

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**Université Frères MENTOURI Constantine**



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Ecologie Végétale

**N° d'ordre** : 79 / DS / 2017

**Série** : 10 / Eco / 2017

## **Thèse**

Présentée, en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Filière : Biotechnologies végétales

Option : Biotechnologies végétales

Thème

## **Le genre *Vicia* L. en Algérie Caractérisation de 11 taxa naturels : Approches éco-géographique, morphologique, biochimique et moléculaire**

Présentée par : Sakina BECHKRI

Soutenu le : 15 / 05 / 2017

Devant le jury :

<b>Présidente</b> : Dalila SATTI .....	Professeur. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Rapporteur</b> : Douadi KHELIFI .....	Professeur. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Examineur</b> : Mohammed Abdelhafid HAMIDECHI...	Professeur. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Examineur</b> : Miloud HAFSI .....	Professeur. Université Sétif 1
<b>Examineur</b> : Abdelkrim MEBARKIA .....	Maître de Conférences. Université Sétif 1
<b>Examineur</b> : Ammar MEBARKIA .....	Maître de Conférences. Université Sétif 1

Année universitaire 2016 / 2017

## *Remerciements*

Au moment de commencer, la rédaction d'une thèse semble être une tâche longue et difficile. Heureusement, elle semblera moins intimidante après un ou deux chapitres. Vers la fin, nous y trouverons même du plaisir ; un plaisir fondé sur la satisfaction dans l'accomplissement et l'amélioration de notre rédaction scientifique. Arrivée au terme de cette thèse, je tiens à remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas été possible :

Mes vifs remerciements s'adressent à mon Directeur de thèse et Directeur du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Professeur Douadi KHELIFI. Il est bien difficile de mettre des mots pour qualifier l'ampleur de ma reconnaissance pour sa confiance et sa compréhension. Le niveau d'exigence élevé qu'il a eu envers mon travail a été un moteur dans mes avancées. Son enthousiasme et le bouillonnement d'idées qui le caractérise ne peuvent que donner envie de travailler et de donner le meilleur de soi ; c'est ainsi avec un grand plaisir et une réelle motivation que je me suis investie dans ce projet qu'il a rendu si vivant et si riche. Je lui serais toujours reconnaissante de m'avoir manifesté son entière disponibilité, d'avoir toujours répondu favorablement à mes nombreuses sollicitations malgré les lourdes et innombrables charges qui pèsent sur lui. Je souhaite vivement qu'il soit satisfait du résultat tout en espérant continuer à bénéficier de son expérience pour une recherche de haut niveau. Je voudrais enfin lui dire que j'ai eu grand plaisir de travailler sous sa direction. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect, de ma grande estime et de mes remerciements les plus sincères.

Mes remerciements s'adressent à Mme. SATTA Dalila, pour ses encouragements et son soutien moral et pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier Messieurs HAMIDECHI Mohammed Abdelhafid, HAFSI Miloud, MEBARKIA Abdelkrim et MEBARKIA Ammar pour avoir pris le temps de lire, corriger et commenter ce travail

Un grand merci à mes chères amies Meriem BENAMARA, Hania BENMEBAREK, Soumeya BETINA, Rym MAOUGAL, Sandra KACEM et Maya KECHID. Cette thèse n'aurait sans doute pas la même saveur sans leur présence, leur soutien et l'entraide et la solidarité qui existent entre nous. Je les remercie pour tous les bons moments passés ensemble et pour leur soutien pendant les périodes de doute

Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse n'aurait jamais abouti sans le support constant et infaillible de Imane MEDOUKALI et Asma MEDOURI. Elles ont su, chacune à leur manière, m'aider à terminer ce travail. Je les en remercie chaleureusement et les admire pour leurs extrêmes disponibilité et patience. Je remercie Mohammed CHEKARA BOUZIANI pour son aide dans la partie biologie moléculaire et lui souhaite bon courage pour sa thèse de doctorat

Je souhaite bon courage aux doctorantes Lylia HAMEL, Souheir BENSARI, Rayan OUALBANI, Wahiba FALEK et les remercie pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Merci à Inès BELLIL pour son amabilité. Merci à Nardjess MOUAS pour sa gentillesse et ses bons conseils

Un grand merci à Monsieur Nadir BELBEKRI, pour son aide précieuse et sa disponibilité. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude. Merci à Radhia DJAGHAR, Rima BOULDJEDJ et Chafika ZAHRAOUI pour leur aide et leur sourire constant.

Je remercie chaleureusement Mme. KHALFALLAH Nadra ainsi que Messieurs ABDELGUERFI Aissa, MEBARKIA Ammar, KAABACHE Mohammed et BAAZIZ Karim pour leur aide dans les débuts difficiles de l'identification des espèces. Un grand merci à Messieurs KERROUCHE et BENLEHZIL de l'Office National de Météorologie (Alger et Constantine) pour avoir mis à ma disposition les données climatologiques nécessaires à mon étude. Je remercie également tout le personnel des services agricoles de la wilaya de Constantine et à leur tête Monsieur GHEDIRI pour m'avoir fourni les statistiques relatives aux fourrages.

Mes remerciements s'adressent également à Mohammed GAGAOUA pour sa disponibilité et son précieux soutien. Merci à Kahina HAFID pour son aide.

Merci à toute ma famille qui a su gérer sans repos l'alternance de ces moments d'euphorie et de dépression que l'exercice d'une thèse peut provoquer, en particulier ma chère tante Abla.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour mes parents et mes défunts grands-parents. Leur soutien et leur amour sont les piliers de mon équilibre. Ils ont toujours accepté mes choix et ont toujours été présents pour me soutenir. Je tiens à saluer leur endurance et profite de cette occasion pour leur témoigner mon amour et ma reconnaissance. Un grand merci à mon cher papa pour son assistance dans la collecte des accessions utilisées dans le présent travail.

A mes parents

A mes défunts grands parents

A la prunelle de mes yeux, ma joie de vivre, ma fille Nada Djazia

A mon défunt mari Nasreddine

A mes frères Abdeldjalil et Mohammed Hamza

A ma belle-sœur Ihsène et mon adorable neveu Mohammed Adib

A mes tantes et leurs époux

A mes oncles et leurs épouses

A mes cousins et cousines

A ma belle famille

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Première partie : Revue de littérature</b>	
<b>Premier chapitre : Ressources phylogénétiques, profil fourrager et climat de l'Algérie</b> .....	5
I- Situation du germoplasme fourrager au niveau du Bassin Méditerranéen .....	5
II- Ressources phylogénétiques de l'Algérie .....	6
II-1- La flore d'Algérie .....	6
II-2- Diversité floristique .....	7
II-3 Erosion génétique .....	7
II-4- Prospections et collectes des ressources phylogénétiques .....	7
II-5- L'état de la gestion <i>in situ</i> et <i>ex situ</i> .....	7
III- Situation de l'élevage et des fourrages en Algérie .....	8
III-1- Les ressources pastorales en Algérie .....	8
III-2- Les contraintes sur les ressources pastorales .....	10
IV- Le climat de l'Algérie .....	10
IV-1- Sources de données .....	11
IV-2- Quotient pluviométrique et étages bioclimatiques d'Emberger .....	11
IV-3- Corrections des données climatologiques .....	12
<b>Deuxième chapitre : Les légumineuses</b> .....	13
I- Présentation .....	13
II- Ecosystèmes naturels et fixation biologique de l'azote .....	13
III- Contenu en protéines .....	13
IV- Les légumineuses fourragères .....	14
V- Rôles des légumineuses sur la jachère .....	14
<b>Troisième chapitre : La vesce (<i>Vicia</i> L.)</b> .....	16
I- Présentation .....	16
II- Revue historique .....	17
III- Monographies du genre <i>Vicia</i> .....	18
III-1- Monographie du genre <i>Vicia</i> Linné Sp. Pl. 734 (1753) .....	18
III-2- Description de Quézel et Santa (1962) .....	19

III-3- Description de Kupicha (1976) .....	19
IV- Taxonomie .....	20
IV-1- Histoire de la classification taxonomique .....	20
IV-2- Classification taxonomique .....	20
IV-2-1- Le sous-genre <i>Cracca</i> ( <i>Vicilla</i> sensu Kupicha) .....	22
IV-2-2- Le sous-genre <i>Vicia</i> .....	22
IV-3- Les débats de la taxonomie .....	23
IV-3-1- Le complexe <i>Vicia sativa</i> .....	23
IV-3-2- La vesce commune ( <i>V. sativa</i> subsp. <i>sativa</i> ) .....	24
IV-3-3- Situation de la vesce en Algérie .....	26
IV-3-4- Le complexe <i>Vicia narbonensis</i> .....	26
V- Cytogénétique .....	27
VI- Evolution et hybridation des espèces .....	28
VII- Les ressources génétiques des espèces de <i>Vicia</i> L. en Méditerranée .....	28
VIII- Ecologie du genre .....	29
IX- Reproduction .....	30
X- Centre de diversité .....	30
XI- Statut de conservation des ressources .....	31
<b>Quatrième chapitre : Collecte et données écogéographiques</b> .....	<b>33</b>
I- Prospection et collecte .....	33
I-1- Présentation et consignes .....	33
I-2- Traitement des graines après la récolte .....	33
I-3- Identification de l'échantillon .....	34
I-4- Photographie des échantillons .....	34
I-5- Echantillons d'herbier .....	34
I-6- Durée de conservation .....	35
I-7- Précautions à prendre pour les échantillons de vesce .....	35
II- Enquête écogéographique et établissement d'une base de données .....	35
II-1- Présentation et intérêts .....	35
II-2- Importances des données taxonomiques .....	36
II-3- Utilisation des systèmes de positionnement global .....	36
<b>Cinquième chapitre : Les marqueurs génétiques chez la vesce</b> .....	<b>38</b>
I- Les marqueurs morphologiques et les propriétés physiques du grain .....	38

