



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master
en science de la nature et de la vie

Option : Génétique

Thème :

Caractérisation moléculaire de deux populations F2 en
ségrégation du blé tendre (*Triticum aestivum*).

Réalisé par : M^{lle} : KERKAR Soumia M^{lle} : MOUKLI Feyza

Soutenu le : 22/09/2018

Devant le jury composé de:

M ^{me} CHABANE. D	MAA	USDB	Présidente
M ^{me} BRADAE. M.S	Professeur	USDB	Examinatrice
M ^{me} CHERRALLAH.A	MCB	USDB	Co-promotrice
M ^{me} DJENADI.C	AR	INRAA	Promotrice

Promotion 2017-2018

Remerciements

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant, de nous avoir guidées toutes les années d'étude et nous avoir données la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Nous exprimons nos remerciements et profonde gratitude à :

Mme DJENADI C. pour nous avoir orientées dans nos travaux et nous avoir fait découvrir le mode de recherche, pour la documentation qu'elle nous a procuré, pour ses précieux conseils, pour son suivi tout au long de la réalisation de ce mémoire et nous tenons à lui avouer que nous avons beaucoup appris à ses côtés, tant sur le plan scientifique que personnel.

Mme CHERRALLAH .A. pour l'honneur qu'elle nous a fait de nous encadrer et diriger notre travail, ainsi que pour son aide et ses conseils.

Nous adressons nos vifs remerciements et toute notre gratitude aux membres du jury :

Mme CHABANE D. d'avoir accepté de présider le jury.

Mme BRADAE M.S. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci est adressé à Mm NADJEH pour son aide et soutien.

Nos sincères remerciements s'adressent également à toute l'équipe de recherche de l'INRAA qui nous a facilité l'accès et le travail au sein de l'institut.

Nos vifs remerciements sont adressés pareillement à nos enseignants.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

*Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères
sentiments,*

*Pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en
témoignage de mon profond amour respect et pour leurs grands sacrifices.*

Je suis fière de vous.

*Mes chères sœurs, mes cousines, mon cher et unique frère, et sa femme
pour leur grand amour et leurs encouragements.*

*À mes amis : Sarah, Madina, Imene, Soumia, Asma, Houda et
Raouf à qui je souhaite une longue vie pleine de joie et de réussite.*

Je vous aime

Moukli feyza

Dédicace

Je dédis ce travail à :

A mes chers parents « Fattouma & Abdelkader » qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir.

A mes sœurs : Hadjer, Mimi, Assia et Roumaïssa pour leur encouragements.

A mon cher et unique frère « Abderrahmane ».

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et à tous ceux que j'aime je dédie ce modeste travail avec amour, reconnaissance et honneur

Je n'oublie pas mes amies : Feyza; Assmaa, Houda ; Hayet et fatma et tous mes amis(e) de M2 Génétique.

Je vous aime....

Kerkar soumia

Résumé

Notre étude a pour objectif la caractérisation moléculaire de deux populations F2 en ségrégation du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) par l'utilisation des marqueurs moléculaires de type SSR (répétition de séquence simple) et STS (site de séquence étiqueté)

Ce travail a été réalisé sur deux populations issues de deux croisements entre variétés locales et variétés introduites (Fluronce Aurore /Hidhab) et (Stylet /Fluronce Aurore) à partir d'ADN génomique extrait des populations F2 en ségrégation. Deux marqueurs de types STS et un marqueur de type SSR, liés à des caractères d'intérêt pour le blé tendre, résistance à la rouille brune (*Lr37* et *Lr34*) et la rouille noire (*Sr 24*), ont été utilisés afin de cibler les gènes de résistances. Ces trois marqueurs ont été amplifiés et leurs produits de l'amplification ont été soumis à l'électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Les résultats ont montré des amplifications pour la majorité des individus de la population F2 (Flurence Aurore/Stylet) pour les gènes *Sr24*(localisé sur le bras long du chromosome 3D) *Lr34*(localisé sur le bras court du chromosome 7D) et *Lr37*(localisé sur le bras court du chromosome 2A).

Mots clés : *Triticum aestivum*, marqueur moléculaire, rouille, gène de résistance.

Abstract

Our study aims at the molecular characterization of two F2 populations in segregation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) by the use of molecular markers of the SSR (Simple Sequence Repeat) and STS (Sequence Tagged Site) type.

This work was performed on two populations from two crosses between local varieties and introduced varieties (Fluronce Aurore / Hidhab) and (Stylet / Fluronce Aurore) from genomic DNA extracted from F2 populations in segregation. Two STS markers and one SSR type marker, related to traits of interest for soft wheat, resistance to brown rust (Lr37 and Lr34) and black rust (Sr 24), were used to target resistance genes. These three markers were amplified and their amplification products were subjected to electrophoresis on acrylamide gel.

The results showed amplifications for the majority of individuals in the F2 population (Flauronce Aurore / Stylet) for the Sr24 genes (located on the long arm of the 3D chromosome) Lr34 (located on the short arm of chromosome 7D) and Lr37 (located on the short arm of chromosome 2A).

Key words: *Triticum aestivum*, molecular marker, rust, resistance gene.

الملخص:

إن دراستنا تهدف إلى التوصيف الجزيئي لهجينين اثنين من القمح الطري منتميين للجيل الثاني . وذلك باستخدام الواسمات الجزيئية من نوع SSR و STS.

تم تنفيذ هذا العمل على مجموعتين مستخلصتين من اندماج أصناف محلية FA/HD و أخرى خارجية ST/FA متنوعة انطلاقاً من الحمض النووي المستخرج من المجموعات F2.

تم استخدام اثنين من STS ونوع واحد من SSR المتعلقة بسمات الفائدة للقمح الطري و مقاومة الصد البني (Lr34 و Lr37) والصدأ الأسود (Sr24) لاستهداف جينات المقاومة تم تضخيم هذه العلامات الثلاثة و تعرض منتجاتها إلى التضخيم اللاكهربائي على هلام الاكريلاميد

وأظهرت نتائج التكبير لغالبية أفراد مجموعتي الجيل الثاني F2 للجينات Lr34 . Lr37 و Sr24.

الكلمات المفتاحية : القمح الطري- الواسمات الجزيئية- الجيل الثاني- الصدأ- الجينات المقاومة.

Introduction..... 1

Chapitre I: Synthèse Bibliographique.

I. Généralité sur le Blé tendre (*Triticum aestivum*)

I.1.. Origine génétique et évolution du blé tendre3
I.2 Classification botanique.....4

II. Amélioration génétique de blé tendre (*Triticum aestivum*)

II.1. Amélioration classique du blé tendre.....6
II.2. Amélioration par l'utilisation de la biotechnologie.....7

III. Marqueurs moléculaires

III.1. Définition d'un marqueur moléculaire.....8
III.2. Présentation d'un bon marqueur moléculaire.....8
III.3. Principaux types de marqueurs moléculaires.....9
 III.3.1. Marqueurs RFLP.....9
 III.3.1. Marqueurs de type PCR.....9
 III.3.1.1. Marqueurs SSR.....10
 III.3.2.2. Marqueurs AFLP.....10
 III.3.2.3. Marqueurs RAPD.....11
III.4. Comparaison des principales techniques de marqueur moléculaire.....11
III.5. Sélection assistée par marqueur SAM.....12
 III.5.1. Définition et utilisation de la sélection assistée par marqueur
moléculaire.....12

III.5.2. Application de la sélection assistée par marqueur moléculaire dans les programmes de la sélection.....	14
III.5.3. Rétrocroisement assisté par marqueur moléculaire.....	15
III.5.4. Pyramidage assisté par marqueur moléculaire.....	15
III.5.5. Sélection récurrente assistée par marqueur moléculaire.....	16
III.5.6. Simple sélection à grande échelle assistée par marqueur moléculaire...	17

IV : Les rouilles

IV-1. Définition.....	18
IV-2. Différents types de rouille.....	18
IV-3. Gènes de résistances aux rouilles.....	20

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	23
II. Equipement et produits de laboratoire.....	23
III. Mise en place d'essai.....	23
IV. Génotypage du blé tendre.....	24
IV.1. Prélèvement des feuilles.....	24
IV.2. Broyage des échantillons.....	24
IV.3. Extraction de l'ADN.....	24
V. Evaluation de la qualité et la quantité de l'ADN	25
VI. Amplification de deux marqueurs STS et un marqueur SSR.....	25
VII. Electrophorèse des produits de la réaction PCR.....	27

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Evaluation de la qualité et la quantité de l'ADN.....	29
I.1. Analyse des échantillons sur gel d'agarose 1%.....	29
II. Analyse de polymorphisme des génotypes avec 3 marqueurs :.....	32
II.1. Analyse des résultats des génotypes pour le gène de résistance à la rouille brune <i>Lr34 avec marqueur STS</i>	32
II.2. Analyse des résultats des génotypes pour le gène de résistance à la rouille brune <i>Lr37 avec marqueur STS</i>	33
II.3. Analyse des résultats du génotypage des génotypes pour le gène de résistance à la rouille noire <i>Sr24</i> avec le marqueur X bar71 (SSR).....	34
Conclusion	35
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des abréviations

AFLP: Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés.

BET: Bromure d'éthilium.

CTAB: Cetyl-trimethyl Ammonium Bromide.

EDTA: éthylène Diamine Tetra-Acétique.

FA : Florence Aurore.

F2 : Deuxième génération du croisement.

HD : Hidhab.

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

Lr : Leaf Rust : La rouille brune.

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne.

QTL: locus de caractère quantitatif.

RAPD: Amplification aléatoire d'un ADN polymorphe.

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.

SAM: Sélection Assistée par Marqueurs Moléculaires.

Sr : Stum Rust : la rouille noire.

SSR: répétition de séquence simple.

STS: site de séquence étiqueté.

ST : Stilet.

SLS-MAS: sélection assistée par marqueurs à grande échelle.

TBE: acide borique tris HCL EDTA.

TEMED : Tétraméthyl-éthylène-diamine.

Liste des abréviations.

Liste des figures

Figure 1: Phylogénie du blé tendre.....	4
Figure 2: Classification du blé tendre.....	5
Figure 3 : Principe d'amélioration des plantes autogames.....	7
Figure 4 : comparaison des principales techniques de marqueur moléculaire.....	12
Figure 5 : Localisation des gènes les plus utilisés dans l'amélioration du blé et aussi les plus suivi par les marqueurs moléculaire.....	14
Figure 6 : Schéma de la stratégie de rétrocroisement.....	15
Figure 7 : Schéma de la stratégie de pyramidage.....	16
Figure 8 : Schéma de stratégie de la sélection récurrente.....	17
Figure 9: rouille des tiges et la rouille des feuilles.....	18
Figure10 : rouille jaune.....	18
Figure 11 : la rouille brune.....	19
Figure 12 : les symptômes de la rouille noire.....	19
Figure 13 : Analyse d'extraction d'ADN génomique du 1 ^{er} croisement FA /HD sur gel d'agarose 1 pourcent, 120 V pour migration pendant 1h30 mn, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 1Kb.....	30
Figure 14 : Analyse d'extraction d'ADN génomique du 2 ^{ème} croisement ST/FA sur gel d'agarose 1 pourcent, 120 V pour migration pendant 1h30 mn, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 1Kb.....	31
Figure 15: Polymorphisme des génotypes avec le marqueur STS pour le gène <i>Lr34</i> . Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ,200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.....	32
Figure 16 : Polymorphisme des génotypes avec le marqueur STS pour le gène <i>Lr37</i> . Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ,200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.....	33
Figure 17 : Polymorphisme des génotypes avec le marqueur SSR pour le gène <i>Sr24</i> . Analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ,200 volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.....	34

Liste des tableaux

Tableau I: Les principaux gènes de résistance à la rouille.

Tableau II : les marqueurs utilisés pour l'analyse de la population F2.

Tableau III : Composition du mélange réactionnel de la PCR.

CHAPITRE I :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.

Introduction

Les céréales demeurent l'aliment de base des régimes alimentaires et revêtent une importance stratégique dans la nutrition humaine et l'alimentation animale. De fait, elle occupe une place privilégiée dans l'agriculture dans le monde.

Le blé compte parmi les espèces les plus cultivées dans le monde et constitue la base de l'alimentation d'une grande partie de l'humanité, d'où son importance économique. Les blés fournissent une part importante des besoins énergétiques et protéiques de la population. Elles demeurent un aliment indispensable à l'équilibre alimentaire et leur consommation est largement recommandée pour améliorer l'effet prévention de la santé par l'alimentation. La demande en blé est présagée à une forte augmentation avec l'accroissement de la population mondiale. Ainsi, la production du blé aura un impact crucial sur la sécurité alimentaire et l'économie mondiale dans les prochaines décennies (Taupier-Letage, 2005).

