé.

Le présent travail est une initiation à la caractérisation morphologique et moléculaire de 23 génotypes de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Notre démarche a été d'une part, de tester des marqueurs moléculaires déjà publiés, liés à des caractères d'intérêt pour le blé tendre (résistance à la rouille brune et noire, de nanisme) pour analyser le génotypage du blé tendre et d'autre part, de découvrir le phénotypage des génotypes testés par les marqueurs. Pour ce travail, 7 marqueurs ont été utilisés : Xwmc44, Xgwm140, Lr34, Lr37, RhtB1b, RhtD1b, Iag95. Les résultats préliminaires de cette analyse ont montré des amplifications pour les caractères de résistance à la rouille brune (Lr46, Lr 34) et de nanisme (*Rht*) pour la majorité des échantillons ; et l'absence des amplifications pour les caractères de la résistance à la rouille brune (Lr37) et de la résistance à la rouille noire (Sr31). Ces résultats ouvrent la voie pour l'utilisation d'autres marqueurs dans les programmes de la sélection assistée par marqueurs chez le blé tendre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Boulal H., Zaghouane O., El Mourid M. et Rezgui S. (2007). *Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie)*. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, 176 p.
- [2]. Khush G.S. (1999). Green Revolution : preparing for the 21st Century. *Genome*, 42: 645-655 .
- [3]. Anonyme (2011). *Bulletin statistiques de la campagne 2009-2010*. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural , 23 p.
- [4]. Udupa S.M., Robertson L.D., Weigand F., Baum M. and Kahl G. (1999). Allelic variation at (TAA), microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Mol Gen. Genet*, 261:354–363.

- [5]. Nolan T., Hand R.E. and Bustin S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols.*, 1(3):1559-82.
- [6]. Martínez F., Niks R.E., Singh R.P. and Rubiales D. (2001). Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *In: Hereditas*, 135:111-114.
- [7]. Singh R.P., Mujeeb-Kazi A. and Huerta-Espino J. (1998). *Lr46*: A Gene Conferring Slow-Rusting Resistance to Leaf Rust in Wheat. *In: Phytopathology*, 88(9) :890-894 .
- [8]. William M., Singh R.P., Huerta-Espino J., Ortiz Islas S. and Hoisington D. (2003). Molecular Marker Mapping of Leaf Rust Resistance Gene *Lr46* and Its Association with Stripe Rust Resistance Gene *Yr29* in Wheat. *In: Phytopathology*, 93(2):153-159.
- [9]. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M., Dubcovsky J., Rogers R. and Appels R. (2005). Catalogue of gene symbols for wheat. *In: KOMUGI, Integrated wheat Science Database* .
- [10]. Singh R.P. and Huerta-Espino J. (2003). Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *In: Euphytica*, 129:371-376.151.
- [11]. Suenaga K., Singh R.P., Huerta-Espino J. and William H.M. (2003). Microsatellite Markers for Genes *Lr34/Yr18* and Other Quantitative Trait Loci for Leaf Rust and Stripe Rust Resistance in Bread Wheat. *In: Phytopathology*, 93(7):881-890 .
- [12]. Krattinger S.G., Lagudah E.S., Spielmeyer W., Singh R.P., Huerta-Espino J., McFadden H., Bossolini E., Selter L.L. and Keller B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *In: Science*, 323:1360-1363.
- [13]. Dyck P.L., Samborski D.J. and Anderson R.G. (1966). Inheritance of adult-plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. *In: Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 8:665-671.
- [14]. Singh G. and Upadhyay R.K. (1993). Essential oils: a potent source of natural pesticides. *Journal of scientific and industrial research*, 52: 676-683.
- [15]. Isman M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: 603- 608
- [16]. Isman M.B. (2001). *Pesticides based on plant essential oils for management of plant pests and diseases. In: International symposium on development of natural pesticides from forest resources.* Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea, p. 1-9.
- [17]. Chiasson H., Belanger A., Bostanian N., Vincent C. and Poliquin A. (2001). Acaricidal properties of *Artemisia absinthum* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomology*, 94(1): 167-171.
- [18]. Basta A. and Spooner-Hart R. N. (2002). Efficacy of an extract of Dorriggo pepper against two-spotted mite and greenhouse thrips. Spray oils beyond 2000, 25-29 October 1999. Sydney, NSW, Australia. G.A.C Beattie, D. M Watson, M. L Stevens, D. J Rae, R. N Spooner-Hart, ed. Australia, University of Western Sydney, 471-476.
- [19]. Chiasson H., Bostanian N. and Vincent C. (2004a). Acaricidal properties of a *Chenopodium*-based biopesticide. *J. Econ. Entomol.*, 97: 1373-1377.
- [20]. Chiasson H., Vincent C and Bostanian N. (2004b). Insecticidal properties of a *Chenopodium*-based biopesticide. *J. Econ. Entomol.*, 97 : 1378-1383.
- [22]. Coats, J.R., Karr L.L. and Drewes C.D. (1991). Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids. Pages 305-316 in P.A. Hedin (ed.), Naturally Occurring Pest Bioregulators. ACS Symposium Series. Washington, D.C.
- [23]. Isman M. (1999). Pesticides based on plant essential oils. *Pesticide Outlook*, 10 : 68-72.
- [24]. Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras S.G. and Mavragani-Tsipidou P. (1998). Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 46 : 1111-1115