II- Les marqueurs biochimiques .....	41
II-1- Les enzymes .....	41
II-1-1- Interprétation des zymogrammes .....	42
II-1-2- Utilisation de l'électrophorèse des isozymes chez la vesce .....	42
II-2- Les protéines et l'interprétation des diagrammes protéiques .....	42
II-2-1- Les protéines de réserve du grain .....	43
II-2-2- Utilisation des protéines de réserve chez les espèces du genre <i>Vicia</i> ...	43
III- Les marqueurs moléculaires de type ISSR .....	43
III-1- Présentation .....	43
III-2- Utilisation des marqueurs ISSR chez la vesce .....	44
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>46</b>
<b>Deuxième partie : Résultats et discussion</b>	
<b>Premier chapitre: Diversité génétique associée aux paramètres écogéographiques et aux caractères morphologiques de la plante</b>	
- Prologue .....	60
- Variation in <i>Vicia sativa</i> s.l from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters .....	61
- Characterization of 7 <i>Vicia</i> L. taxa (Fabaceae) from Algeria based on evidence from morphology and ecogeography .....	79
<b>Deuxième chapitre : Diversité génétique associée aux protéines de réserve de la graine et aux paramètres écogéographiques</b>	
- Prologue .....	106
- Relationships within and between <i>Vicia</i> taxa from Algeria associated with seed albumins, globulins, prolamins patterns and ecogeographic parameters...	107
<b>Troisième chapitre : Diversité génétique associée aux systèmes enzymatiques de la plante et aux propriétés physiques du grain</b>	
- Prologue .....	123
- Phylogenetic relationships between and within 11 taxa of genus <i>Vicia</i> from Algeria based on evidence from isozymes and physical seed properties.....	124
<b>Quatrième chapitre : Diversité génétique associée à la morphologie de la plante et aux marqueurs moléculaires de type ISSR</b>	
- Prologue .....	151

- The determination of sectional and sub-generic relationships among *Vicia* taxa (Fabaceae) from Algeria using plant morphology and ISSR markers ..... 152

**Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives**

- Synthèse des travaux réalisés ..... 167
  - I- Diversité génétique associée aux paramètres écogéographiques et aux caractères morphologiques de la plante ..... 167
  - II- Diversité génétique associée aux protéines de réserve du grain et aux paramètres écogéographiques ..... 169
  - III- Diversité génétique associée aux systèmes enzymatiques de la plante et aux propriétés physiques du grain ..... 170
  - IV- Diversité génétique associée à la morphologie de la plante et aux marqueurs moléculaires de type ISSR ..... 171
- Analyse et conclusions ..... 173
- Perspectives ..... 176

**Annexes**

La convention sur la diversité biologique affirme le droit souverain des Etats à tirer des avantages équitables de l'utilisation des ressources phytogénétiques présentes sur leur territoire. Ce droit est cependant lié à la responsabilité nationale de conserver ces ressources et d'en promouvoir l'utilisation. Des lacunes et des besoins dans les activités de conservation et dans la mise en valeur de ces ressources existent. Les bénéfices considérables qui pourraient être réalisés au travers de ces ressources ne sont ni atteints ni équitablement partagés.

La vesce (*Vicia L.*) est une légumineuse fourragère bien placée pour aider à répondre à la demande croissante pour l'alimentation animale et de fournir des cultures pour une diversité des systèmes agricoles. Il est cependant important de s'assurer que ses ressources génétiques soient conservées et donc disponibles pour la sélection continue des semences intéressantes.

La présente étude est la première du genre dans la valorisation de 11 taxa naturels de vesce collectés à travers l'Algérie, par l'utilisation de marqueurs génétiques représentés par 78 caractères morphologiques de la plante, 3 fractions de protéines de réserve, 3 systèmes enzymatiques, 12 propriétés physiques du grain et un marqueur à ADN représenté par 4 amorces de type ISSR. En parallèle, 5 paramètres écogéographiques ont été utilisés pour la caractérisation des sites de collecte des accessions.

La discrimination des taxa du complexe *Vicia sativa* via les descripteurs morphologiques et écogéographiques est difficile à cause de l'existence d'une variation continue. Quant aux autres taxa, l'analyse morphologique multi-traits révèle des discriminations plus stables qui concordent avec la taxonomie du genre. La connaissance des limites d'aires de répartition des espèces le long du gradient écologique est déterminante comme source d'indication sur le potentiel évolutif des programmes d'évaluation et de conservation de la biodiversité. Les données recueillies pourraient être valorisées dans la programmation des futures missions de collecte. Les électrophorégrammes des protéines de réserve peuvent être utilisés comme données de passeport pour l'identité génétique des accessions de vesce. Les zymogrammes sont compatibles avec les délimitations taxonomiques traditionnelles des espèces. Quant à l'analyse discriminatoire par les propriétés physiques du grain, elle n'a montré aucune correspondance avec la systématique. Les quatre amorces ISSR utilisées ont révélé 100% de bandes polymorphes. Cependant, leur utilisation éventuelle dans d'autres études de variabilité est à discuter. Les difficultés rencontrées dans l'identification des taxa mettent la lumière sur la nécessité de la révision taxonomique de la flore de l'Algérie.

---

**Mots clés** : Algérie ; vesce ; diversité ; caractérisation ; écogéographie ; marqueurs génétiques



## Abstract

The Convention on Biological Diversity affirms the sovereign right of states to derive equitable benefits from the use of plant genetic resources present on their territories. This right is, however, linked to the national responsibility to conserve these resources and promote their use. Gaps and needs in conservation activities and in the promotion of such resources exist. The considerable benefits that could be achieved through these resources are neither achieved nor equitably shared.

The vetch (*Vicia* L.) is a forage legume well positioned to help meet the growing demand for feed crops and provide diversity for farming systems. It is important to ensure that its genetic resources are conserved and therefore available for continuous selection of the interesting taxa.

This study is the first of its kind in the evaluation of 11 natural vetch taxa collected in Algeria, through the use of genetic markers represented by 78 morphological characteristics of the plant, 3 fractions of storage proteins, 3 enzyme systems, 12 physical properties of the grain and a DNA marker represented by 4 ISSR primers. In parallel, 5 ecogeographic parameters were used for the characterization of accessions collection sites.

The discrimination of the *Vicia sativa* complex taxa via morphological and ecogeographical descriptors is difficult because of the existence of a continuous variation. For the other taxa, morphological analysis reveals more stable groups which are consistent with the taxonomy of the genus. Knowing the limits of species distribution areas along the ecological gradient is crucial as a source of information on the evolutionary potential of evaluation programs and conservation of biodiversity. The data collected could be promoted in programming future collecting missions. The storage proteins electrophoregrams can be used as passport data for the genetic identity of vetch accessions. Zymograms are compatible with traditional taxonomic boundaries of species. The discriminant analysis by the physical properties of the grain showed no correspondence with the systematic. The four ISSR primers used revealed 100% polymorphic bands. However, their utility in other studies of variability is to be discussed. Difficulties in identifying taxa put light on the need for taxonomic revision of the flora of Algeria.

---

**Key words:** Algeria; vetch; characterization; diversity; ecogeography; genetic markers.

تؤكد اتفاقية التنوع البيولوجي على الحق السيادي للدول في جني فوائد منصفة من استخدام الموارد الوراثية النباتية في أراضيها. هذا الحق مرتبط بالمسؤولية الوطنية في الحفاظ على هذه الموارد وتشجيع استخدامها. ومع ذلك توجد ثغرات في أنشطة حفظ وتطوير هذه الموارد لأن الفوائد الكبيرة التي يمكن تحقيقها من خلالها لم تتحقق بعد.

يعتبر نبات البيقة من البقوليات العلفية التي تساعد في تلبية الطلب المتزايد على محاصيل الأعلاف وتوفير مجموعة متنوعة من النظم الزراعية ومن المهم التأكد من حفظ موارده الوراثية لتكون متاحة للاختيار المستمر للبذور. هذه الدراسة هي

الأولى من نوعها في تقييم 11 صنف طبيعي من البيقة التي تم جمعها من مناطق مختلفة في الجزائر، من خلال استخدام علامات وراثية ممثلة ب 78 صفة مورفولوجية للنبته، 3 أجزاء بروتينات التخزين، 3 أنظمة انزيميه، 12 خاصيه فيزيائية للحبوب وعلامة الحمض النووي ممثله ب 4 ISSR. في موازاة ذلك، تم استخدام 5 خصائص اكو جيوجرافيه لوصف مواقع تجميع العينات.

وصف أصناف *Vicia sativa* عبر الصفات المورفولوجية والجغرافية للبيقة صعب بسبب وجود الاختلاف المستمر، أما بالنسبة لباقي الأصناف، فقد بينت الدراسة المورفولوجية، تميزا أكثر استقرارا يتماشى مع تصنيف الجنس.

تعد معرفة حدود مناطق توزيع الأنواع على طول الانحدار البيئي مصدر للمعلومات حول القدرة التطورية لبرامج التقييم و الحفاظ على التنوع البيولوجي. يمكن تعزيز البيانات التي تم جمعها في برمجة بعثات جمع العينات في المستقبل. ويمكن استعمال نتائج البروتينات المخزنة كبيانات للهويه الوراثية للأصناف. إن نتائج الهجرة الكهربائية للإنزيمات مطابقه للتصنيف التقليدي. أما بالنسبة للتحليل التمييزي باستعمال الخواص الفيزيائية للحبوب، فانه لم يبد أي موافقه مع التصنيف. وبين تحليل ISSR 100% من التباين. إلا أن استعمالها في دراسات أخرى هي محل للمناقشة. صعوبات تحديد الأصناف سلطت الضوء على الحاجة الضرورية لمراجعة تصنيف النباتات في الجزائر.

---

الكلمات المفتاحية: الجزائر - البيقه - تنوع - وصف - الجغرافيا البيئية - علامات وراثية

**Première partie : Revue de littérature**

<b>Tableau 1.</b> Distribution des espèces des genres de légumineuses fourragères par région Méditerranéenne (Hamilton <i>et al.</i> 2001, modifié) .....	5
<b>Tableau 2.</b> Fourrages en sec et en vert à Constantine (Direction de l’agriculture de la wilaya de Constantine 2015) .....	9
<b>Tableau 3.</b> Fourrages en sec et en vert au niveau national (Direction de l’agriculture de la wilaya de Constantine 2015) .....	9
<b>Tableau 4.</b> Superficies fauchées et production obtenues (Direction de l’agriculture de la wilaya de Constantine 2015) .....	9
<b>Tableau 5.</b> Les étages bioclimatiques en Algérie (Nedjraoui 2003) .....	11
<b>Tableau 6.</b> Résumé de la classification sectionnelle des sous-genres <i>Vicilla</i> et <i>Vicia</i> (Kupicha 1976 ; Maxted 1993a) .....	21
<b>Tableau 7.</b> Taxa du complexe <i>Vicia sativa</i> (Van De Wouw <i>et al.</i> 2001b).....	23
<b>Tableau 8.</b> Nombre des accessions de <i>Vicia</i> conservées <i>ex situ</i> dans les collections majeures (Van De Wouw <i>et al.</i> 2001a) .....	31