En Algérie, le blé est la céréale la plus consommée, sa consommation est estimée à 220 kg/an. Cette consommation de blé a légèrement augmenté ces dernières années en raison de l'urbanisation accrue, de la croissance de la population, mais devrait rester plus ou moins stagnante. Et le rendement reste relativement bas à cause des stress abiotiques tels que la sécheresse et biotiques comme les rouilles (USDA, 2015).

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 qui peut maximiser ses chances de création d'une bonne variété 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 les marqueurs moléculaires en sélection assistée par marqueurs (Oukkal M 2016).

L'objectif de ce travail est l'utilisation des marqueurs moléculaires (Sélection Assistée par Marqueur) dans l'amélioration génétique du blé afin de sélectionner des génotypes résistants aux rouilles chez deux populations F2 issues de deux croisements (florance Aurore /Hidhab) et (Stylet/Florance Aurore) en ségrégation du blé tendre.

Le manuscrit est présenté en 3 chapitres :

Le 1^{er} chapitre : traite des généralités sur le blé tendre, définit la biotechnologie et les marqueurs moléculaires ainsi que la sélection assistée par marqueurs « SAM ».

Le 2^{ème} chapitre : présente le matériel et méthodes utilisés dans notre étude.

Le 3^{ème} chapitre : met en exergue les résultats obtenus et leurs discussions.

I. Généralités sur le blé tendre

I.1. Origine génétique et évolution du blé tendre

La domestication et la culture des différentes espèces du blé (*Triticum et Aegilops*) ont été un élément fondateur des premières civilisations humaines dans le croissant fertile. Ces espèces ont subi des transformations au fil du temps, les faisant passer de l'état de graminée sauvage aux espèces cultivées. Ces différentes espèces du blé ont été générées par des événements successifs de polyploïdisation intervenant après des croisements interspécifiques entre trois espèces ancestrales diploïdes (Feldman et al, 1995; Eckardt, 2001; Huang et al, 2002).

Par exemple le blé tendre est apparu il y a 7000 à 9500 ans, et il est favorisé rapidement par la culture humaine (Nesbitt et Samuel, 1995).

Blé hexaploïde ou blé tendre *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$ chromosomes). C'est un organisme d'une grande complexité génétique, il contient trois génomes issus des plantes ancestrales à l'origine du blé, génomes A, B et D provenant d'espèces diploïdes différentes. L'identification de ces espèces a été rendue possible par l'étude d'hybrides entre les différents blés puis entre ces blés et des espèces voisines appartenant au genre *Aegilops*.

- Génome A : L'espèce diploïde ($2n=14$), deux espèces diploïdes sauvages de *Triticum* sont reconnues : *T. boeoticum* et *T. urartu*. Ils sont séparés selon leur morphologie et par les marqueurs biochimiques et moléculaires.
- Génome B : l'espèce tétraploïde (*T. turgidum*, $2n = 28$) ou blé à pâtes, a été dérivé d'un événement d'hybridation qui s'est produit entre un donneur diploïde du génome A et une autre espèce inconnue, donneur du génome B ($2n=14$).
- Génome D : l'espèce diploïde ($2n=14$) *Aegilops tauschii*. (Figure 1)

Donc le blé hexaploïde (*T. aestivum*, $2n = 42$, AABBDD) est provenu d'un événement additionnel de polyploïdisation entre une espèce tétraploïde domestiquée *T. turgidum ssp.dicoccum* et un diploïde donneur du génome D, *Aegilops tauschii* ($2n=14$, DD), il y a 7000 à 9500 ans (Tiwari and Shoran, 2010)

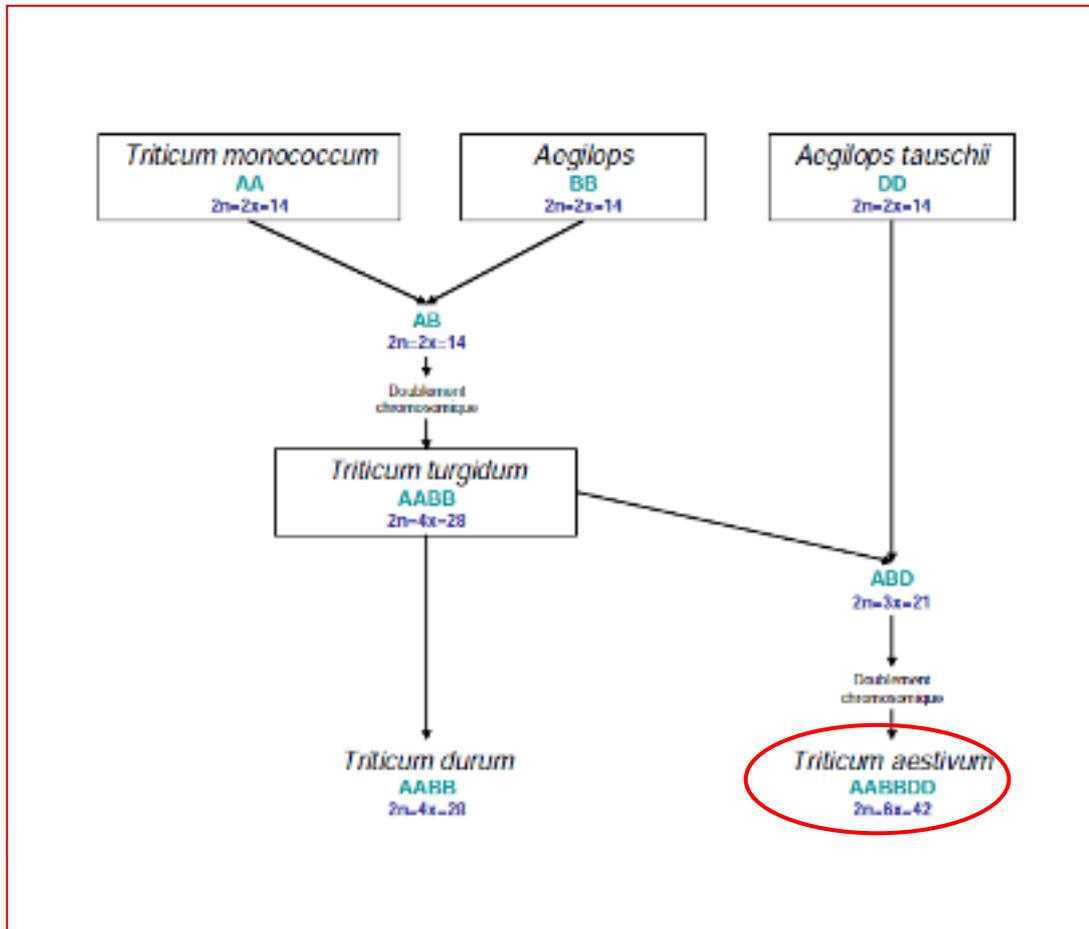


Figure 1 : phylogénie du blé tendre. (Debiton, 2010).

I.2. classification botanique

Le blé (*Triticum sp.L*) est une plante annuelle, monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des Poaceae. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscent, appelé caryopse, constitué d'une graine et de téguments. C'est une espèce autogame à reproduction sexuée, qui a acquis la tolérance à la consanguinité au cours de l'évolution. Le genre *Triticum* comprend les espèces diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes. Ainsi, leur polypléidie a joué un rôle important dans l'évolution du blé. D'après *DOUMANDJI et al.*, (2003), le blé tendre appartient à la classification illustré dans la figure 2.

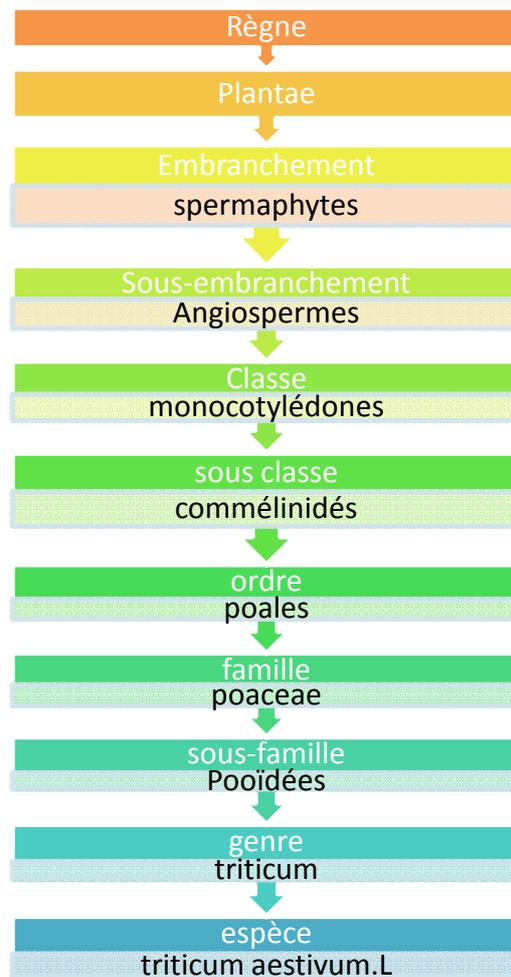


Figure 2 : classification du blé tendre. (DOUMANDJI et *al*, 2003).

II. Amélioration génétique du blé

La culture du blé tendre est très sensible aux insectes nuisibles dont la mouche de Hesse et le puceron (qui peut en outre, transmettre au blé des maladies virales), et aux maladies causées principalement par les champignons parasites dont les différents types de rouilles le piétin-verse, l'oïdium et le charbon. L'amélioration de la production du blé passe donc par un meilleur contrôle de ces maladies et parasites.

L'objectif principal des améliorateurs du blé reste l'amélioration des variétés du blé. En dépit des efforts déployés pour améliorer la production du blé, le rendement reste cependant dépendant principalement des techniques de sélection traditionnelle.

Actuellement, le programme de l'amélioration du blé donne une priorité à l'adoption de nouvelles technologies comme la sélection assistée par les marqueurs moléculaires (SAM). C'est un outil utilisé pour le développement rapide des variétés améliorées avec la possibilité de choisir des caractères désirables directement par l'utilisation de marqueurs d'ADN. (Lammerts van Bueren, 2010).

II.1. Amélioration classique

Le blé tendre est certainement l'une des espèces dont la sélection est la plus ancienne. La méthodologie de la sélection a bénéficié du concept de la lignée pure, elle a ensuite pris en compte les avancées de la génétique quantitative. Les objectifs de la sélection au départ essentiellement limités à la productivité associée à la résistance à la verse se sont diversifiés pour aboutir à des variétés de plus en plus résistantes aux parasites et de mieux en mieux adaptées à l'utilisation industrielle. L'application des principes d'amélioration dépend beaucoup du mode de reproduction de l'espèce (G. Doussinault 1995).

Chez les autogames (figure 4), les populations sont composées d'individus plus ou moins homozygotes et le premier objectif de l'amélioration est l'isolement de lignées supérieures (Valdeyron G. 1961).

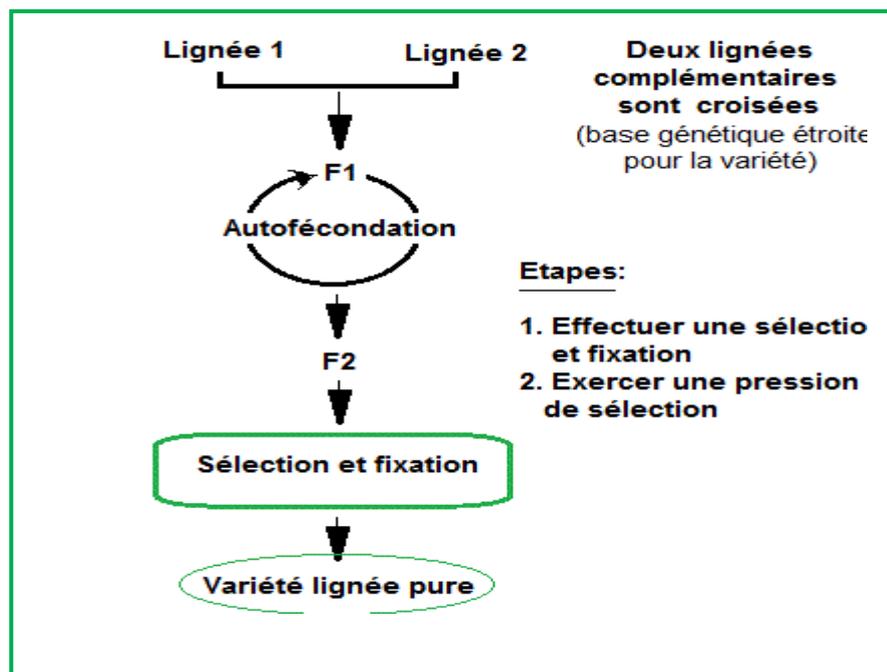


Figure 3 : principe d'amélioration des plantes autogames.