**Deuxième partie : Résultats et discussion**

**- Variation in *Vicia sativa* s.l. from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters**

<b>Table 1.</b> Passport information and taxonomic identification of accessions investigated .....	63
<b>Table 2.</b> Morphological characters used for cladistics analysis .....	65
<b>Table 3.</b> Climatic characteristics of reference stations (2004–2014) .....	68
<b>Table 4.</b> Corrected data of climatic characteristics and calculation of Emberger quotient of sampling sites of <i>V. sativa</i> s.l. in Algeria .....	72

**- Characterization of 7 *Vicia* L. taxa (Fabaceae) from Algeria based on evidence from morphology and ecogeography**

<b>Table 1.</b> Passport information and taxonomic identification of accessions investigated .....	83
<b>Table 2.</b> Morphological characters used for cladistic analysis .....	84
<b>Table 3.</b> Climatic characteristics of reference stations (2004-2014) .....	86
<b>Table 4.</b> Corrected data of climatic characteristics and calculation of Emberger quotient of sampling sites investigated .....	93

**- Genetic diversity in *Vicia* species from Algeria associated with seed albumins, globulins, prolamins patterns and ecogeographic parameters**

<b>Table 1.</b> Passport information and taxonomic identification of accessions investigated .....	109
<b>Table 2.</b> Corrected climatic data and Emberger quotient calculation of sampling sites of accessions studied .....	111
<b>Table 3.</b> Climatic characteristics of reference stations (2004-2014) .....	112

**- Phylogenetic relationships between and within 11 taxa of genus *Vicia* from Algeria based on evidence from isozymes and physical seed properties**

<b>Table 1.</b> Passport information and taxonomic identification of accessions investigated .....	127
<b>Table 2.</b> Polymorphism of Aspartate AminoTransferase (AAT), SuperOxide Dismutase (SOD) and Alcohol DeHydrogenase (ADH) resolved from the leaflets of the <i>Vicia</i> taxa studied .....	131
<b>Table 3.</b> Means and standard deviations of physical seed properties of accessions studied .....	134

**- The determination of genetic relationships among *Vicia* taxa from Algeria using plant morphology and ISSR markers**

<b>Table 1.</b> Passport information and taxonomic identification of accessions investigated .....	154
<b>Table 2.</b> Passport data of ISSR primers used for testing DNA polymorphism within <i>Vicia</i> taxa .....	159

**Première partie : Revue de littérature**

<b>Figure 1.</b> Contexte bioclimatique et biogéographique de l'Algérie .....	11
<b>Figure 2.</b> Climagramme d'Emberger (Emberger 1955) .....	12
<b>Figure 3.</b> Différentes parties d'une plante de vesce (Thomé 1885) .....	16
<b>Figure 4.</b> Schéma d'une fleur de Papilionacée avec ses éléments morphologiques ; vue latérale (Anonyme 2014) .....	16
<b>Figure 5.</b> Photos de vesces : (a) : <i>V. sativa</i> subsp. <i>obovata</i> (gousse), (b) : <i>V. narbonensis</i> (gousse) (c) <i>V. narbonensis</i> (graines) (Bechkri 2015) .....	16
<b>Figure 6.</b> Distribution naturelle de <i>Vicia</i> (Hanelt et Mettin 1989) .....	17
<b>Figure 7.</b> Différentes parties de quelques espèces de vesce décrites par Quézel et Santa (1962) .....	19
<b>Figure 8.</b> L'intérêt d'ouvrières de <i>Lasius neglectus</i> pour <i>Vicia. sativa</i> (Wagenknecht 2016)... ..	29
<b>Figure 9.</b> Diagramme général de la vesce (Maxted 1995) .....	38
<b>Figure 10.</b> Photo de la pointe du style de <i>V. americana</i> (Slichter 2005).....	38
<b>Figure 11.</b> Fleurs de vesce. (a) Fleur sessile ( <i>V. sativa</i> subsp. <i>sativa</i> ) (Pasquali 2009) (b) Fleur pédonculée ( <i>V. monantha</i> subsp. <i>calcarata</i> ) (Bernal 2016) .....	38
<b>Figure 12.</b> Stipules très découpées de <i>V. sativa</i> présentant des spots nectarifères (Le Bourgeois 2016) .....	39
<b>Figure 13.</b> Feuilles de cinq espèces de vesce. (a) : <i>V. angustifolia</i> ; (b) : <i>V. cracca</i> ; (c) : <i>V. sativa</i> ; (d) <i>V. tetrasperma</i> ; (e) : <i>V. villosa</i> (Hafliger et Brun-Hood 1975) .....	39
<b>Figure 14.</b> Taxa représentatifs du sous-genre <i>Vicia</i> ( <i>sensu</i> Kupicha) (a) <i>V. lutea</i> (Sect. <i>Hypechusa</i> ) (Bonnier et De Layens 1944) (b) <i>V. narbonensis</i> (Sect. <i>Narbonensis</i> ) (Roth 1787) .....	40
<b>Figure 15.</b> Taxa représentatifs du sous-genre <i>Vicilla</i> ( <i>sensu</i> Kupicha) (a) <i>V. monantha</i> Sect. <i>Cracca</i> ) (Sturm 1796) (b) <i>V. tenuifolia</i> (Sect. <i>Cracca</i> ) (Bonnier et De Layens 1944) .....	41

**Deuxième partie : Résultats et discussion**

**Variation in *Vicia sativa* s.l. from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters**

<b>Fig. 1</b> Geographical origin of the 34 Algerian populations studied .....	64
<b>Fig. 2</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of 34 <i>V. sativa</i> s.l. accessions .....	69
<b>Fig. 3</b> Similarity matrix of morphological characters .....	69
<b>Fig. 4</b> Principal Component Analysis of 67 morphological characters .....	71
<b>Fig. 5</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on ecogeographic diversity of 34 <i>V. sativa</i> s.l. accessions .....	73
<b>Fig. 6</b> Similarity matrix of ecogeographic parameters .....	73

**- Characterization of 7 *Vicia* L. taxa (Fabaceae) from Algeria based on evidence from morphology and ecogeography**

<b>Fig. 1</b> Geographical origin of the 37 Algerian populations studied .....	82
<b>Fig. 2</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of 37 <i>Vicia</i> L. accessions .....	87
<b>Fig. 3</b> Similarity matrix of morphological characters .....	88
<b>Fig. 4</b> Principal Component Analysis of 72 morphological characters .....	91
<b>Fig. 5</b> Principal Component Analysis of studied populations .....	92
<b>Fig. 6</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on ecogeographic diversity of 37 <i>Vicia</i> L. accessions .....	94
<b>Fig. 7</b> Similarity matrix of ecogeographic parameters .....	95

**- Genetic diversity in *Vicia* species from Algeria associated with seed albumins, globulins, prolamins patterns and ecogeographic parameters**

<b>Fig. 1</b> Geographical origin of the 78 Algerian populations studied .....	108
--	-----

## Liste des figures

<b>Fig. 2</b> Electrophoretic banding pattern generated by SDS-PAGE of seed storage proteins of some <i>Vicia</i> accessions studied. M =marker (a) globulins (b) prolamins (c) albumins .....	114
<b>Fig. 3</b> Dendrograms generated using UPGMA cluster analysis and Jaccard's index based on seed proteins diversity of 78 <i>Vicia</i> accessions .....	115
<b>Fig. 4</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis and Euclidean distances based on ecogeographic characterization of sites investigated .....	117
<b>- Phylogenetic relationships between and within 11 taxa of genus <i>Vicia</i> from Algeria based on evidence from isozymes and physical seed properties</b>	
<b>Fig. 1</b> Geographical origin of the 60 Algerian populations studied .....	126
<b>Fig. 2</b> Electrophoretic banding pattern generated by PAGE of the enzymatic systems studied of some <i>Vicia</i> accessions (a) ADH (b) SOD (c) AAT .....	132
<b>Fig. 3</b> Dendrograms generated using UPGMA cluster analysis and Euclidean distances based on three enzymatic systems diversity of 60 <i>Vicia</i> accessions .....	134
<b>Fig. 4</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis and Euclidean distances based on physical seed properties of accessions investigated .....	140
<b>Fig. 5</b> Principal Component Analysis based on 12 physical seed properties .....	141
<b>- The determination of genetic relationships among <i>Vicia</i> taxa from Algeria using plant morphology and ISSR markers</b>	
<b>Fig. 1</b> Geographical origin of the 46 Algerian populations studied .....	155
<b>Fig. 2</b> Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of <i>Vicia</i> accessions .....	157
<b>Fig. 3</b> Principal Component Analysis of studied populations based on plant morphology .....	158
<b>Fig. 4</b> Electrophoresis patterns of ISSR products amplified with primers 1 and 3 .....	159
<b>Fig. 5</b> Dendrograms generated using UPGMA cluster analysis based on ISSR polymorphism of 45 <i>Vicia</i> accessions a) Dice index b) Jaccard index .....	160
<b>Fig.6</b> Distance matrices a) Dice index b) Jaccard index .....	161

## Liste des abréviations

- **ACP** : Analyse en Composantes Principales
- **AFLP**: Amplified Fragment-Length Polymorphism
- **APG**: Angiosperm Phylogeny Group
- **CBD**: Convention on Biological Diversity
- **CLIMA**: Center for Legumes in Mediterranean Agriculture
- **FAO**: Food and Agriculture Organization
- **GPS**: Global Positioning System
- **IBPGR**: International Board for Plant Genetic Resources
- **ICARDA**: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
- **INRAA** : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie
- **IPGRI** : International Plant Genetic Resources Institute
- **ISSR**: Inter Simple Sequence Repeat
- **ITS** : Internal Transcribed Spacer
- **MADR** : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
- **NSC** : Narbonensis Complex
- **ONM** : Office National de la Météorologie
- **PAGE** : PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PNR** : Projet National de Recherche
- **PNUE** : Programme des Nations Unies pour l'Environnement
- **Q2** : Quotient d'Emberger
- **RAPD**: Random Amplification of Polymorphic DNA
- **rbcl** : ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase
- **SAU** : Surface Agricole Utile
- **SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
- **SINGER**: System-wide Information Network for Genetic Resources
- **SOD**: Superoxide Dismutase
- **SRAP**: Sequence Related Amplified Polymorphism
- **UPGMA**: Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages
- **WIEWS**: World Information and Early Warning System on Plant Genetic Resources

# **Introduction**

## Introduction

La diversité biologique est le réservoir naturel de toutes les ressources génétiques ainsi que les relations qui peuvent exister entre elles. Partant de ce concept, il devient aisé de comprendre son intérêt dans la pérennité, le développement et l'épanouissement de l'espèce humaine, qui ne peuvent se réaliser durablement sans elle. Les ressources génétiques, qui sont une partie de la biodiversité, constituent des enjeux considérables pour le développement économique dans différents domaines et représentent la matière première la plus importante pour le sélectionneur et l'intrant essentiel de l'agriculteur. Elles constituent également un réservoir d'adaptation génétique face aux dommages potentiellement induits par les changements économiques ou environnementaux. Le 22 mai 1992, à Nairobi, le PNUE adoptait un texte reconnaissant officiellement, pour la première fois, "la valeur intrinsèque de la diversité biologique", et affirmant que sa conservation "est une préoccupation commune à l'humanité" (cité par Abdelguerfi 2003). Dans son premier rapport exhaustif sur l'état des ressources phylogénétiques dans le monde en 1996, la FAO met en garde contre une perte massive de ces ressources et souligne les vives préoccupations que suscitent l'érosion de la biodiversité et la perte irréversible de gènes vitaux pour l'agriculture et la sécurité alimentaire.

\*

En Algérie, la flore est aujourd'hui très sérieusement menacée, en raison de la forte régression des milieux naturels sous l'action de l'homme, mais aussi parce que cette région serait l'une des plus exposées aux changements climatiques globaux (Médail et Quézel 2005). Les efforts de préservation sont surtout orientés vers la mise en œuvre d'aires protégées principalement situées dans les écosystèmes du Tell et correspondant aux « hotspots » connus de biodiversité. La gestion de ces milieux et les stratégies de conservation sont limitées par une connaissance insuffisante des unités biologiques en présence, réduite aux travaux botaniques classiques devant être mis à jour et des mécanismes gouvernant leur évolution (Médiouni 2004). Au niveau spécifique, les données relatives aux espèces spontanées à valeur patrimoniale sont encore peu nombreuses et les données relatives aux espèces rares ou endémiques sont quasiment inexistantes (Amirouche et Misset 2009). L'Algérie, par la diversité de ses milieux, de ses systèmes d'élevage et des risques climatiques, doit préserver et valoriser un large éventail de ressources phytogénétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral. Les collections constituées et les évaluations réalisées n'ont été, pour le moment, que faiblement valorisées. Ceci serait dû en grande partie à l'absence de tradition dans la production de semences et ce à cause de diverses contraintes (Abdelguerfi *et al.* 2000 ; Porqueddu *et al.* 2000). Les ressources fourragères restent limitées dans notre pays. L'élevage est conduit d'une manière traditionnelle en exploitant les parcours et les prairies naturelles



## Introduction

souvent de qualité médiocre, les cultures fourragères sont très peu utilisées et les besoins en protéines de la population sont tributaires de l'importation. Dans les régions à faibles précipitations, l'alimentation des troupeaux est basée essentiellement sur le grain, les sous-produits des céréales, l'association vesce-avoine et la végétation des terres laissées en jachère. Une telle alimentation ne permet guère un élevage intensif et productif ; au contraire, elle l'expose aux caprices du climat et aux carences chroniques en matières azotées digestibles. L'introduction des légumineuses fourragères dans les systèmes de production peut permettre de pallier à ce déficit fourrager chronique (Mebarkia et Abdelguerfi 2007).

Si la nécessité de conserver et de valoriser les ressources phytogénétiques locales font l'unanimité de tous les intervenants, la question majeure à laquelle on doit répondre, reste à définir les différentes modalités de la conservation et de la valorisation. L'analyse de la diversité génétique des espèces, nécessaire pour décrire la structuration de la variabilité des populations naturelles, apprécier les flux de gènes et établir les stratégies de conservation et d'amélioration des taxa pastoraux, n'a touché qu'un nombre relativement réduit d'espèces de légumineuses et ce malgré leur diversité. L'analyse de la diversité génétique et l'établissement des stratégies de conservation de ces espèces sont d'une nécessité urgente. En parallèle, une gestion plus écologique de la végétation pastorale devrait être entreprise. Cette action suppose une connaissance régulière des facteurs de l'environnement (Boussaid *et al.* 2004).

\*

La vesce (*Vicia* L.) présente des caractéristiques agronomiques très intéressantes (Mebarkia et Abdelguerfi 2007) lui permettant de figurer parmi les espèces à retenir pour la mise en valeur de l'espace fourrager notamment dans les régions semi-arides où la jachère est une composante importante des systèmes de production céréales/ovins. L'utilisation des légumineuses, et notamment des vesces, sur ces jachères devrait pouvoir améliorer l'alimentation des troupeaux dans le cadre d'un développement durable (Abbas et Abdelguerfi 2005). Les espèces de vesce doivent faire l'objet d'investigations (collecte de semences, multiplication, conservation, essais de germination et modalités d'installation, établissement des cartes de répartition). L'intégration réelle de ces ressources dans des programmes de sauvegarde des parcours ou dans des circuits de production (amélioration variétale, production de semences, ..... ) demeure très limitée. Les caprices du climat, le degré de perturbation des milieux, les contraintes socio-économiques locales ou régionales et l'insuffisance d'informations, permettant d'apprécier efficacement la valeur intrinsèque du matériel végétal, ont constitué une contrainte majeure pour le développement de véritables stratégies de conservation et d'amélioration (Boussaid *et al.* 2004) des espèces du genre *Vicia*.

## Introduction

Ces dernières, bien qu'elles soient pas suffisamment analysées sur le plan de la diversité génétique, n'ont rien à envier aux autres légumineuses étudiées. Elles doivent être considérées comme prioritaires pour juger de leur statut réel. En dépit de la masse considérable de données biogéographiques, morphologiques, cytologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires depuis plusieurs décennies, la taxonomie et les relations évolutives et historiques dans le genre *Vicia* comportent encore de nombreuses incertitudes. Des connaissances que l'on croyait acquises, notamment sur les relations phylogénétiques, l'origine et l'évolution des taxa, sont en perpétuelle révision.

\*

C'est dans ce contexte que des analyses pluridisciplinaires morphologiques, biochimiques et moléculaires ont été réalisées sur des populations naturelles de vesces échantillonnées dans diverses conditions écologiques de l'Algérie. Elles ont pour principaux objectifs d'appréhender la variabilité génétique intra- et inter-populations ainsi que la structuration éco-géographique de 11 taxa naturels du genre *Vicia* L. L'accent a été mis, entre autres, sur la nécessité de révisions taxonomiques de la flore de l'Algérie. Cette étude a commencé par une prospection suivie d'une collecte d'accessions de vesce à travers le Nord du pays. La diversité intra et interspécifique ainsi que les affinités phylogénétiques ont été évaluées par :

- La caractérisation de la variation éco-géographique des stations de collecte ;
- L'analyse multi-traités des caractères morphologiques de la plante ;
- L'examen des propriétés physiques de la graine ;
- La caractérisation biochimique par les protéines de réserve du grain et les systèmes enzymatiques de la plante ;
- La caractérisation moléculaire par un marqueur à ADN de type ISSR.

Nous avons opté pour une structure en thèse-articles. Une introduction et une revue de la littérature sont suivis par la partie résultats et discussion, présentée sous forme de cinq publications scientifiques. Une synthèse générale, des conclusions et des perspectives viendront clore ce travail.

**Première partie**  
**Revue de littérature**

### I- Situation du germoplasme fourrager au niveau du Bassin Méditerranéen

Le bassin Méditerranéen est le berceau de diversification d'un grand nombre d'espèces d'intérêt fourrager et/ou pastoral. En Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, Italie, France, Espagne et Portugal, les espèces herbacées ont été le plus largement collectées par les institutions nationales en collaboration avec les centres internationaux et avec des institutions de pays développés (pour les pays du Sud de la Méditerranée). A l'ICARDA, 24% des accessions du germoplasme conservé sont constituées par les espèces fourragères dont la majorité provient de l'Afrique du Nord et de l'Ouest de l'Asie. Au niveau international, pour 15 espèces de Fabacées les plus collectées, 37% proviennent du Maroc, de la Turquie et de l'Espagne. Les pays de la Méditerranée de l'Est semblent sous représentés (Hamilton *et al.* 2001).

**Tableau 1.** Distribution des espèces des genres de légumineuses fourragères par région Méditerranéenne (pour chaque genre, le tableau mentionne le nombre d'espèces et le pourcentage des espèces présentes pour chacune des sous-régions écogéographiques) (Hamilton *et al.* 2001, modifié)

Région Méditerranéenne		Ouest			Nord-Est			Est	Sud-Est		
Sous-région		1a	1b	Total	2a	2b	Total	Total	4a	4b	Total
Genre	Nb d'espèces	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<i>Anthyllis</i>	16	81	56	88	38	31	38	6	13	13	19
<i>Astragalus</i>	1	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100
<i>Coronilla</i>	10	70	70	90	40	50	50	30	40	30	40
<i>Dorycnium</i>	5	60	80	80	80	80	80	20	60	40	60
<i>Hedysarum</i>	37	16	30	35	16	14	24	57	8	3	8
<i>Hippocrepis</i>	28	61	54	96	25	18	25	11	25	32	32
<i>Lathyrus</i>	61	57	41	67	62	54	74	36	30	23	38
<i>Lotus</i>	58	41	60	67	41	33	45	17	22	41	52
<i>Lupinus</i>	6	50	50	67	33	17	33	0	50	17	50
<i>Medicago</i>	60	57	43	63	72	43	78	40	58	35	60
<i>Melilotus</i>	17	71	59	77	65	65	71	24	47	47	53
<i>Onobrychis</i>	91	15	10	20	30	14	34	73	13	3	13
<i>Ononis</i>	63	64	86	97	19	16	22	11	22	19	27
<i>Ornithopus</i>	6	83	100	100	33	17	33	17	33	0	33
<i>Scorpiurus</i>	2	100	100	100	100	50	100	50	100	50	100
<i>Trifolium</i>	117	60	3	43	77	66	85	40	47	21	50
<i>Trigonella</i>	44	7	11	11	48	9	48	57	46	25	57
<b><i>Vicia</i></b>	<b>87</b>	<b>49</b>	<b>38</b>	<b>38</b>	<b>54</b>	<b>40</b>	<b>63</b>	<b>43</b>	<b>33</b>	<b>16</b>	<b>38</b>

1a : France, Italie, Espagne, Portugal, Sardaigne ; 1b : Algérie, Tunisie, Maroc. 2a : Grèce, Turquie ; 2b : Albanie, Yougoslavie, Bulgarie. 4a : Liban, Jordanie, Israël, Syrie, Chypre, Malte ; 4b : Egypte, Libye. Est : Iran et Irak

Les nombreux travaux de collecte et d'évaluation menés au niveau du Bassin Méditerranéen ont eu des impacts souvent limités au niveau du développement et de la diversification des cultures fourragères et de l'amélioration des pâturages et des terres de parcours de la région. Malgré les importants appuis et collaborations surtout pour les pays du sud de la Méditerranée, rares sont les centres ou instituts de recherche nationaux qui ont mis au point quelques variétés ou cultivars. Ceci serait dû entre autres à l'absence de stratégie claire en matière de production de semences fourragères et pastorales (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004). Les aptitudes particulières de ces ressources, négligées et sous-utilisées (particulièrement dans les pays du

Sud de la Méditerranée), ont été intelligemment valorisées au niveau international et ont permis le développement de cultivars dignes d'intérêt. Ce sont les Australiens qui, grâce à leur approche pragmatique et l'efficacité de leur système de production de semences de petites graines, qui ont pu le plus valoriser les ressources génétiques Méditerranéennes (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar 2004).