([www.biotech-ecolo.net/amélioration des plantes](http://www.biotech-ecolo.net/amélioration%20des%20plantes))

II.2. Amélioration par l'utilisation de la biotechnologie

La biotechnologie est toute application technologique qui utilise des systèmes biologiques, des organismes vivants ou leurs dérivés pour fabriquer ou modifier des produits ou des processus pour un usage spécifique. La biotechnologie végétale est un domaine précis dans lequel des techniques scientifiques servent à mettre au point de nouvelles variétés de plante. De nombreux chercheurs considèrent la biotechnologie végétale comme le perfectionnement des techniques d'amélioration génétique qui ont commencé il y a des millions d'années avec la culture de plantes sauvages. Le développement de la biotechnologie a permis la réduction des délais d'obtention de lignée pure, objective du sélectionneur, ainsi la caractérisation phénotypique et l'appréciation de la valeur génétique des génotypes pourront se faire précocement (Monneveux. 1997).

III. Marqueurs moléculaires

III.1. Définition d'un marqueur moléculaire

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome ; qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement. En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN.

Ces marqueurs seront d'une grande importance dans l'amélioration des cultures à valeur agronomique et dans les programmes de sélection assistée par marqueurs chez les céréales (*Eagles et al., 2001 ; Langridge et al., 2001 ; Dekkers, Hospital, 2002*).

III.2. Présentation d'un bon marqueur moléculaire

Selon De vienne (1999) un marqueur génétique idéal :

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

III.3. Principaux types de marqueurs moléculaires pour l'amélioration du blé tendre appliqués

III.3.1. Marqueurs RFLP

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

III.3.2. Marqueurs de type PCR

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, iso-enzymatiques et RFLP) et deviennent très nombreux. Les plus largement utilisés chez le blé sont les microsatellites ou SSR (répétition de séquence simple) ; l'AFLP (Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) et la RAPD (amplification aléatoire d'un ADN polymorphe).

III.3.2.1. Microsatellite ou SSR

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

III.3.2.2. Technique AFLP

Elle est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. L'ADN génomique est clivé par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification. Une première amplification, dite pré-amplification, est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3 nucléotides). Ainsi, seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de l'amplification sélective. C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus et constitue donc le marqueur AFLP. (Vos e t al. 1995)

III.3.2.3. Marqueurs RAPD

Elle consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments correspondant à des locus dominants. Les produits d'amplification sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le polymorphisme décelé est dû à des mutations soit dans les régions amplifiées soit au niveau des sites de fixation des amorces. Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce. Les amorces constituent donc les marqueurs. Cette technique est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, la RAPD manque de reproductibilité puisqu'elle est très sensible à la concentration de l'ADN et aux conditions d'amplification. (Williams *et al.*, 1990).

III.4. Comparaison des principales techniques de marqueur moléculaire

Les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus, Codominants et sont utilisés généralement pour la cartographie et la détection de QTL, tandis que les marqueurs RAPD et AFLP sont dominants, non spécifiques de locus et servent essentiellement à la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène d'intérêt en vue de son clonage. La comparaison des principales techniques de marquage moléculaire est illustrée dans la figure 6.

Chaque technique de marquage moléculaire présente des avantages et des inconvénients mais toutes, excepté les SSR, restent mal adaptées aux utilisations à grande échelle. Notamment la conversion de marqueurs RFLP liés aux gènes *Pm4a* et *Pm17* de résistance à l'oïdium et aux gènes *Lr35* et *Lr47* de résistance adulte à la rouille brune (Liu DJ. *Et al.*, 1998 ; Seyfarth *et al.*, 1999 ; Helguera *et al.*, 2000 ; Mohler *et al.*, 2001). Par ailleurs, pour pallier au problème lié au manque de reproductibilité des marqueurs de type RAPD chez le blé, des marqueurs RAPD liés aux gènes *Lr9* et *Lr24* de résistance à la rouille brune, *Dn2* de résistance au puceron russe et *P m 13* et *P m 21* de résistance à l'oidium (Schachermayr *et al.*, 1994, 1995 ; Myburg *et al.*, 1998 ; Cenci *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999).

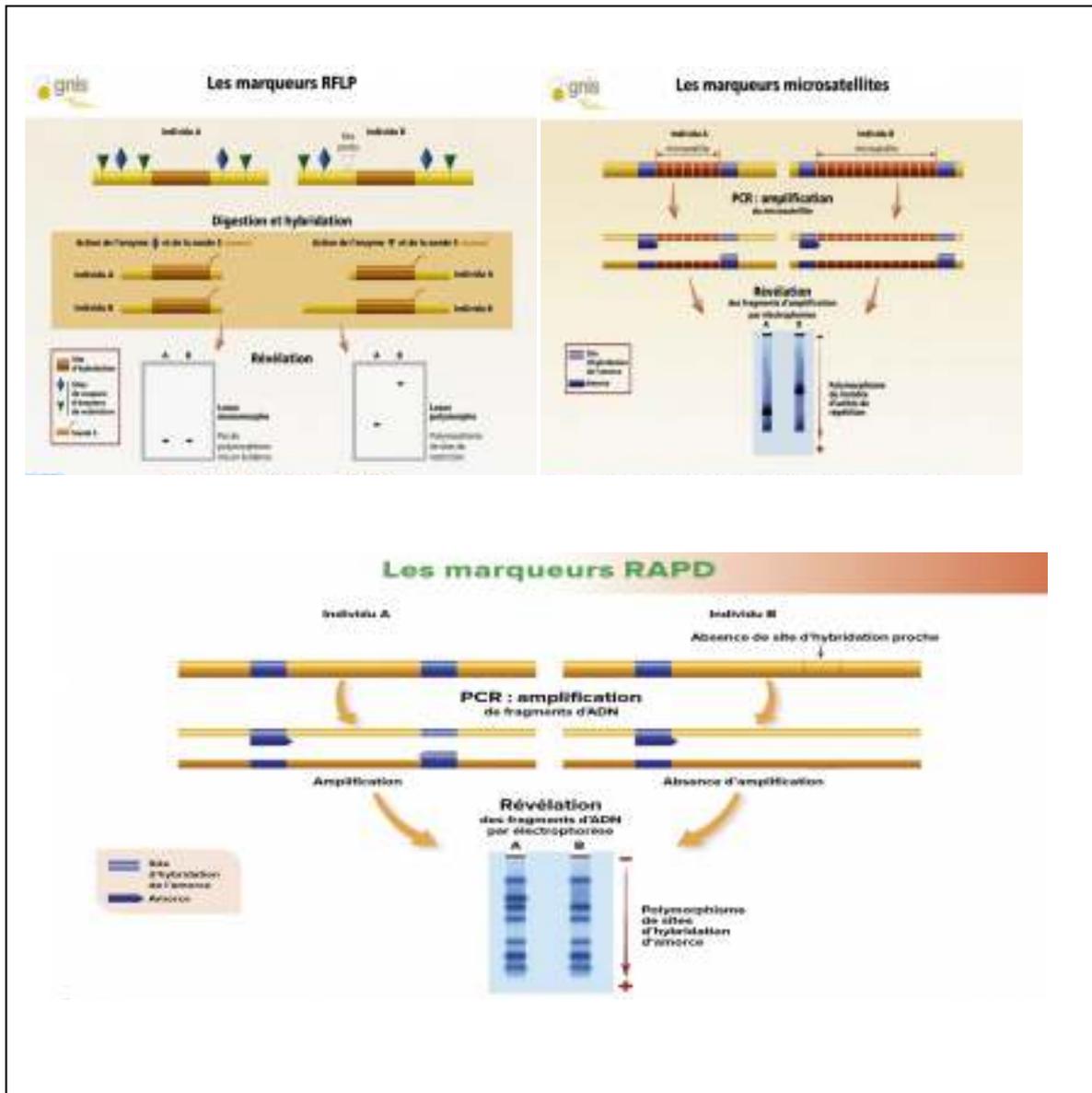


Figure 4 : Comparaison des principales techniques de marqueur moléculaire (Najimi *et al.*, 2003).

III .5. La sélection assistée par marqueur SAM

III.5.1. Définition et utilisation de la sélection assistée par marqueur

La sélection assistée par marqueurs (MAS) correspond à toute forme possible d'utilisation des marqueurs dans le processus d'amélioration, est une technologie d'amélioration explicite. C'est un outil utilisé pour le développement rapide des variétés améliorées avec la possibilité de choisir des caractères désirables directement par

l'utilisation de marqueurs d'ADN. La SAM est très utile dans les programmes d'amélioration, permettant une sélection efficace et ciblée (Lammerts van Bueren, 2010).

Les sélectionneurs appliquent la SAM quand un caractère important est difficile à déterminer phénotypiquement, car il se trouve étroitement associé à un marqueur facile à sélectionner (Lammerts van Bueren, 2010). Les marqueurs moléculaires peuvent alors être utilisés pour aider les sélectionneurs à choisir les individus ou les populations possédant le gène spécifique ou le segment de chromosome connu pour le phénotype d'intérêt.

La SAM est non destructive, elle nécessite peu de tissu végétal et elle n'est pas influencée par les facteurs environnementaux. Ce type de sélection est particulièrement avantageux lorsque le caractère étudié est difficile et coûteux à évaluer, surtout lorsqu'il est influencé par les conditions climatiques ou pédologiques (résistance au stress hydrique, tolérance à l'aluminium, résistance à la germination sur pied, etc.) (Mouillet *et al.*, 2008).

Les marqueurs moléculaires étroitement liés aux caractères agronomiques sont très utiles dans la SAM (Mohane *et al.*, 1997). Plus particulièrement, les marqueurs fonctionnels ou spécifiques des gènes d'intérêt sont préférables pour la SAM, puisqu'ils dérivent directement des gènes conférant le phénotype désiré. Dans la sélection des plantes, les marqueurs fonctionnels peuvent être appliqués pour la validation de l'identité variétale, la sélection parental utilisée pour construire les populations ségrégantes, et la sélection consécutive des nouvelles lignées (Lübberstedt *et al.*, 2005). Plusieurs marqueurs ont été développés et validés pour la SAM. Actuellement, plus de 30 loci associés à la qualité boulangère, résistance aux maladies et autres caractères agronomiques importants ont été identifiés chez le blé. Ces marqueurs sont appliqués avec succès dans les programmes de sélection du blé.

La recherche des marqueurs moléculaires étroitement liés aux gènes de résistance, est une étape importante avant leur exploitation pratique pour accélérer et améliorer l'efficacité des programmes de sélection (Hospital, 2001 ; Moreau *et al.*, 2001 ; Eagles *et al.*, 2001 ; Dekkers *et Hospital*, 2002). Plusieurs recherches ont été faites sur les

marqueurs directs ou liés aux gènes clés et les QTLs, que ce soit pour le stress biotique, abiotique ou pour la qualité.



Figure 5 : Localisation des gènes les plus utilisés dans l'amélioration du blé et aussi les plus suivis par les marqueurs moléculaires (Gupta et al., 2010).

III.5.2. Application de la SAM dans les programmes de sélection

Collard et Mackill (2008), Joshi et Nayak (2010) et Singh et Singh (2015) ont décrit les plus importantes utilisations de marqueurs d'ADN dans l'amélioration des plantes. Généralement, pour le développement de nouvelles lignées, les marqueurs d'ADN ont été intégrés avec les méthodes conventionnelles ou utilisés pour remplacer la sélection phénotypique conventionnelle.

III.5.3. Rétrocroisement assisté par marqueur moléculaire

Le rétrocroisement est une méthode largement utilisée dans l'amélioration des plantes. Le rétrocroisement est souvent utilisé pour incorporer un ou quelques gènes dans une variété adaptée ou élite. Dans la plupart des cas, le parent utilisé dans le rétrocroisement a un grand nombre de caractères désirables, mais il est déficient dans seulement quelques caractéristiques (Allard, 1999). La méthode a été d'abord décrite en 1922 et a été largement utilisée entre les années 1930 et les années 1960 (Stoskopf et al., 1993).

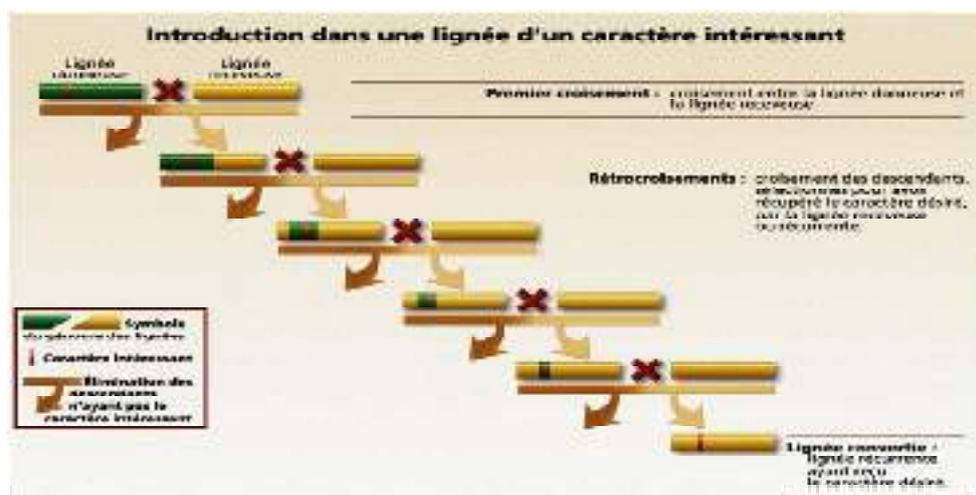


Figure 6 : Schéma de la stratégie de rétrocroisement.