## **II- Ressources phylogénétiques de l'Algérie**

### **II-1- La flore d'Algérie**

Les premières recherches botaniques en Algérie ont été menées dès la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle et nous devons les premiers inventaires et descriptions à Jean-Louis Marie Poiret (Poiret 1789) avec son *Voyage en Barbarie* et à René Louiche Desfontaines avec *Flora Atlantica* (Desfontaines 1798-1799). Dès 1837, la « recherche botanique officielle » et les multiples missions d'exploration scientifique de l'Algérie, ont permis à de nombreux botanistes de constituer les premières collections et les premiers herbiers. Ceux d'Ernest Saint-Charles Cosson et Michel Charles Durieu De Maisonneuve (1854-1867) sont parmi les plus illustres. Les premières véritables flores, qui font encore référence aujourd'hui, sont celles de Jules Aimé Battandier et Louis Trabut, dont *Flore d'Alger et catalogue de plantes d'Algérie* (Battandier et Trabut 1884) et *Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de Tunisie* (Battandier et Trabut 1902). Mais c'est à René Maire (Maire 1955-1987) que l'on doit une flore exhaustive, la célèbre *Flore de l'Afrique du Nord* dont les seize volumes ont été publiés à titre posthume à partir de 1953. Pierre Quézel et Sébastien Santa (Quézel et Santa 1962-1963) ont proposé, avec leur *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, un ouvrage plus « simple » qui constitue, de nos jours encore, la seule référence « accessible » sur la flore de l'Algérie. En dépit du renouveau de la botanique systématique suscité à la faveur de données moléculaires (APG III 2009), aucune révision taxonomique majeure n'a été entreprise, sinon des mises à jour de nomenclature et de synonymie, au demeurant très insuffisantes. Nous citerons entre autres, l'index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord par Alain Dobignard (2009). Cependant, dans de nombreux cas, les déterminations sont rendues délicates en raison d'une complexité biologique qui n'est pas prise en compte (plasticité phénotypique, hybridation, polyploïdie). Un grand nombre de taxa montrent un polymorphisme important et, parfois, constituent des complexes spécifiques aux délimitations taxonomiques peu évidentes (Alcaraz 1976). En ce qui concerne la flore du Sahara, de nombreux botanistes ont également contribué à sa connaissance depuis le début du 19<sup>ème</sup> siècle. Ces explorations botaniques ont permis à Maire de réaliser une première étude synthétique en 1933, mais c'est à Ozenda qu'est

due la remarquable flore du Sahara central et septentrional éditée en 1958 et remise à jour par des éditions plus récentes en 1977 et 1991 (Nedjraoui 2003).

## **II-2- Diversité floristique**

De par sa situation géographique, l'Algérie chevauche entre deux empires floraux : l'Holarctique et le Paléotropique. Cette position lui confère une flore très diversifiée par des espèces appartenant à différents éléments géographiques. Sur les 3139 espèces (5402 taxa en comptant les sous espèces, les variétés et les formes) décrites par Quézel et Santa (1962), Zeraia (1983) dénombre 1286 espèces rares à très rares, ce qui témoigne de l'importance des actions de conservation.

## **II-3- Erosion génétique**

En plus de l'introduction des nouvelles variétés dites à haut rendement, qui ont favorisé la disparition d'un certain nombre de variétés locales, d'autres causes ont contribué aussi à cette érosion à savoir : l'urbanisation, le surpâturage, les incendies de forêts, le défrichage, les mauvaises pratiques agricoles, l'érosion des sols, la méconnaissance des pratiques de préservation et de conservation et l'inexistence d'infrastructures de conservation. Il est important de mentionner la régression voire la disparition de plusieurs variétés de vesces améliorées et sélectionnées durant la période coloniale (INRAA 2006).

## **II-4- Prospections et collectes des ressources phytogénétiques**

Les programmes de collectes ne sont pas toujours planifiés. Ils sont faits généralement, en fonction des offres émanant des institutions internationales de recherche, des organisations régionales et internationales et de l'assistance technique et financière étrangère. Suivant nos besoins en matériel végétal, des duplicatas des échantillons collectés sont stockés dans la banque de gènes de l'IPGRI, une partie est mise en collection pour la préservation et la régénération et l'autre partie fait l'objet de recherche pour laquelle elle a été collectée. Les prospections et collectes effectuées par les différents instituts du Secteur de l'Agriculture et du Secteur de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique ont surtout concerné les grandes cultures ou ont été réalisées dans le cadre des PNR. Par manque de moyens de conservation dû à l'absence de programme spécifique à la conservation et l'utilisation de ces ressources, le matériel végétal collecté lors de ces différentes prospections a été en grande partie perdu au niveau des instituts et centres de recherche sous tutelle du MADR (INRAA 2006).

## **II-5- L'état de la gestion *in situ* et *ex situ***

La conservation *in situ* concerne principalement les espèces spontanées. La conservation des espèces du terroir et des variétés traditionnelles n'a pas fait l'objet d'actions organisées par l'Etat. Les agriculteurs ont de tout temps créé et protégé une large biodiversité dans leurs

champs. L'intérêt qu'ils portent à la diversité génétique des plantes spontanées et cultivées est illustré par la précision des appellations vernaculaires, une bonne connaissance des caractéristiques morphologiques et la préférence donnée aux variétés locales ayant des caractéristiques compétitives. Les moyens de conservation traditionnelle tendent à disparaître (INRAA 2006). La conservation *ex situ* se fait de manière empirique en absence de chambres froides et/ou par insuffisance de jardins botaniques et particulièrement pour les espèces annuelles. Le maintien des collections est difficile, et cela par manque de personnel qualifié, d'infrastructures de conservation. Les collections, sous forme de graines, sont gardées dans les armoires, hangars et réfrigérateurs ou sous forme de collections vivantes par les instituts et centres sous tutelle du MADR. Les normes de conservation recommandées à l'échelle internationale ne sont pas respectées (INRAA 2006).

### **III- Situation de l'élevage et des fourrages en Algérie**

De tout temps, l'élevage en Algérie a gardé un caractère traditionnel. Le problème majeur réside dans le fait que l'idée de "cultiver de l'herbe" n'est pas encore admise. L'élevage est séparé de la culture, et on ne cultive pas pour les animaux. Il s'agit donc de vulgariser cette notion puis d'envisager pour chaque région, en fonction de son type d'élevage et les potentialités des ressources végétales locales, un programme de production fourragère. Pour être économiquement rentable, le système mis en place devra être capable de caractériser ses stocks fourragers afin de les incorporer à leur juste place dans les rations. L'agriculteur pourra de cette manière adapter le pâturage ou la distribution des différentes qualités récoltées aux besoins spécifiques des catégories animales qu'il exploite (Decruyenaere *et al.* 2007). La répartition du cheptel ne suit pas celle de la production fourragère. Le programme de multiplication de semences fourragères est nettement insuffisant et reste tributaire de l'importation. Les fourrages naturels constitués par les prairies et les jachères pâturées sont souvent de qualité médiocre. Les calendriers fourragers sont rares et la production fourragère est proportionnelle à la SAU alors que les besoins des animaux devraient être les principaux indicateurs pour élaborer le calendrier fourrager (Hamrit 1995).

#### **III-1- Les ressources pastorales en Algérie**

Les terres consacrées à la production fourragère couvrent les prairies naturelles qui se trouvent essentiellement dans les étages bioclimatiques humides et sub-humides, les cultures fourragères, la jachère et les pacages et parcours. Les chiffres concernant les ressources fourragères du pays sont représentés dans les tableaux 2, 3 et 4.

**Tableau 2.** Fourrages en sec et en vert à Constantine  
(Direction de l'agriculture de la wilaya de Constantine 2015)

	Total fourrage en sec et en vert	En vert	En sec	Vesce-avoine	Fourrages naturels
Superficie (ha)	5017	2657	2360	880	2467
Production (qx)	312457	206704	2360	44078	63040

**Tableau 3.** Fourrages en sec et en vert au niveau national  
(Direction de l'agriculture de la wilaya de Constantine 2015)

	Total fourrage en sec et en vert	En vert	En sec	Vesce-avoine
Superficie (ha)	237775	146726	650651	78977
Production (qx)	7047791	18797300	16901827	25766169

**Tableau 4.** Superficies fauchées et production obtenues  
(Direction de l'agriculture de la wilaya de Constantine 2015).

	Espèces	Zone potentielle			Zone intermédiaire			Total wilaya		
		Sup. emblavée (ha)	Sup. Fauchée (ha)	Production Obtenue (qx)	Sup. emblavée (ha)	Sup. Fauchée (ha)	Production Obtenue (qx)	Sup. emblavée (ha)	Sup. Fauchée (ha)	Production Obtenue (qx)
Fourrage En sec	Avoine fourragère	1240	1240	66960	215	215	9460	1455	1455	76420
	Vesce-avoine	955	945	52640	80	80	2800	1035	1025	55440
	Pois avoine	770	360	15420	0	0	0	770	360	15420
	Orge avoine	10	10	300	0	0	0	10	10	300
	Pois fourrager	310	305	6835	0	0	0	310	305	6835
	Vesce graine	255	255	7395	5	5	200	260	260	7595
	Vesce féverole	55	55	1430	0	0	0	55	55	1430
	Gesse	270	270	2700	10	10	100	280	280	2800
	Gesse avoine	10	10	700	-	0	0	10	10	700
	Triticale	30	30	1800	-	0	0	30	30	1800
	Vesce triticale	25	25	2475	-	0	0	25	25	2475
	<b>Total</b>	<b>3930</b>	<b>3505</b>	<b>158655</b>	<b>310</b>	<b>310</b>	<b>12560</b>	<b>4240</b>	<b>3815</b>	<b>171215</b>
Fourrage En vert	Orge en vert	1670	1595	133980	630	630	46940	2300	2225	180920
	Avoine fourragère	165	220	18075	35	65	2405	285	285	20480
	Vesce avoine	325	450	38170	30	90	5490	540	540	43660
	Pois avoine	15	425	34170	-	0	0	15	425	34170
	Triticale	150	150	13500	30	30	2400	180	180	15900
	Luzerne	60	60	2700	5	5	1495	65	65	4195
	Sorgho	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mais	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2385</b>	<b>2900</b>	<b>240595</b>	<b>730</b>	<b>820</b>	<b>58730</b>	<b>3385</b>	<b>3720</b>	<b>299325</b>	
<b>Total global</b>	<b>6315</b>	<b>6405</b>	<b>399250</b>	<b>1040</b>	<b>1130</b>	<b>71290</b>	<b>7625</b>	<b>7535</b>	<b>470540</b>	



### III-2- Les contraintes sur les ressources pastorales

Les ressources disponibles du pays se retrouvent menacées par :

- Les aléas climatiques : les catastrophes naturelles qui se manifestent de façon récurrente, particulièrement dans la partie nord du pays qui est la plus peuplée. Parmi les risques majeurs, on peut citer la désertification, les sécheresses, la dégradation des oasis, les tempêtes et les inondations, les invasions acridiennes.

- Le surpâturage : un effectif ovin trop élevé sur les meilleurs pâturages et autour des points d'eau provoque le piétinement et le tassement du sol. Cet effet se traduit par la dénudation du sol, la réduction de sa perméabilité et de ses réserves hydriques et l'augmentation du ruissellement, ce qui accroît très sensiblement le risque d'érosion. Ce surpâturage se manifeste par le maintien trop prolongé du troupeau sur les aires pâturées prélevant ainsi une quantité de végétation largement supérieure à la production annuelle. Sur le plan qualitatif, les bonnes espèces pastorales sont consommées avant d'avoir eu le temps de fructifier ou de former des repousses pour les saisons à venir. Leur système racinaire dépérit et elles disparaissent totalement du faciès en laissant la place à des espèces qui constituent un indice caractéristique de la dégradation des parcours. Sur le plan quantitatif, le surpâturage provoque une diminution du couvert végétal pérenne et de la phytomasse et donc une dégradation des formations végétales (Aidoud et Nedjraoui 1992 ; Zegrar *et al.* 1997).

- Les problèmes du foncier et la dégradation des ressources naturelles : la loi de 1990 portant orientation foncière réduit l'espace des terres « à vocation pastorale » aux steppes comprises entre les isohyètes 100 et 300 mm, permettant les défrichements sur la frange 300–400 mm. Pour répondre aux besoins alimentaires induits par la croissance démographique et l'augmentation du cheptel, on assiste à une exploitation anarchique des terres pastorales et à l'extension des cultures céréalières à rendements très faibles sur des sols fragiles. Les techniques de labour utilisées par les agropasteurs ont une action très érosive qui détériore l'horizon superficiel et le stérilise le plus souvent de manière irréversible. Ces phénomènes provoquent une destruction des espèces pérennes et une forte réduction de la végétation annuelle (Nedjraoui 2003).

### IV- Le climat de l'Algérie

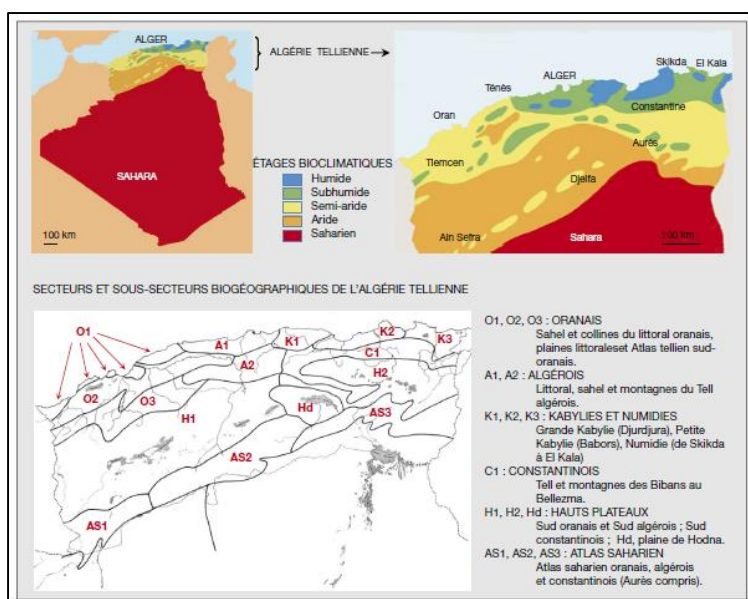
Le climat Algérien s'intègre au climat Méditerranéen qui est un climat de transition entre la zone tempérée et la zone tropicale avec un été très chaud et très sec, tempéré seulement en bordure de la mer, l'hiver est très frais et plus humide. Ce climat est qualifié de xérothermique (Daget 1980). Les précipitations exercent une action prépondérante pour la définition de la sécheresse globale du climat (Le Houerou *et al.* 1977). En Algérie, sont représentés tous les

Premier chapitre : Ressources phytogénétiques, profil fourrager et climat de l'Algérie

bioclimats méditerranéens depuis le per humide au Nord jusqu'au per aride au Sud pour les étages bioclimatiques, et depuis le froid jusqu'au chaud pour les variantes thermiques (Tableau 5, Figure 1).

**Tableau 5.** Les étages bioclimatiques en Algérie (Nedjraoui 2003)

Etages bioclimatiques	Pluviosité annuelle mm	Superficie ha	Superficie totale %
Per humide	1200 - 1800	185275	0,08
Humide	900 - 1200	773433	0,32
Sub-humide	800 -900	3401128	1,42
Semi-aride	600 -300	9814985	4,12
Aride	300 -100	11232270	4,78
Saharien	< 100	212766944	89,5



**Figure 1.** Contexte bioclimatique et biogéographique de l'Algérie

Les limites des étages bioclimatiques ont été établies d'après la carte bioclimatique simplifiée de Stewart (1974). Elles sont définies par trois paramètres principaux du climat méditerranéen : la pluviosité annuelle (P), la moyenne des températures du mois le plus chaud (M °C) et la moyenne des températures du mois le plus froid (m °C). La carte de répartition des secteurs biogéographiques et celle de Quézel et Santa (1962)

**IV-1- Sources de données**

Différentes sources de données permettent de caractériser le climat en Algérie :

- Les données de 1913– 1938 publiées dans « Le climat de l'Algérie » par Seltzer (1946).
- Les données de 1926–1950 des stations sahariennes publiées dans « Le climat du Sahara » par Dubief (1950–1963).
- Les données de 1913–1961 publiées dans la notice de la carte pluviométrique de l'Algérie septentrionale, établie par Chaumont et Paquin (1971).
- La carte pluviométrique publiée (1993) par l'Agence Nationale des Ressources Hydriques.
- Les données actuelles publiées par l'ONM.

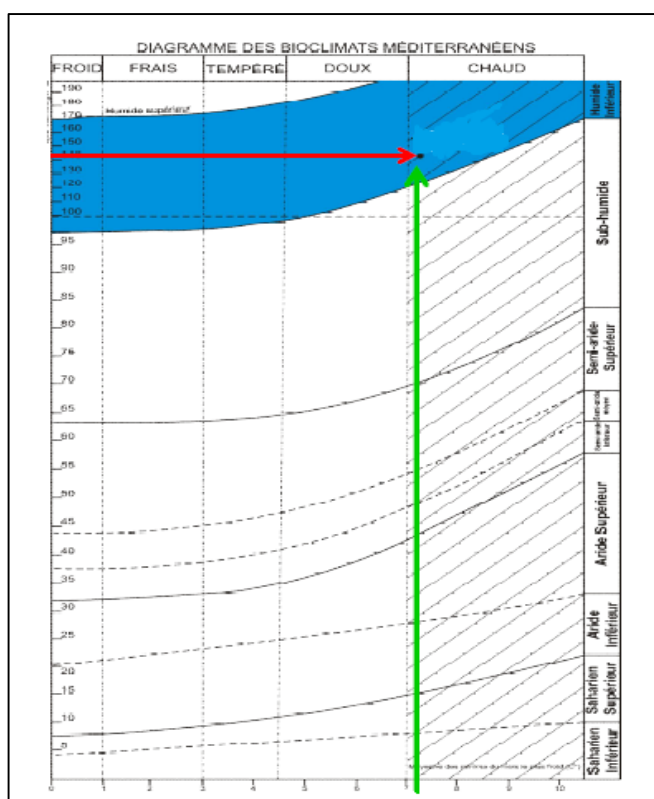
**IV-2- Quotient pluviométrique et étages bioclimatiques d'Emberger**

Les limites de séparation entre les différents étages bioclimatiques restent encore imprécises. Elles ont été tracées là où le changement de la végétation a été observé (Emberger 1955). Le quotient d'Emberger est spécifique du climat Méditerranéen, il est le plus

fréquemment utilisé en Afrique du Nord (Benbadji et Bouazza 2000). Emberger a mis au point un zonage du bioclimat méditerranéen du plus sec vers le plus humide en combinant les données climatologiques et celles de la végétation. C'est ainsi que les étages bioclimatiques sont repérés sur des axes orthogonaux (Figure 2) où chaque station se trouve représentée par un point dont l'abscisse est la valeur de (m), et l'ordonnée, la valeur du Q2 (Le Houerou *et al.* 1977).

### IV-3- Corrections des données climatologiques

Une étude climatique fiable semble nécessaire pour expliquer la distribution des groupements végétaux à l'échelle locale. A cette fin, les corrections des données de température et de précipitations dans l'objectif de mettre en évidence l'aire bioclimatique sont nécessaires. Afin de bien déterminer l'aire bioclimatique des échantillons collectés, une démarche statistique est nécessaire (Miara *et al.* 2013). Les températures sont en relation étroite avec l'altitude. De façon générale, plus on monte en altitude, plus la température diminue. Le calcul des coefficients de correction permet d'avoir des données plus précises concernant les points considérés (Miara *et al.* 2013). Plusieurs auteurs, comme Seltzer (1946) ; Lucido (1972) ; Chaumont et Paquin (1979) *in* Le Houérou (1989) ont noté l'existence d'une relation linéaire entre les précipitations et l'altitude. Plus l'altitude est élevée, plus les précipitations augmentent. La correction des données climatiques permet de délimiter les différents étages de végétation existants dans la région et cela à travers l'identification des bioclimats locaux. Les valeurs de Q2 obtenues permettent de localiser avec précision les bioclimats dont la variabilité semble expliquer la richesse floristique observée sur le terrain (Miara *et al.* 2013).