<http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie -Amelioration-reproduction-retrocroisement.html>.

III.5.4. Pyramidage assisté par marqueur moléculaire

Le pyramidage est le processus par lequel un ensemble de gènes codant pour le même caractère est combiné dans un seul génotype. Le pyramidage peut être possible par la méthode conventionnelle mais il n'est pas d'habitude facile à identifier les plantes contenant plus qu'un gène.

En utilisant la sélection phénotypique conventionnelle, les plantes individuelles doivent être évaluées pour tous les caractères testés. Les marqueurs d'ADN peuvent efficacement faciliter la sélection car les marqueurs d'ADN sont non destructifs et les marqueurs pour des gènes spécifiques multiples peuvent être testés utilisant un échantillon d'ADN seule sans phénotypage. L'importance de cette méthode est le

développement de résistance durable ou stable puisque le pathogène surmonte fréquemment la résistance par un seul gène au fil du temps en raison de l'apparition des nouvelles races pathogènes. (Kloppers et Pretorius, 1997 ; Shanti et al., 2001 ; Singh et al., 2001).

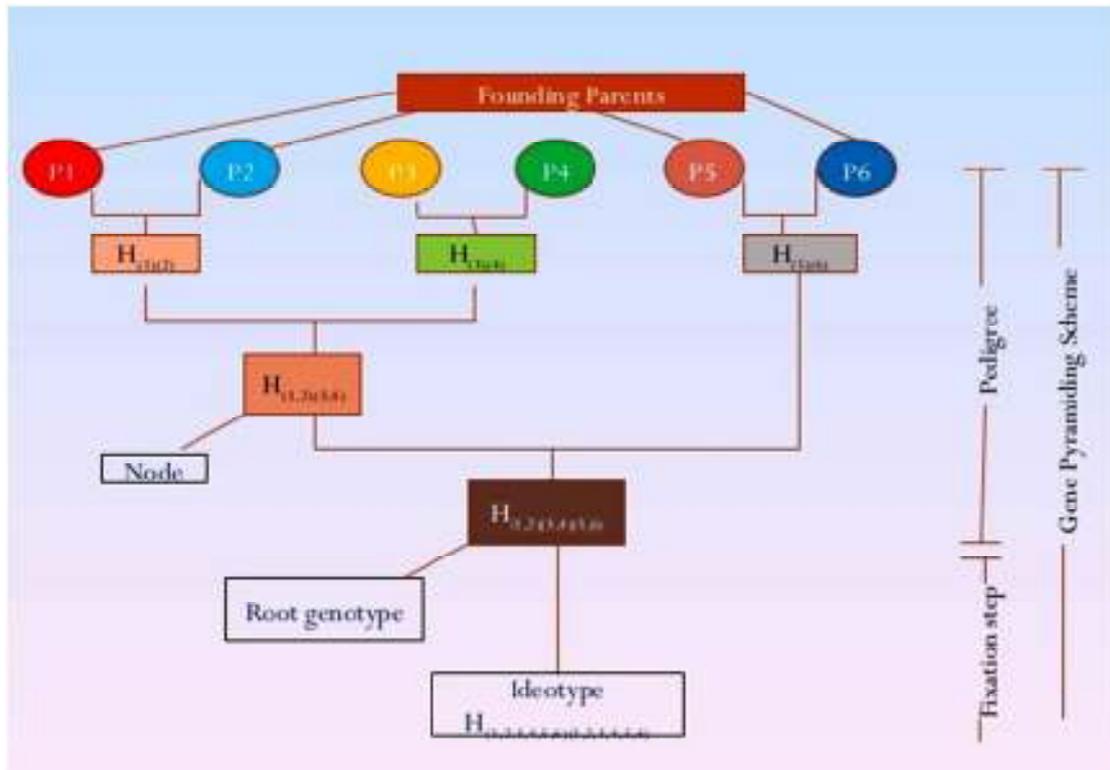


Figure 7 : Schéma de la stratégie de pyramidage *Joshi et Nayak, 2010*.

III.5.5. Sélection récurrente assistée par marqueur moléculaire

L'identification et la sélection de plusieurs régions génomiques impliquées dans l'expression de caractères complexes dans ce qu'on appelle l'assemblée ou le génotype performant (Ribaut et al., 2010). Bien que la sélection récurrente phénotypique soit bien convenue pour l'amélioration de caractères complexes, il était rarement utilisé en raison de la longueur de cycle. L'apparition des marqueurs moléculaires et la dissection des caractères en QTLs, à faciliter la sélection récurrente, qui implique le croisement de plusieurs générations successives en se basant sur leurs génotypes et de réaliser le génotype idéal (Peleman et Van Der Voort, 2003 ; Stam, 1995). Un ideotype ou un

génotype idéal peut être défini comme une mosaïque de segments chromosomiques (QTLs) portant les allèles favorables de plusieurs parents (Ribaut et Ragot, 2007).

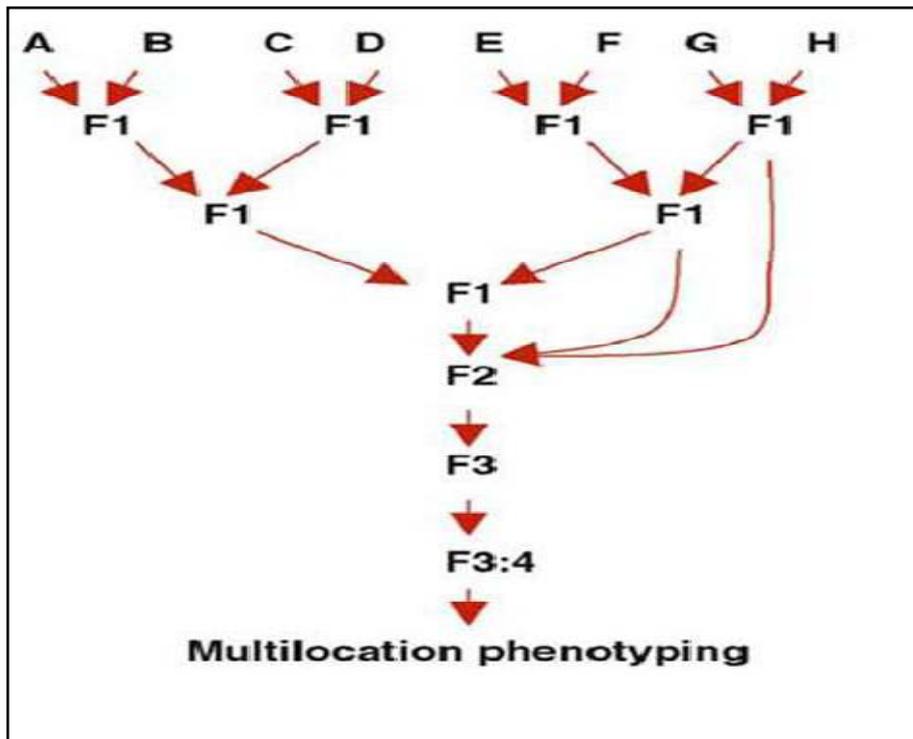


Figure 8 : Schéma de la stratégie de la sélection récurrente. *Ribaut et al., 2010*

III.5.6. Simple sélection à grande échelle assistée par marqueur (Single Large Scale-SAM)

La stratégie SLS-SAM a été proposée pour le développement de lignées élites combinant des allèles favorables présents dans les parents élites (Ribaut et Betran, 1999). Chaque individu de l'ensemble des lignées élites ayant le caractère d'intérêt est croisé avec un testeur, qui lui-même est une lignée élite déficiente de ce caractère. Une population appropriée de chaque croisement est analysée pour identifier l'allèle/QTL présent dans la lignée élite concernée pour le caractère cible. Les lignées élites

complétant l'ensemble d'allèle/QTL pour le caractère désiré sont identifiées et croisées pour obtenir une grande population ségrégant. Les marqueurs bornant les allèles/QTLs du caractère désiré (5cM) sont utilisés pour choisir des individus homozygotes pour allèles favorables.

IV. Les rouilles

IV.1. Définition

Les rouilles du blé sont parmi les maladies les plus répandues et les plus communes qui peuvent être rencontrées dans la plupart des secteurs du monde où le blé est cultivé. Trois espèces de rouilles s'attaquent au blé tendre: la rouille de tige (rouille noire) provoquée par *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, la rouille de feuille (rouille brune) par *Puccinia triticina*, et la rouille striée (rouille jaune) par *Puccinia striiformis*.



Figure 9 : rouille des tiges et la rouille des feuilles.

Wheat Disease Identification, 2011-<https://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp1552.p>

IV.2. Types de rouille

IV.2.1. Rouille jaune

La rouille striée, ou la rouille jaune causée par le *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, est une maladie fongique principalement foliaire, bien qu'elle puisse infecter d'autres tissus tels que la tige et l'épi C'est parmi les maladies du blé les plus importantes au monde (Chen, 2005 ; Evans et al., 2008).

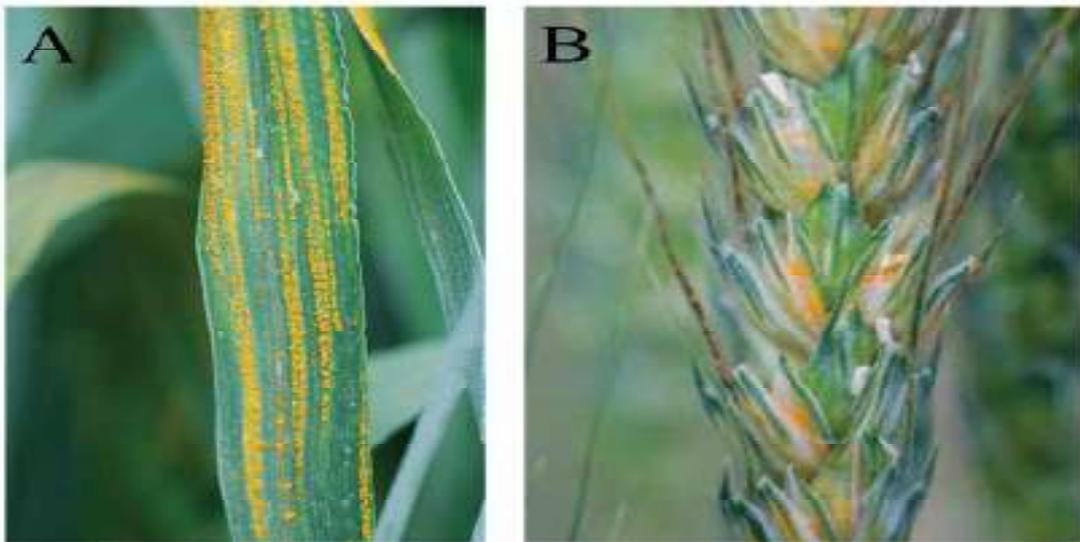


Figure 10 : la rouille jaune. Wheat Disease Identification, 2011.

IV.2.2. Rouille brune

La rouille brune du blé est le produit de l'interaction entre le champignon basidiomycète *Puccinia triticina* et le blé tendre (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*). La rouille brune attaque plus régulièrement et se trouve dans plusieurs régions du monde par rapport à la rouille jaune ou la rouille noire (Bolton et *al.* 2008).



Figure 11 : la rouille brune. Kolmer. 2013

IV.2.3. Rouille noire

La rouille noire ou la rouille de la tige est causée par *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. Historiquement la rouille noire a été la maladie la plus dévastatrice dans plusieurs pays du monde où le blé est cultivé.



Figure 12 : les symptômes de la rouille noire.
(A : spores brun-rougeâtre ovale ou allongées sur la tige, B : sur les feuilles, C :
Sur l'épi, D : Pustules de rouilles en lambeaux.).
wheat Disease Identification, 2011.

IV.3. Gènes de résistance aux rouilles

L'utilisation des gènes de résistance pour développer des variétés résistantes aux maladies est une alternative qui peut remplacer efficacement les autres méthodes, les pesticides ou les méthodes de contrôle chimiques employées pour protéger la récolte (Gururani et al, 2012). Les gènes de résistance aux maladies de rouilles, on parle de gènes **Lr** pour la rouille brune (Leaf rust), **Sr** pour la rouille noire (Stem rust), et **Yr** pour la rouille jaune (Strip rust).