**Figure 2.** Climagramme d'Emberger (Emberger 1955).  
Le point en gras montre une station appartenant à l'étage bioclimatique humide inférieur à hiver chaud

## I- Présentation

La famille *Leguminosae* ou *Fabaceae* est la troisième plus grande famille de plantes à fleurs, derrière les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* quant au nombre des genres (730 genres avec 19400 espèces selon le Royal Botanic Garden, Edinburgh 2010) et est considérée la deuxième derrière les *Gramineae* quant à son importance pour l'être humain. Elle est connue pour ses fruits sous forme de gousses et de sa capacité de former des nodules avec les Rhizobia. Sur la base des traits floraux, les *Leguminosae* se séparent en trois sous-familles : les *Papilionoideae* (480 genres, environ 14000 espèces), les *Caesalpinioideae* (170 genres, environ 2000 espèces) et les *Mimosoideae* (80 genres, environ 3200 espèces). Cette famille inclue des cultures pour les grains, des oléagineux, des pâturages et des fourrages, des plantes ornementales et des plantes médicinales (Talukdar 2013). Leurs propriétés nutritives en particulier auraient attiré l'homme, notamment pour compenser un déficit dans l'apport carné ou pour compléter une alimentation basée sur les céréales, riches en amidon (Kislev et Bar-Yosef 1988 ; Zohary et Hopf 1994).

## II- Ecosystèmes naturels et fixation biologique de l'azote

Les légumineuses, via leurs capacités symbiotiques, peuvent jouer un rôle important dans la colonisation des écosystèmes perturbés, y compris ceux qui sont sujets au feu (Arianoutsou et Thanos 1996). En plus de son rôle comme source de protéines dans le régime alimentaire, l'azote fixé par les légumineuses est essentiellement de l'azote "libre" pouvant être utilisé par l'hôte ou par les cultures avoisinantes. Son remplacement par des fertilisants azotés pourraient coûter des billions de \$ annuellement, alors qu'une simple utilisation de légumineuses en rotation pourrait palier à ce problème (Peterson et Russelle 1991). Les contraintes de la fixation de  $N_2$  incluent la sécheresse (Sinclair *et al.* 1987), l'acidité du sol, la fertilisation azotée et les limitations nutritives.

## III- Contenu en protéines

La majeure partie des protéines des grains des légumineuses est présente sous forme de protéines de réserve, représentant des stocks stables d'acides aminés qui fournissent l'énergie et les nutriments pour la germination de la graine et la croissance des plantules. Elles sont généralement produites en grandes quantités et sont stockées dans des corps protéiques où elles sont protégées de la dégradation jusqu'à leur utilisation dans les plantes en croissance. La synthèse des protéines de réserve est généralement étroitement régulée avec une production limitée à des tissus spécifiques et des périodes particulières de développement des graines (Hagan et Higgins 2004). Les légumineuses sont pauvres en acides aminés soufrés, méthionine et cystéine, mais sont riches en lysine et en tryptophane (Mossé et Huet 1990 ; Muller 1983). Toutefois, quand elles sont utilisées en combinaison avec des céréales, qui sont pauvres en

lysine et en tryptophane (Taira 1968), les protéines des légumineuses et des céréales sont complémentaires, chacune en remplaçant les acides aminés limitants de l'autre avec des taux significatifs (Mc Menamy et Oncley 1958). Les légumineuses ne possèdent pas seulement un contenu élevé en protéines, mais également une forte concentration en tryptophane protéique et non protéique. Les fractions non-protéiques sont facilement absorbées et pourraient augmenter la disponibilité de ces acides aminés pour le cerveau (Allegrì *et al.* 1993 ; Zanardo *et al.* 1987), car c'est seulement la forme libre qui est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Comai *et al.* 2007).

#### **IV- Les légumineuses fourragères**

Les légumineuses fourragères représentent 27 % de la production de culture primaire dans le monde (Vance *et al.* 2000). Elles ont été la base de la production de viande et de lait pendant des siècles (Russelle 2001). Lorsqu'elles sont correctement utilisées, elles représentent de riches sources de protéines, de fibres et d'énergie. Même dans l'élevage intensif et la production laitière, où les cultures de céréales sont d'importantes sources d'alimentation, les légumineuses fourragères sont nécessaires pour préserver la bonne santé des animaux (Wattiaux et Howard 2001). La viande et la production laitière dans les pays en développement sont presque exclusivement dépendantes des légumineuses fourragères et des graminées. *Medicago sativa* est la légumineuse fourragère la plus répandue des climats tempérés (Russelle 2001). D'autres espèces de pâturage importantes incluent *Trifolium* spp., *Lotus corniculatus*, *Melilotus* spp. et *Vicia* spp.

#### **V- Rôles des légumineuses sur la jachère**

La pratique de la jachère reste un apport fourrager gratuit et sécurisant pour l'éleveur, indépendant des perturbations climatiques. Les légumineuses représentent un fourrage directement pâturable par les petits ruminants, supplément alimentaire appréciable aux jachères (Oram 1956, cité par Abd El Moneim 1992). En évitant la monoculture, les légumineuses facilitent le contrôle des maladies racinaires et des nématodes des céréales (Bahhady *et al.* 1997) ; elles permettent aussi de lutter contre l'érosion et améliorent la structure du sol ; elles améliorent les productions de matière sèche et de protéines dans les rotations biennales céréales-légumineuses fourragères. Elles procurent à la céréale suivante un apport azoté par la fixation symbiotique de la légumineuse (Shipley *et al.* 1992, cité par Abbas *et al.* 2006).

### **The Birth of Vetch**

Nature one day in cheerful mood  
Conceived, and bore a plant of wondrous good  
She gave it slender trailing stems  
Long noduled roots and pedicel racemes  
From bluish tints of soft Italian sky  
She garnered for its bloom, the purple dye  
With brush of Fairy build and skilled artistic hand  
She painted its queenly flower—the fairest in the land  
Into its nature she did impart  
The alchemic soil restoring art  
Upon her work she gazed bewitched  
For she had wrought the precious vetch

**Smith (1913)**

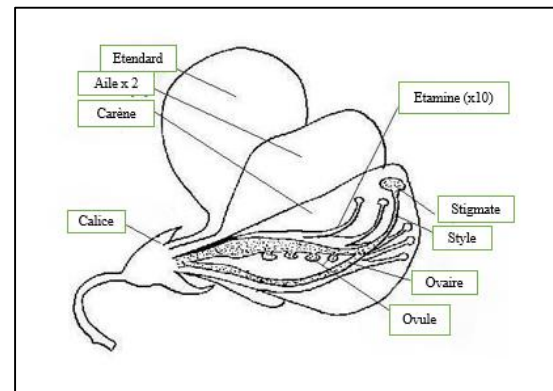
## I- Présentation

Les vesces (*Vicia L.*) sont des herbacées dont les plantes matures sont souvent grimpantes grâce à leurs vrilles caractéristiques (Figure 3). Les tiges ne sont pas ailées, ce qui permet généralement de les différencier des gesses (*Lathyrus L.*). Les fleurs sont des Papilionacées (Figure 4), composées de cinq pétales (un étendard, deux ailes et une carène comprenant deux pétales soudés), solitaires ou en racèmes. Les fruits sont des gousses contenant des graines (Figure 5).

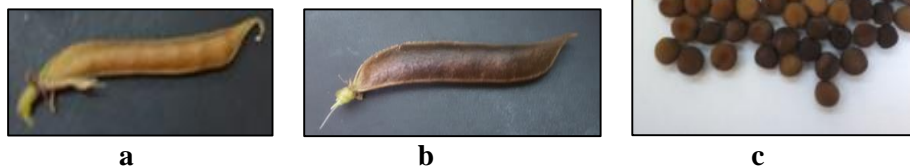
**Figure 3.**  
Différentes parties d'une plante de vesce (Thomé 1885)



**Figure 4.** Schéma d'une fleur de Papilionacée avec ses éléments morphologiques ; vue latérale (Anonyme 2014)

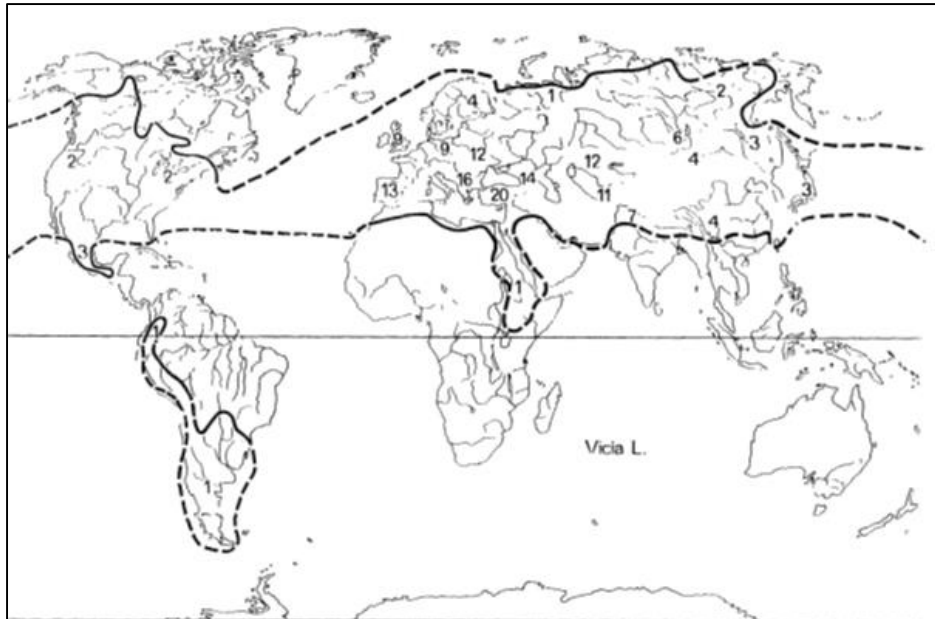


**Figure 5.** Photos de vesces :  
(a) *V. sativa* subsp. *obovata* (gousse)  
(b) *V. narbonensis* (gousse)  
(c) *V. narbonensis* (graines)  
(Bechkri 2015)



Le genre comprend des espèces annuelles ou pérennes dont certaines sont économiquement importantes comme cultures fourragères (*V. benghalensis*, *V. sativa* et *V. villosa*) ou comme des cultures pour les grains (*V. faba* et *V. ervilia*) (Nozzolillo 1977).

La vesce est une légumineuse endémique aux zones tempérées de l'hémisphère nord, à l'Amérique du Sud, à l'Afrique, aux îles Canaries et à Hawaï (Figure 6).