Tableau I : Les principaux gènes de résistance contre la rouille.

Caractère	Gènes de résistance.	Nombre et Type de marqueurs
Résistance à la rouille jaune	Yr10	RFLP
	Yr15	1RFLP
		1RAPD
		1SSR
	Yr26	3SSR
YrH52	SSR	
Résistance à la rouille brune	Lr3	2RFLP
	Lr10	3RFLP
	Lr21	2RFLP
	Lr23	2RFLP
	Lr39	3SSR
	Lr37	STS
	Lr34	STS
Résistance durable à la rouille noire	Sr24	STS

CHAPITRE II :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'objectif de notre travail est la sélection des génotypes résistants aux rouilles par l'utilisation des marqueurs moléculaires chez deux populations F2 du blé tendre, issues de deux croisements.

Notre travail a été réalisé durant la période allant de mars 2018 à septembre 2018 au niveau de la station expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique Algérien (INRAA) de Mehdi Boualem (Baraki, Alger). L'essai a été réalisé dans une serre et au niveau du laboratoire d'Amélioration des Plantes dans le cadre du projet national de recherche d'amélioration du blé (PNAB).

I. Matériel végétal

Pour la réalisation de ce travail, nous avons évalué deux populations en ségrégation F2 issue de croisement entre variétés locales et variétés introduites. (Florence Aurore/Hidhab) et (Stylet /Florence Aurore) fournis au niveau de la station expérimentale. Leur choix a été motivé par les caractéristiques intéressantes qu'offrent les génotypes de ces variétés. L'origine et les caractéristiques sont représentées dans l'annexe 1.

II. Equipement et produits de laboratoire

Pour notre essai, nous avons utilisé des équipements et des produits disponibles au niveau du laboratoire de Physiologie Végétale et d'Amélioration des Plantes de l'INRAA (annexe 2).

III. Mise en place d'essai

Le 7 mars 2018 Plus de 200 grains de blé tendre ont été semés dans des plaques alvéolées dans une serre contrôlée (Température et photopériode).

- Croisement 1 (Fluronce Aurore/Hidhab) : 102 grains + les parents « parent Fluronce Aurore » et « parent Hidhab »
- Croisement 2 (Stylet /FluronceAurore) : 109 grains + les parents « parent Stylet » et « parent Fluroncee Aurore ».

Soit une graine par descendant, l'irrigation a été appliquée deux fois par semaine, afin d'éviter tout stress hydrique gênant le développement normal.

IV. Génotypage du blé tendre

IV.1. Prélèvement des feuilles (25 mars 2018)

Les feuilles sont prélevées au stade juvénile (stade 3 feuilles), elles sont coupées à l'aide de ciseaux stériles et posées dans les tubes Eppendorff, les tubes sont numérotés selon l'emplacement de chaque échantillon et ils sont mis dans l'étuve pour sécher à 65°C pendant 48heures.

IV.2. Broyage des feuilles

Les feuilles séchées sont broyées dans un broyeur à bille jusqu'à l'obtention d'une poudre puis conservées au congélateur (-80°C) jusqu'à l'extraction d'ADN.

IV.3. Extraction d'ADN

La méthode CTAB modifiée par Udupa et *al.*, (1999) a été utilisée pour l'extraction d'ADN. Ce protocole permet d'obtenir une grande quantité d'ADN de qualité satisfaisante. (annexe 3)

Pour chaque 100 ml de la solution CTAB, on rajoute 0.2% de β -mercaptoéthanol et on préchauffe la solution dans un bain marie à 65°C quelques secondes (tiède), 1400 μ l de CTAB sont apportés en deux fois (soit 700 μ l, puis 700 μ l) à chaque échantillon. Les échantillons sont mixés pendant 1 mn puis incubés pendant une heure à 65°C au bain marie avec agitation manuelle chaque 15 mn, sont ajoutés 600 μ l de chloroforme alcool isoamylique dans chaque tube et agités manuellement pendant 15 mn puis centrifugés à 1300g pendant 15mn ; 1ml de surnageant est prélevé dans un nouvel tube eppendorff pour chaque échantillon, il lui est rajouté 600 μ l d'isopropanol, mixé puis incubé pendant 60mn à -4°C. Après centrifugation à 1300g à 4°C pendant 10mn puis le surnageant est soigneusement jeté, il est rajouté 1ml d'éthanol 70%, les tubes sont centrifugés à 1300g à 4°C pendant 5 mn, l'éthanol est versé précieusement et les tubes sont laissés à sécher sous hotte; on reprend les culots d'ADN et on ajoute 100 μ l d'eau ultra pure et on conserve au congélateur.

V. Evaluation de la qualité et la quantité de l'ADN

La qualité et la quantité d'ADN ont été évaluées sur gel d'agarose à 1% (annexe 4) en comparant l'intensité de la bande de l'ADN avec la première bande du marqueur de taille. Le test a été réalisé sur gel d'agarose à 1%. Le gel est coulé dans la cuve, une fois refroidi, il est placé dans une cuve pleine de tampon de migration TBE $\times 1$ jusqu'à recouvrir légèrement le gel. Le mix d'ADN (3 μ l d'ADN + 4 μ l de H₂O et 3 μ l de bleu d'agarose) est déposé dans les puits : 7 μ l pour les échantillons d'ADN et 5 μ l pour marqueur de taille. La migration est effectuée en deux étapes à 80v au démarrage, puis augmentée à 120 v. La révélation des bandes a été réalisée avec BET puis observée sur une lampe UV.

VI. Amplification de deux marqueurs STS et un marqueur SSR

Est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur applied biosystem, le mix réactionnel pour chaque amplification est composé d'eau ultra pure, dNTPs(0.2mM) et MgCl₂(1.5mM). A ce mix, on rajoute l'amorce (0.5mM) d'ADN matrice et la Taq DNA polymérase, le volume final est 10 μ l selon le tableau :

Tableau II : composition de mélange réactionnel de la PCR.

	1 échantillon.
Eau ultra pure	5.375 μ l
5 \times Buffer	1 μ l
MgCl ₂	0.6 μ l
DNTP	1 μ l
Amorce	1 μ l
Taq polymérase	0.025 μ l

Les conditions d'amplification varient selon l'amorce utilisée. La température d'hybridation de chaque amorce dépend de T_m des paires d'amorces et le temps de chaque étapes dépend de la taille des amplifias. Le principe est le suivant :

- Pré-dénaturation à 94° C.

- Dénaturation:
 - Dénaturation à 94° C.
 - Hybridation d'amorce.
 - Elongation à 72° C.

- Finalisation d'élongation 72° C.

Un set de 3 paires d'amorces a été testé pour l'évaluation du polymorphisme des lignées de croisement (tableau III).

Tableau III : les marqueurs utilisés pour l'analyse de la population F2. (In vitrogène)

Locus	Localisation chromosomique	Amorce gauche 5' 3' Amorce droite 3' 5'	T° d'hybridation	Type de marqueur
Lr34	7D, bras court	AGCTATGCTTCACGAGGAAG CTCCTCTTTATATCGCGTCCC	55°	STS
Lr37	2A, bras court	AGGGGCTACTGACCAAGGCT TGCAGCTACAGCAGTATGTACA CA AAA	65°	STS
Sr 24	3D, bras long	GCGCTTGTTCCCTCACCTGCTCA TA GCGTATATTCTCTCGTCTTCTTG TTGGTT	56°	SSR

VII. Electrophorèse des produits de la réaction PCR

La révélation des échantillons a été réalisée sur gel d'acrylamide à 40% pour une meilleure résolution des bandes. Les plaques ont été nettoyées dans la solution de NaOH qui élimine toute trace du gel restant. Le coulage de gel est effectué après un bon serrage des plaques. Une fois le gel est polymérisé le peigne est hotté. Les plaques sont déposées dans une solution de tampon TBE x5.

Le mix PCR (10 μ l de produit PCR +5 μ l de bleu acrylamide) est déposé dans chaque puits. La migration s'est déroulée sous une tension de 300 volts pendant 2 heures.

La visualisation des bandes a été réalisée dans des bains de BET 10%. L'appareil lampe UV Trans-illuminateur a été utilisé pour la visualisation des amplifias des amorces.

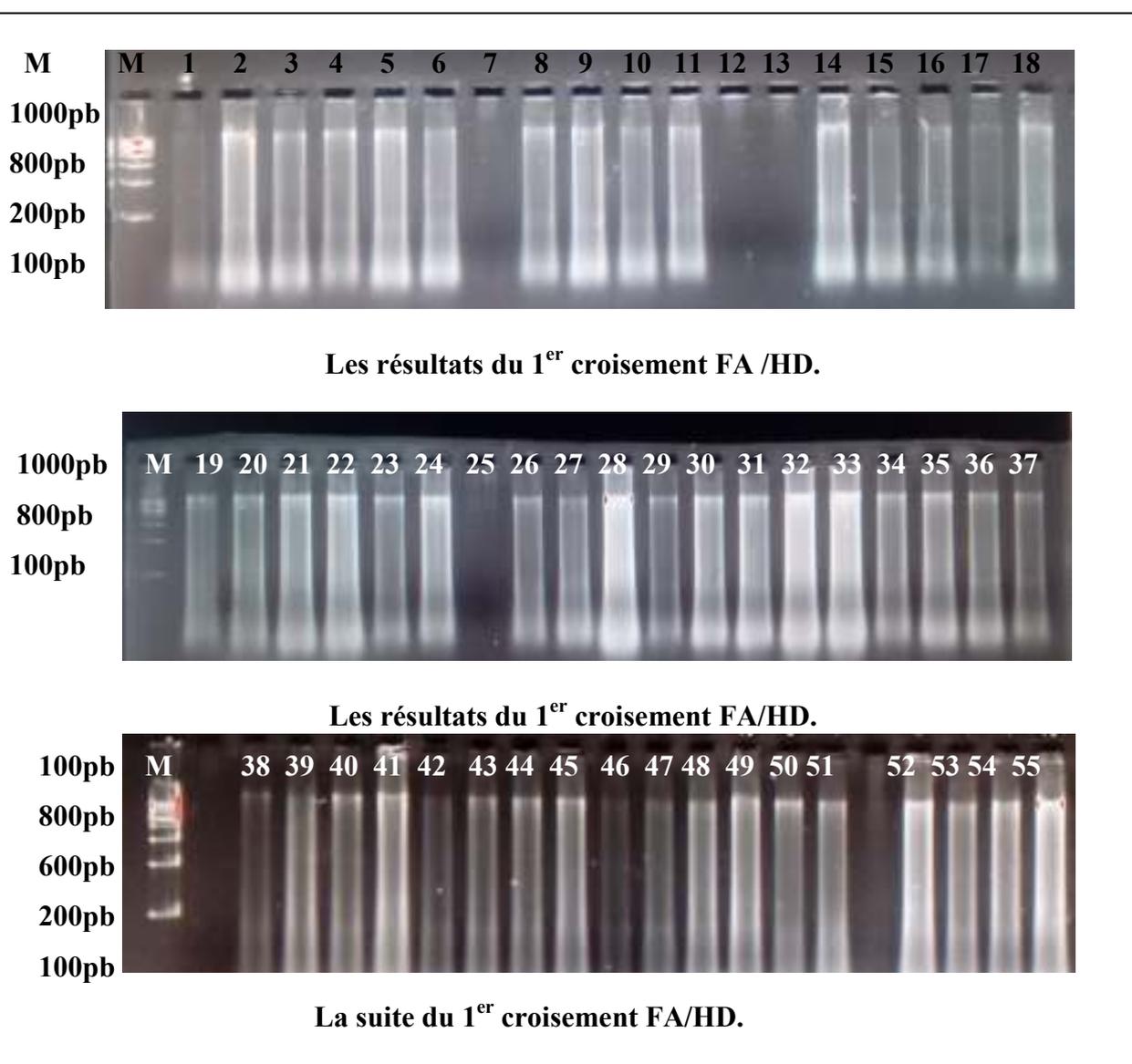
CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Analyse de la quantification d'ADN

I.1. Analyse des échantillons sur gel d'agarose

L'ADN extrait des différents échantillons avec des parents (FA, HD et ST) ont été quantifiés sur gel d'Agarose à 1 %, l'objectif est la confirmation de la qualité et la quantité d'ADN. La visualisation des gels montre la présence d'ADN pour la majorité des échantillons de nos croisements (102 FA/HD) et (109 ST/FA) de bonne qualité et en quantité suffisante pour les prochaines analyses.

Dans ces gels (Figures 15 et 16) nous montrons que : y'a 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.*, (1999).



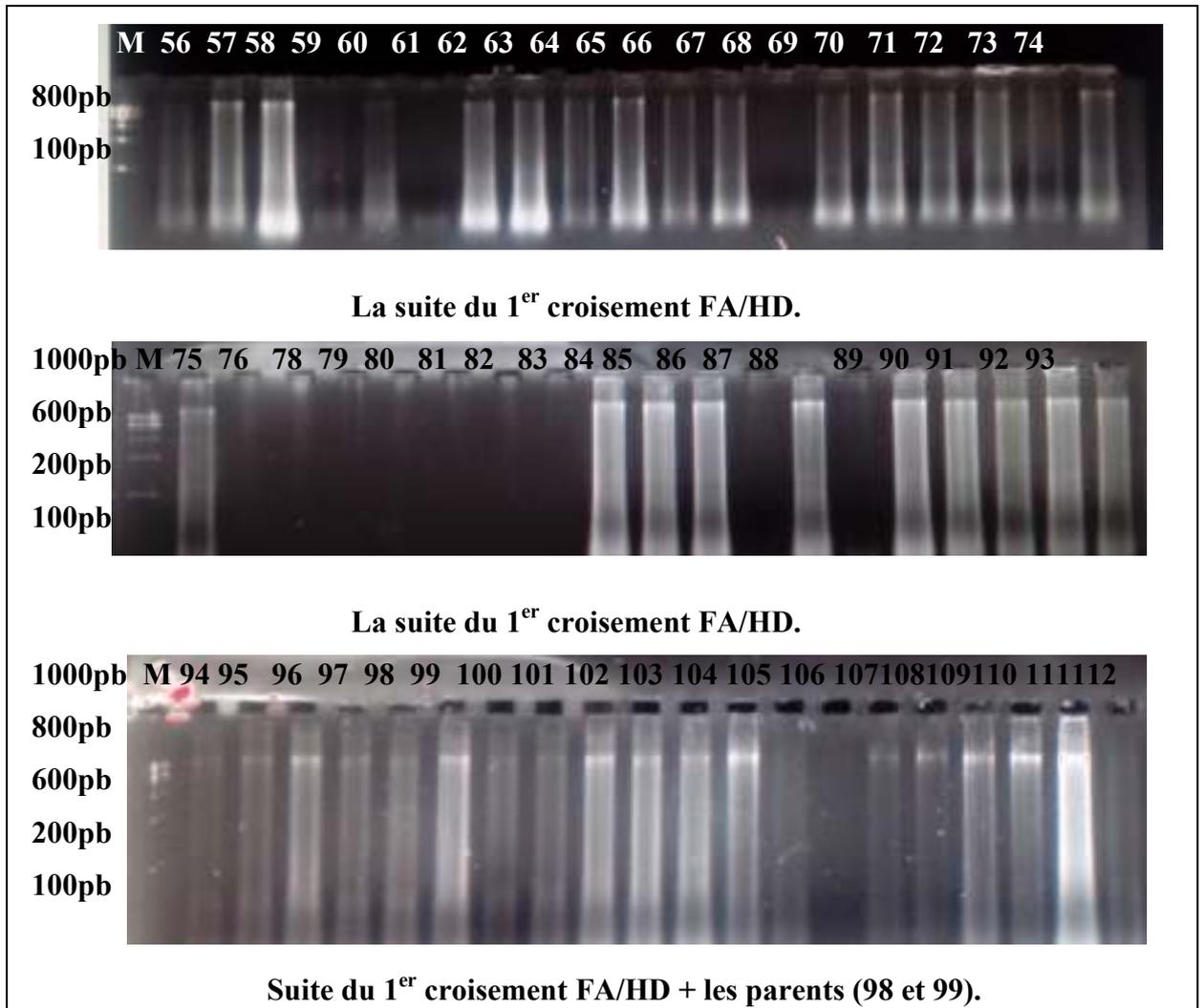


Figure 13 : Analyse d'extraction d'ADN génomique totale du 1^{er} croisement FA/HD sur gel d'agarose a 1%, 100 volts pour migration pendant 1h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 1Kb

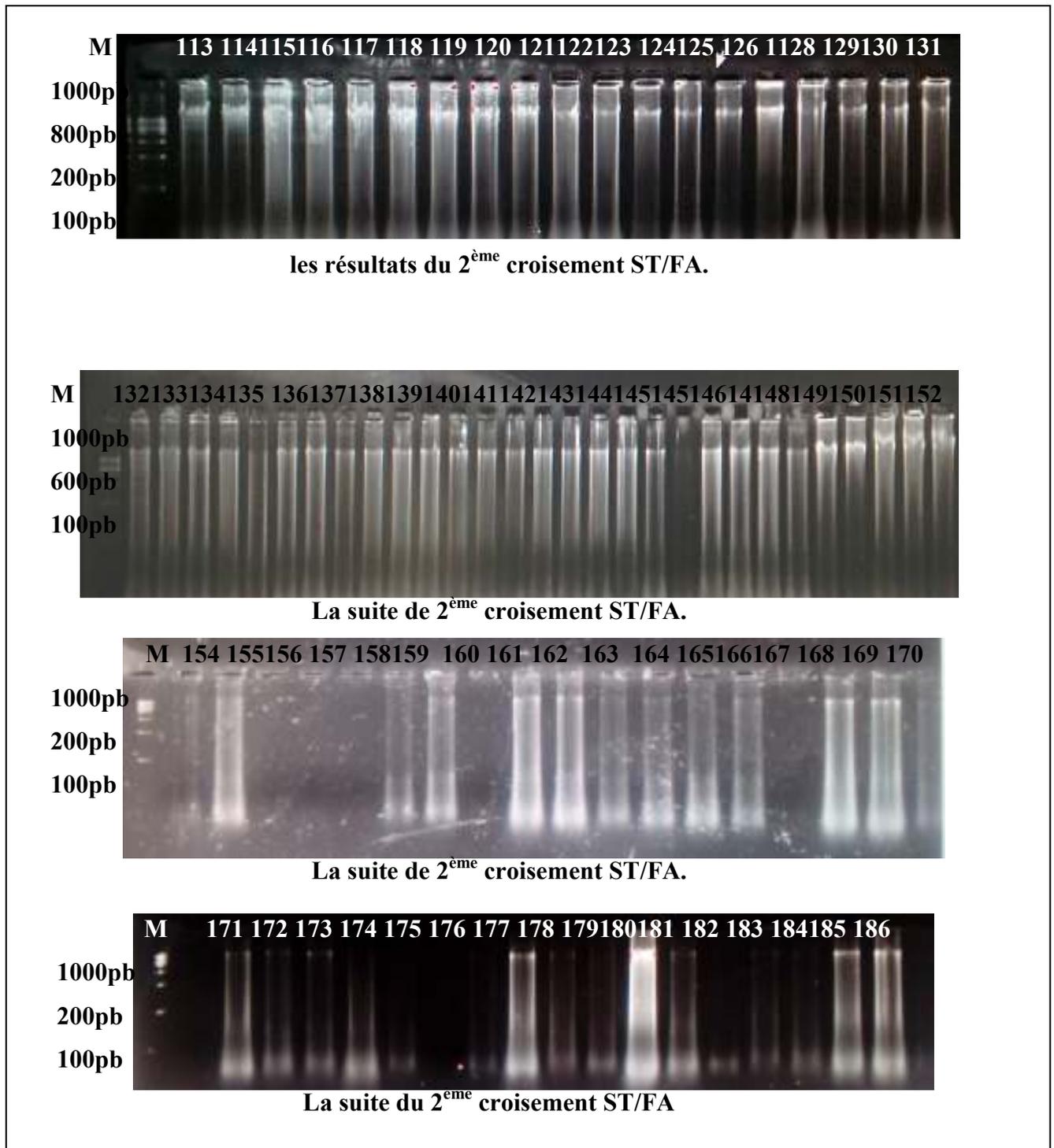


Figure 14: Analyse d'extraction d'ADN génomique totale du 2^{ème} croisement ST /FA sur gel d'agarose a 1%, 100 volts pour migration pendant 1h visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 1Kb.

II. Analyse de polymorphisme des génotypes avec 3 marqueurs

Pour cette analyse, les hybrides de F2 (les graines issues de croisement entre variété FA et variété ST) ont été semés dans les plaques alvéolées et les feuilles ont été prélevées au stade juvénile, l'extraction de l'ADN a été réalisée au CTAB selon Udupa *et al.*, (1999).

Une seule population a été analysé (Fluronce Aurore/Stylet) pour trois gènes Lr34, Lr37 et Sr24 avec des marqueurs STS et SSR. Les résultats sont exprimés sous forme d'amplification et ils sont présentés au profil électrophorétique comme suit :

II.1. Analyse des résultats des génotypes pour le gène de résistance à la rouille brune *Lr34* avec le marqueur STS

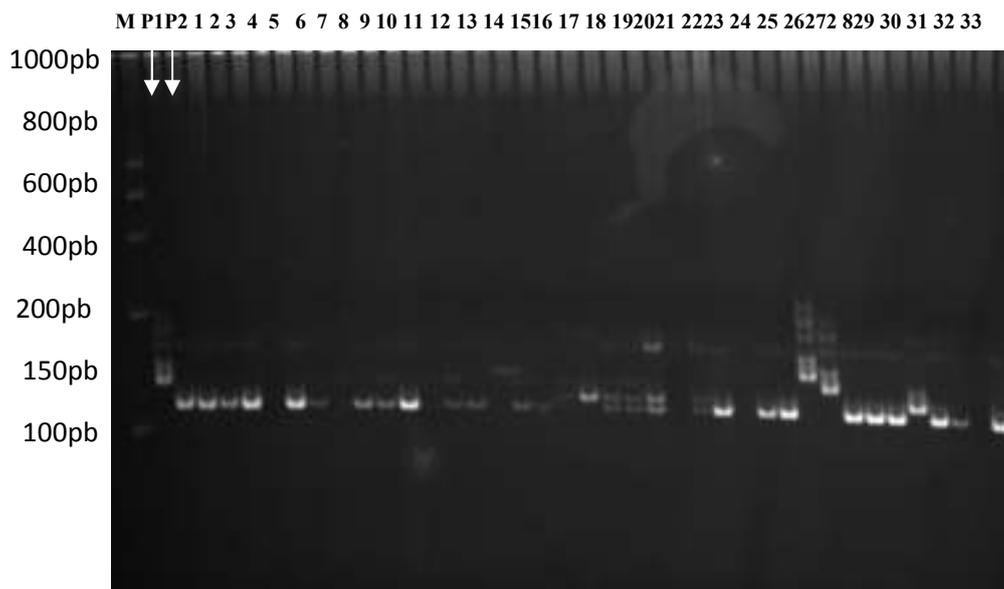


Figure 15 : Polymorphisme des génotypes avec le marqueur STS pour le gène *Lr34*. Analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ,300 volts pour migration pendant 2h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.

L'analyse du gel d'acrylamide du gène *Lr34* (Figure 17) montre la présence des amplifications de la bande à environ 150pb pour la majorité des échantillons. Nous pouvons observer un polymorphisme entre les individus de la population des bandes P1 et P2 et certaines bandes ont amplifié à P1 et d'autre a P2.

Ce résultat supposera que les descendants de la population F2 résistent à la rouille, nous pouvons supposer que ce gène est dominant. L'absence d'amplification à 150pb indique que le descendant est sensible à la rouille.

Plus de 60 gènes Lr et QTL ont été décrits dans le blé (McIntoch et al., 2005). Toutefois, beaucoup d'entre eux sont des gènes spécifiques à la race et actuellement plusieurs sont utilisés par les améliorateurs. *Lr34* a été décrit la première fois en 1966 dans le cultivar Frontana. Il est situé sur le bras court du chromosome 7D (Schnurbusch et al, 2004) à proximité de locus Xgwm295.

Un petit groupe de gènes de résistance à la rouille des feuilles est connu sous le nom de «gènes de rouille lente», tels que *Lr34*. Ils offrent une résistance durable et non spécifique aux plantes adultes, mais leur effet est plus réduit que celui des gènes spécifiques à la race. *Lr34* a été cloné et il a été montré qu'il s'agit du même gène qu'*Yr18* (résistance à la rouille) (Huerta 2003).

II.2. Analyse des résultats des génotypes pour le gène de résistance à la rouille brune *Lr37* avec le marqueur STS

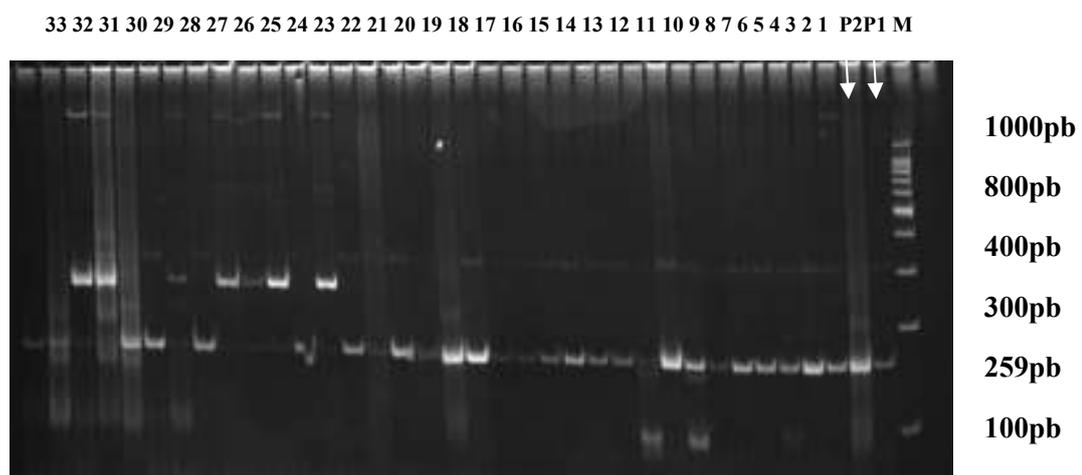


Figure 16: Polymorphisme des génotypes avec marqueur STS pour le gène *Lr37*. Analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, 300volts pour migration pendant 2h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.

L'analyse du gel d'acrylamide du gène *Lr37* (Figure 18) montre la présence des amplifications de la bande à environ 259pb pour la majorité des individus de population et pour les parents (P1 et P2). Ce résultat suppose que ces descendants sont résistants à la rouille brune.

La résistance à la rouille brune (rouille des feuilles) chez le blé tendre est contrôlée par le gène *Lr37*. Ce gène fourni à la plante une large résistance à toutes les races de rouille (*Puccinia triticina*) il est localisé sur le bras court du chromosome 2A. (Robert *et al.*, 1999).

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* (Bariana et McIntosh, 1993; Jahier *et al.*, 1996 ; Seah *et al.*, 2000) qui confèrent une résistance à la rouille jaune (*Puccinia striiformis* Oest F. sp . tritici), la rouille noire (*Puccinia graminis* Pers. Eriks tritici f.sp. et E. Henn.) ils peuvent être très utiles dans le développement de nouvelles variétés de blé. *Lr37* réduit significativement la gravité de l'infection par la rouille brune. L'amélioration de la résistance des lignées isogéniques *Lr37* a entraîné des augmentations significatives du rendement (Helguera *et al.*, 2003).

II.3. Analyse des résultats des génotypes pour le gène de résistance à la rouille noire *Sr24* pour le marqueur X bar71(SSR)

L'analyse du gel d'acrylamide du gène de résistance à la rouille noire *Sr24* (Figure 19) montre la présence des amplifications de la bande 103 et la bande 85. Ce polymorphisme est observé chez la plupart des individus de la population et les parents. Ce résultat supposera que les descendants résistent à la rouille, ils ont reçu ce gène de leurs parents. L'absence d'amplification indique que ces individus sont sensibles à la rouille.

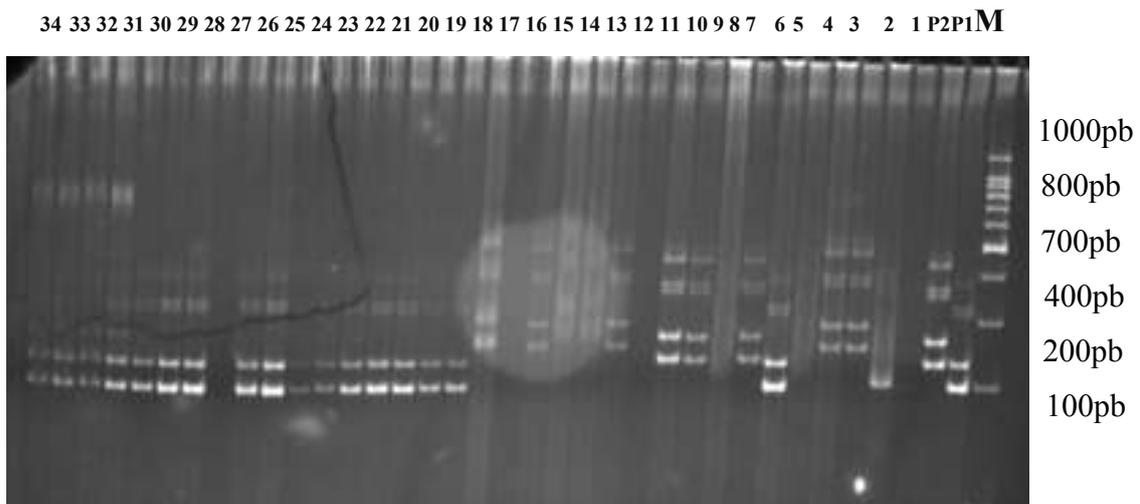


Figure17: polymorphisme des génotypes avec marqueur Xbar71 pour le gène *Sr24*. Analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide ,300volts pour migration pendant 2h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb.

Sr24 offre une résistance à la plupart des races de rouille de la tige, y compris la race virulente Ug99 (TTKSK) mais pas à la rouille virulente TTKST.

Sr24 résidait sur le chromosome 3D, *Sr24* a également été découvert chez la variété de blé Amigo (smith et al 1968).

Il existe plusieurs marqueurs moléculaires différents disponibles pour *Sr24*, y compris un SSR (Xbar71), est le marqueur le plus distal cartographié sur le bras long du chromosome 3D du blé et toutes les variétés porteuses de *Sr24* ont amplifié une paire de bandes de diagnostic (103pb et 85pb). Alors que la plupart des lignées sensibles dépourvues de *Sr24* ont amplifié un fragment de 107pb, certaines variétés de blé non *Sr24* portaient des allèles différents (MASwheat. Rsistance à la rouille de la tige).

Conclusion

Les efforts de recherche sur le blé sont à la mesure de l'importance économique de cette culture. Les stressés biotiques et abiotiques sont les principales contraintes économique qui menacent considérablement la culture et la production de cette céréale.

La sélection assistée par marqueur chez le blé eut également aidé à accumuler dans un même génome des gènes de résistance complémentaires pour une même contrainte, de façon à obtenir une résistance multigénique plus stable. De plus des marqueurs moléculaires et les différentes techniques offrent la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de la sélection. L'amélioration du blé tendre est actuellement longue et continue d'évaluer.

Ce modeste travail est une initiation à la caractérisation moléculaire de deux populations F2 (Florence Aurore/Hidhab) et (Stylet/Florence Aurore) en ségrégation de blé tendre.

Notre démarche à été de chercher des gènes de résistance à la rouille (*Lr37*, localisé sur le bras court du chromosome 2A. *Lr34*, localisé sur le bras court du chromosome 7D. *Sr24*, localisé sur le bras long du chromosome 3D) liés à des marqueurs moléculaire (SSR et STS) dans une population F2 (FA/HD) et (ST/FA).

Les résultats préliminaires de cette analyse ont montré des amplifications pour les caractères de résistance à la rouille brune (*Lr34*), la rouille noire (*Sr 24*) et la rouille brune (*Lr37*) pour la majorité des individus de la population F2 en ségrégation(FA/ST) . Donc l'utilisation des marqueurs moléculaires nous a permis de cribler notre population F2.

Au terme de ce travail, on pourrait donc dire que cette étude constitue un essai préliminaire qui nous a, toutefois, permis d'évaluer la population F2 (ST/FA) pour la résistance aux rouilles. Il serait nécessaire et intéressant de poursuivre ce travail par le criblage de la 2^{ème} population, en utilisant d'autres marqueurs moléculaires.

Ces essais devront être répétés et confirmés, mais ils sont néanmoins très encourageants quant à la validité de leurs résultats.

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

Références bibliographiques

1. Allard R. W. (1999). Principles of plant breeding, 2nd edn. Wiley, New York, 264
2. Ayed, B., Hassen, A., Gtari, M., Jedidi, N., Saidi, N., Jaoua, L., et Murano, F. Evaluation de l'efficacité de trois méthodes d'extraction d'ADN de la biomasse microbienne totale du compost.
3. Benderradji, L. Selection In vitro pour la tolérance aux stress salin et thermique chez le ble tendre (*Triticum aestivum* L.).
4. Bolton M. D., Kolmer J. A., Garvin D. F. (2008). Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* 9: 563–575.
5. Botstein D., White RL., Skolnick M., Dvies RW. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32, p. 314 331.
6. Catalogue of gene symbols for wheat. McIntosh RA, Yamazaki Y, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers R, Appels R. In: KOMUGI, Integrated wheat Science Database.
7. Cenci A., D'Ovidio R., Tanzarella OA., Ceoloni C., Porceddu E. (1999). Identification of molecular markers linked to PM13, an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98 (3–4), p. 448–454.
8. Chamma, A., et Viallet, P. C. R. (1970). Détermination du moment dipolaire d'une molécule dans un état excité singulet. *CR Acad Sci Paris Ser C*, 270, 1901-1904.
9. Chen X. M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 314-337.
10. Collard B. C. Y., Mackill D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 557-572.

11. Connaissances et attitudes du consommateur Egyptien et Français envers les Aliments Génétiquement Modifiés sur le marchés (Étude comparative).Thèse de Doctorat. Faculté de sciences humaines et sociales Université Paris V- René Descartes - Sorbonne-Paris – France.
12. Debiton, C. (2010). Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
13. Dekkers J. C. M., Hospital F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Review Genetics* 3: 22-32.
14. Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. Schnurbusch T, Paillard S, Schori A, Messmer M, Schachermayr G, Winzeler M, Keller B. **In:** *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108:477-484.
15. DOUMANDJI, A., DOUMANDJI-MITICHE, B. et SALAHEDDINE, D., 2003. Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, pp. 1-22.
16. Eagles H. A., Bariana H. S., Ogonnaya F. C., Rebetzke G. J., Henry R. J., Henschke P. H., Carter M. (2001). Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1349-1356.
17. Eckardt N. A. (2001). A sense of self: The role of DNA sequence elimination in allopolyploidization. *Plant Cell* 13: 1699-1704.
18. Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. Singh RP, Huerta-Espino J. **In:** *Euphytica*, 2003, 129:371-376.
19. El Hadrami, I., El Bellaj, M., El Idrissi, A., J'Aiti, F., El Jaafari, S., et Daayf, F. (1998). Biotechnologies végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine. *Cahiers Agricultures*, 7(6), 463-468.

20. Evans K., Israelsen C., Pace M., Barnhill J. (2008). Wheat Stripe Rust. In: Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory.
21. Feldman M., Lupton F. G. H., Miller T. E. (1995). Wheats. In Evolution of Crops, 2nd ed., J. Smartt and N.W. Simmonds (ed.) (London: Longman Scientific), p. 184-192.
22. Frisch M., Bohn M., Melchinger A. E. (1999). Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Science* 39: 1295–1301.
23. G. DOUSSINAULT Cent ans de sélection du blé en France et en Belgique 1995.
24. GACEM, M. A. (2011). Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké (Doctoral dissertation).
25. Gallais, A. (2015). Comprendre l'amélioration des plantes: Enjeux, méthodes, objectifs et critères de sélection. Quae.
26. Gupta P. K., Langridge P., Mir R.R. (2010). Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Molecular Breeding* 26: 145–161.
27. Gururani M. A., Venkatesh J., Upadhyaya C. P., Nookaraju A., Pandey S. K., Park S. W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78:51-65.
28. Hales N, Rush C (2016) *Algeria Grain and Feed Annual* 9: 1-11.
29. Hébert, A., et Rawski, C. (2013). Cultivons la biodiversité.
30. Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhongqi L. and Dubcovsky J., 2003 - PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *In: Crop Science*, 43:1839-1847.
31. Helguera M., Khan IA., Dubcovsky J. (2000). Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene Lr47. *Theor. Appl. Genet.* 101 (4), p. 625–631.
32. Henkrar, F. (2017). L'application des marqueurs moléculaires dans l'amélioration génétique du blé marocain: diversité, caractérisation génétique et sélection assistée par marqueurs des gènes de résistance à la rouille, semi-nanisme et qualité boulangère.

33. Hospital F. (2001). Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker assisted backcross programs. *Genetics* 158: 1363-1379
34. Huang S., Sirikhachornkit A., Su X. J., Faris J., Gill B., Haselkorn R., Gornicki P. (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 8133-8138.
35. Jones D. G., Clifford, B. C. (1983). *Cereal Diseases: Their Pathology and Control*, 2nd edn. Wiley and Sons. Chichester, UK.
36. Joshi R. K., Nayak S. (2010). Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 5: 51-60.
37. Kloppfers F. J., Pretorius Z. A. (1997). Effects of combinations amongst genes Lr13, Lr34 and Lr37 on components of resistance in wheat to leaf rust. *Plant Pathology* 46: 737-750.
38. Lafon, J. P., Tharaud-Prayer, C., et Levy, C. (1988). *Biologie des plantes cultivées*. Tome II. Technique et documentation. Lavoisier. PARIS. (172 p).
39. Lambert C ; 2006- création-réalisation .Semences et biodiversité. préservation et enrichissement de la biodiversité par la filière semences. GNIS.
40. Lammerts van Bueren E.T., Backes G., de Vriend H., Ostergard H. (2010). The role of molecular markers and marker assisted selection in breeding for organic agriculture. *Euphytica* 175:51-64.
41. Langridge P., Lagudah ES., Holton TA., Appels R., Sharp PJ., Chalmers KJ. (2001). Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 52, p. 1043-1077.
42. Liu SX., Griffey CA., Saghai Maroof MA. (1998). Preliminary report on molecular marker analysis of adult plant resistance to powdery mildew in winter wheat Massey. In Slinkard AE. (ed.), 9th Int. Wheat Genet. Symp. 3. Saskatoon, Canada: Univ. Extension Press, Univ. of Saskatchewan, p. 132-134.

43. Lübberstedt T., Zein I., Andersen J.R., Wenzel G., Krützfeldt B., Eder J., Ouzunova M., Chun S. (2005). Development and application of functional markers in maize. *Euphytica* 146:101–108.
44. Madr., 2011 - *Bulletin statistiques de la campagne 2009-2010*. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, 23 p.
45. MASwheat. Rsistance à la rouille de la tige. Enregistrement de l'agent blé. Smith EL, Schlehner AM, Jeune HC Jr, Edwards LH. In: *Crop Science*, 1968, 8: 511-512.
46. Maubon, D., Brenier-Pinchart, M. P., Fricker-Hidalgo, H., & Pelloux, H. (2007). Apport de la PCR quantitative dans le diagnostic de la toxoplasmose: la voie de la standardisation?. *Pathologie Biologie*, 55(6), 304-311.
47. Mohan M., Suresh N., Bhagwat A., Krishna T.G., Masahiro Y., Bhatia C.R., Sasaki T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3:87-103.
48. Mohler V., Hsam LSK., Zeller FJ., Wenzel G. (2001). An STS marker distinguishing the rye-derived powdery mildew resistance alleles at the Pm8/Pm17 locus of common wheat. *Plant Breed.* 120, p. 448–450.
49. Moreau L., Charcosset A., Gallais A. (2001). Efficiency of marker-assisted-selection compared with conventional selection. *OCL-OI. Crops Gras Lipides* 8: 496-501.
50. Morgante M., Olivieri AM. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3 (1), p. 175–182.
51. Moullet O., Fossati D., Mascher F., A. Schori, Guadagnuolo R. (2008). Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales. *Revue suisse d'Agriculture* 4: 133-138.
52. Myburg AA., Cawood M., WingfieldBD, Botha A M. (1998). Development of RAPD and SCAR markers linked to Russian wheat aphid resistance gene Dn2 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 96, p. 1162–1169.
53. Najimi, B., El Jaafari, S., Jlibène, M., et Jacquemin, J. M. (2003). Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 7(1), 17-35.

54. Nesbitt M. and Samuel D. (1995). From staple crop to extinction? The archeology and history of the hulled wheats. In *Hulled Wheats. Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats*, 1st ed., S. Padulosi, K. Hammer, and J. Heller (ed.) (Rome: International Plant Genetic Resources Institute), p. 0-99.
55. Nicolino, F. (2007). *La faim, la bagnole, le blé et nous: Une dénonciation des biocarburants*. Fayard.
56. Oukkal M. (2016). *Caractérisation morphologique et moléculaire de 23 génotypes de blé tendre (triticum aestivum)*.
57. Peleman J. D., Van Der Voort J. R. (2003). Breeding by design. *Trends in Plant Science* 7: 330–334.
58. Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust pathogens in wheat. Seah S, Spielmeyer W, Jahier J, Sivasithamparam K, Lagudah ES. In: *Molecular and Plant Microbe Interactions*, 2000, 13: 334-341.
59. Ribaut J. -M., Betran J. (1999). Single large-scale marker assisted selection (SLS-MAS). *Molecular Breeding* 5:531–541.
60. Ribaut J. -M., de Vicente M. C., Delannay X. (2010). Molecular breeding in developing countries: challenges and perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* 13:213–218.
61. Ribaut J. -M., Ragot M. (2007). Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *Journal of Experimental Botany* 58: 351–360.
62. Robert O., Abelard C. and Dedryver F., 1999 - Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat. In: *Molecular Breeding* .
63. Schachemayr GM., Messmer MM., Feuillet C. , Wi n z e l e r H., Wi n z e l e r M., Keller B. (1995). Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90, p. 982–990.

64. Schachemayr GM., Siedler H., Gale MD., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. (1994). Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 rust gene in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88, p. 110–115.
65. Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. (1999). Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene Lr35 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 99 (3–4), p. 554–560.
66. Shaner G. (1987). Wheat diseases. In: *Wheat and Wheat Improvement*, 2nd edn, Heyne, E. G. (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisc., USA, p.508-624.
67. Shanti M. L., George M. L. C., Cruz C. M. V., Bernardo M. A., Nelson R. J., Leung H., Reddy J. N., Sridhar R. (2001). Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in eastern India. *Plant Disease* 85: 506–512.
68. Singh S., Sidhu J. S., Huang N., Vikal Y., Li Z., Brar D. S., Dhaliwal H. S., Khush G. S. (2001). Pyramiding three bacterial blight resistance genes (Xa5, Xa13 and Xa21) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1011–1015.
69. Stam P. (1995). Marker-assisted breeding. In: Van Ooijen J. W., Jansen J. (ed.) *Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers. Proceedings of the Ninth Meeting of the EUCARPIA Section Biometrics in Plant Breeding.* Wageningen, The Netherlands: CPRO-DLO, p. 32–44.
70. Stoskopf N. C., Tomes D. T., Christie B. R. (1993). *Plant breeding: theory and practice.* Westview Press Inc. San Francisco, Oxford, 300 p.
71. Taupier-Létage B (2005) La qualité des blés panifiables en agriculture biologique. *Alter Agri* 71 :10-14.
72. Tiollais, P., Galibert, F., Lepetit, A., & Auger, M. A. (1972). L'électrophorèse des acides ribonucléiques en gel de polyacrylamide. *Biochimie*, 54(3), 339-354.
73. Tiwari V, Shoran J. (2010). Growth and production of wheat. In *Soils, Plant Growth and Crop Production- Vol.I.* Verheye W.H. (ed.), EOLSS Publishers, p. 298–330.
74. Udupa S.S., 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. *Molecular and General Genetics*, 261: 354–363.

75. USDA Foreign Agricultural Service (2015). <http://www.fas.usda.gov/data/worldagricultural-production>. Accessed 20 July 2015.
76. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23, p. 4407–4414.
77. Williams JGK., Kubelik AR., Livak KJ., Rafalski J A . , Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 (22), p. 6531–6533.
78. Zillinsky F. J. (1983). Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification. Mexico, D.F CIMMYT, p. 141.

Les annexes :

Annexe 1: identification des hybrides.

Variété	Origine	Caractéristiques
Florence Aurore	Locale (Algérienne)	Résistance aux rouilles brune et jaune (Lr,Yr)
Hidhab	Locale (Algérienne)	Sensible aux rouilles brune et jaune
Stylet	Introduite (Australienne)	Résistance aux rouilles brune, jaune et noire(Sr,Yr,Lr)

Annexe 2 : équipement et produits de laboratoire.

Matériel : bécher ; Tube Eppendorf ; Eprouvette graduée ; Entonnoir ; Micropipette ; Papier absorbant ; papier aluminium ; ciseau ; pince ; plaque PCR ; papier filtre ; barreau magnétique ; icones ; plaques alvéolées.

Appareils : Bain marie ; Centrifugeuse ; Congélateur ; Hotte ; Agitateur ; Balance ; Cuve ; Termocycleur ; Etuve ; Autoclave ; Appareil à glace ; Agitateur ; Réfrigérateur ; Lampe ultra-violet ; Ph mètre.

Les solutions et produits : Eau distillée stérilisée ; CTAB ; NACL ; EDTA ; TRIS ; Mercraproéthanol ; Chloroforme ; Isopropanol ; Ethanol 70% ; Eau ultra pure ; TBE ; APS ; Master mixe ; NAOH ; Marqueur ; BET ; Acrylamide ; Alcool.

Annexe 3 : Mode de préparation des solutions.

Solutions.	Mode de préparation
1M Tris-Hcl (Ph=8).	Pour 100ml : -Tris base : 12.114g -Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml -Ajuster le pH avec le HCl jusqu'à pH=8
5M Nacl.	Pour 250ml : -Nacl : 73.05g -Compléter par l'eau distillée jusqu'à 250 ml
0.5M EDTA (Ph=8).	Pour 100ml - EDTA : 18.6g -Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml -Ajuster le PH avec le NaOH jusqu'à pH=8
CTAB.	Pour 100ml : -EDTA : 4ml -Nacl : 28ml -Tris : 10ml -CTAB : 2g -Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml
TBE x5.	Pour 1L : -Acide borique : 27.5g -Tris base : 54g -EDTA (pH=8) :20ml -Compléter par l'eau distillée jusqu'à 1L
NAOH.	-NAOH : 40g -L'eau distillée : 1L
APS 10%.	-Ammonium persulfate : 1g -L'eau distillée : 10ml
BET.	-Bromure d'éthidium (100g/ml) :100 µL -Eau distillée : ajuster jusqu'à 1L

Annexe 4 : Préparation des gels

➤ Gel d'Agarose 1%

- Pour grande cuve :
- Agarose : 3g
- TBE x5 :30ml
- Compléter par l'eau distillée jusqu'à 300ml.

➤ Gel d'acrylamide 40%

- Acrylamide 40%:22,5ml
- TBE x5: 15ml
- APS: 900µl
- TEMAD: 220µl
- l'eau distillée 112,5ml.

Annexe 5 : Protocol de préparation de gel d'agarose.

L'électrophorèse d'ADN est constituée de cinq étapes importantes :

1) Préparation de gel d'agarose :

Le gel est constitué de 3g d'agarose et 30ml d'un tampon TBE (5×) puis compléter jusqu'à un 300 ml avec d'eau distillée. Porter à ébullition la solution aux micro-ondes jusqu'à ce que celle-ci soit transparente, refroidir le gel. Pour cela mettre en place le moule et le peigne puis y couler l'agarose fondu pour obtenir le gel. Laisser ensuite refroidir jusqu'à solidification. Laisser le peigne en place jusqu'au début du dépôt ADN. Au moment du dépôt ADN, enlever le peigne et placer le gel dans la cuve à électrophorèse avec son support en veillant à ce que les puits du gel soient orientés du côté de l'électrode négative de la cuve (borne noire).

2) Dépôt de l'ADN dans les puits :

Remplir la cuve de tampon TBE1x jusqu'à recouvrir légèrement le gel. Les fragments d'ADN sont mélangés avec du bleu d'agarose (10 µL d'ADN +5 µL de bleu d'agarose). Le bleu d'agarose permet d'alourdir l'ADN pour qu'il tombe bien au fond des puits lors des dépôts et de suivre l'avancée de la migration car un de ses constituants (le bleu) marque le front de migration des plus petits morceaux d'ADN. Déposer à l'aide d'une micropipette 7 µL d'ADN au fond de chaque puits. Les échantillons sont également déposés ainsi qu'un marqueur de taille avec des fragments d'ADN de taille connue.

3) Migration :

Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur. Préférer un réglage de la tension à 100V. En utilisant un voltage plus élevé, la séparation des bandes lors de

la révélation sera moins nette. Plus la tension est élevée et plus la migration est rapide mais elle devient moins précise.

4) Coloration :

Retirer délicatement le gel de la cuve et le placer dans un récipient, rincer le gel à l'eau distillée. Recouvrir le gel de solution BET et laisser le gel dans ce bain de colorant pendant 30 minutes placer sur Agitateur balance, afin d'homogénéiser la coloration, puis décolorer le gel. Rince le gel dans un bain d'eau ou bien à l'eau courante sous le robinet et ils seront prêts à la lecture.

5) Observation :

Placer le gel sur une lampe UV Trans-illuminateur pour une observation par la classe entière.

Annexe 6 : Préparation du bleu de dépôt

Bleu d'agarose	Bleu da'acrylamide
Tris-Hcl (ph=8) : 0,5 ml	Formide : 24,75 ml
EDTA (ph=8) : 0,1 ml	Bleu de bromophénol : 12,5 mg
Glycerole : 5 ml	Xylene cyanole (sigma) : 12,5 mg
Bleu de bromophénol : 20 mg	Eau distillée : 1,25 ml