**Figure 6.**  
Distribution naturelle de *Vicia* (les pointillées indiquent des limites insuffisamment connues) ; le nombre des sections du genre sont notés, comme marqueur de la différenciation phylogénétique (Hanelt et Mettin 1989)

## II- Revue historique

Les anciens agriculteurs Romains cultivaient abondamment la vesce comme "ration de balance" pour la fertilisation du sol et pour l'alimentation des animaux domestiques. Ceci laisserait penser que la vesce aurait des origines Italiennes. Ses grains nutritifs ont été utilisés en cuisine, torréfiés, et comme aliment pour les voyageurs dans les déserts orientaux. Le Prophète « Issah » a écrit sur « fitch », ou « vetch » et des données indiqueraient que la vesce fut connue et cultivée dans la région de Babylone depuis sa fondation. Du fait que l'empire Babylonien fut fondé 150 ans après le déluge, ceci indiquerait que la vesce fut réellement utilisée en agriculture lorsque Noah et ses alliés avaient quitté l'Arche et avait repri à nouveau la culture du sol. La vesce fut une culture fertilisante favorite chez les fermiers Romains, sa floraison étant facile. A cette époque, elle prospérait mieux dans les endroits secs et à l'abri de la lumière. Le nom "vik" à partir duquel fut dérivé "*Vicia*" date d'une période très ancienne en Europe, car il est mentionné dans la langue des Pélasges qui étaient les premiers habitants du péninsule grecque, et qui existaient avant le quinzième siècle av. J.-C. La vesce a été également retrouvée dans les régions slaves, d'où a jaillie la Russie (Smith 1913).

### - Domestication de la vesce commune (*Vicia sativa L.*)

Les débuts de la culture de la vesce commune sont mal connus. Sa domestication a pu intervenir en diverses régions. De rares graines de vesce sont présentes dans des sites néolithiques ou légèrement antérieurs, mais des preuves de mise en culture ne semblaient pas exister avant l'époque romaine. Si cette légumineuse est aujourd'hui seulement une plante fourragère, elle était plus vraisemblablement employée dans l'alimentation humaine au Néolithique. Toutefois, dans le monde romain, elle était principalement cultivée pour les



animaux. Les graines faisaient l'objet d'un commerce, mais ne paraissent pas avoir été consommées par l'homme en dehors de périodes de disette (André 1981). Contrairement à d'autres espèces de légumineuses, la large distribution de ses formes sauvages implique, qu'en théorie, la vesce commune a pu être domestiquée indépendamment dans plusieurs zones géographiques (Ladizinsky 1989). L'espèce *Vicia sativa* L. est signalée, souvent ponctuellement, dans divers gisements préhistoriques, peut-être depuis le Natoufien ou le Néolithique précéramique au Proche-Orient, au Néolithique et à l'âge de bronze en Europe ; des signes certains de mise en culture n'existeraient toutefois pas avant l'époque romaine (Zohary et Hopf 1994). Les résultats de Bouby et Léa (2006) apportent des informations directes sur l'exploitation de la vesce commune, à la charnière entre les Ve et IVe millénaires avant notre ère (Néolithique moyen), en Méditerranée occidentale. En ce qui concerne le mode d'acquisition, les graines pouvaient être cueillies à partir de plantes poussant à l'état naturel. Cette hypothèse apparaît cependant comme la moins probable : les formes sauvages des principales légumineuses poussent généralement en petites populations, produisant un faible nombre de graines par plantes et en quantités très variables d'une année à l'autre (Ladizinsky 1987 ; Ladizinsky 1989 ; Zohary 1989). Une exploitation par cueillette serait donc assez peu efficace, aléatoire et demanderait un investissement en temps important. La cueillette devait se faire par arrachage complet de la plante avant maturité des gousses, pour éviter les pertes liées au décalage dans la maturation et la dissémination des graines (Ladizinsky 1987).

### III- Monographies du genre *Vicia*

Les monographies du genre *Vicia* sont rares, le genre reste sinon difficile, du moins très délicat à manier.

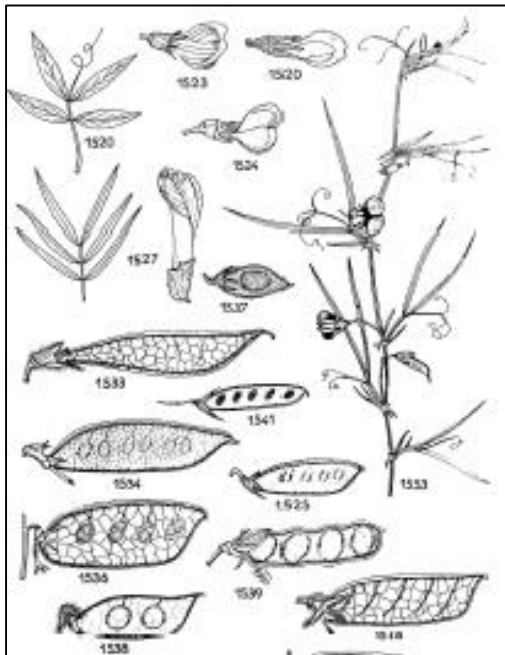
#### III-1- Monographie du genre *Vicia* Linné Sp. Pl. 734 (1753)

Plante herbacée annuelle ou pluriannuelle, à port variable ; soit de petite taille et dressée, ou de grande taille (jusqu'à 2 m) et alors grimpante aidée par des vrilles. Pilosité très variable. Feuilles paripennées, à folioles par paires à nombre variable et de formes très différentes, le plus souvent mucronées. Il peut arriver que les folioles occupent une position alterne l'une par rapport à l'autre. Le pétiole se termine soit par un mucron, soit par une vrille, simple ou ramifiée. Stipules le plus souvent formées de deux parties triangulaires, l'une dirigée en direction du pétiole, l'autre vers le bas. L'ensemble présente un aspect en demi-fer de lance (semi-hasté) et peut être qualifié d'entier, si les bords sont lisses ou simplement dentés, ou de divisé si les bords sont plus ou moins découpés. Inflorescence en grappe de fleurs de 1 à 30 environ ; axillaire, sessile ou plus ou moins longuement pédonculée. Calice glabre ou velu, à 5 dents égales ou inégales ; dans ce dernier cas les 3 dents inférieures sont plus longues que les

deux supérieures. Les deux peuvent être plus courtes, égales, ou plus longues que le tube. Corolle de taille et de couleur variable, rarement velue, mono ou pluri-chromatique ; carène obtuse ; style glabre, « barbu » (terme emprunté à Rouy 1899 (Fl. Fr., 5 :206-249) tout autour ou simplement sur la face inférieure. Gousse oblongue ou rhomboïdale, glabre ou velue, rarement toruleuse, contenant une à plusieurs graines. Environ 150 espèces réparties dans l'hémisphère Nord et dans les Andes. Certaines d'entre elles sont cultivées et constituent de bonnes plantes fourragères. Espèce type : *V. sativa* Linné Sp. Pl. ed. 1 : 736 (1753).

### III-2- Description de Quézel et Santa (1962)

*Vicia* L. (*Vesce*, « *Djilbans* », « *Djilbana* ») : Calice à 5 dents subégales. Etamines diadelphes (9-1) ou monadelphes vers la base. Gousse de forme variable, comprimée, aplatie, déhiscente. Graines globuleuses ou comprimées. Feuilles paripennées à rachis se terminant souvent par une vrille ou une soie ; stipulées.



**Figure 7.** Différentes parties de quelques espèces de vesce décrites par Quézel et Santa (1962). 1520 : *V. bithynica* L., 1523 : *V. peregrina* L., 1524 : *V. sativa* L., 1525 : *V. glauca*, 1527 : *V. sicula*, 1533 : *V. onobrychioides* L., 1534 : *V. villosa* Roth., 1536 : *V. monardi* Boiss., 1538 : *V. disperma* DC., 1539 : *V. ervilia* (L.) Willd

### III-3- Description de Kupicha (1976)

Plantes annuelles ou pérennes. Feuilles hypostomatiques à hypo-amphistomatiques, paripennées, habituellement vrillées, occasionnellement mucronées ; stipules monomorphiques, toujours avec une fosse nectarifère glandulaire sur la face abaxiale. Inflorescence 1- plusieurs felurs, pédoncule très rarement plus long que la feuille correspondante et communément plus court que la fleur. Fleur parfois sessile à l'aisselle des feuilles. Calice régulier ou irrégulier. Vexillum platonychioïde ou stenonychioïde, rarement pubescent sur la face abaxiale. Style avec pilosité tout autour de l'apex ou seulement sur la face abaxiale, toujours velu sur sa face abaxiale. Gousse non stipitée, contenant un tissu laineux, parenchymeux bien développé entre

les graines ; gousses oblongues, rhomboidales ou linéaires. Graines avec un hile long à court, surface lisse ou rarement rugueuse ; lens proche du hile ou dans la face opposée de la graine ; absence de canavanine.

#### IV- Taxonomie

##### IV-1- Histoire de la classification taxonomique

La première entité distincte reconnue comme *Vicia* a été proposée par Tournefort (1694) dans « Eléments de Botanique » qui y intégra six espèces excluant la fève, qu'il considéra comme un genre à part entière. Le premier auteur qui avait proposé des groupes subgénériques au sein du genre *Vicia* fut Linné (1753) qui avait divisé le genre en deux sous-groupes. Cette subdivision basée sur la longueur relative du pédoncule est restée le concept prédominant dans la classification subgénérique. L'étape importante suivante fut entreprise par Koch (1836), qui avait subdivisé les espèces sessiles ou subsessiles du genre (sous-genre *Vicia sensu* Kupicha) en trois groupes, séparant *V. faba* et *V. bithynica* des autres taxa du sous-genre *Vicia*. Le placement de ces deux espèces, séparées par Koch en groupes monospécifiques, reste un sujet de débat depuis les travaux de cet auteur. Godron (1849) fut le premier à avoir séparé la section *Faba sensu* Kupicha (1976) en une unité distincte. Les groupes basiques identifiés par Alefeld (1859, 1860, 1861 a, b, c) sont ceux qui sont encore reconnus aujourd'hui. Bien qu'il ait fait ressortir plusieurs genres et sections, qui n'ont pas été utilisés par des auteurs ultérieurs, son utilisation des « bons » caractères était perspicace et lui a permis d'identifier des groupes naturels. La classification de Boissier (1872) avait repris les groupes naturels établis par Alefeld, mais avait réinstauré le concept plus large de *Vicia*, fournissant un classement taxonomique plus acceptable pour les auteurs ultérieurs. Fedtschenko (1948) et, plus tard, les botanistes Russes (Radzhi 1971 ; Tzvelev 1980 ; Nikiforova 1985) ont tous proposé, comme Alefeld, des classifications très détaillées du genre. Le concept de Kupicha (1976) est plus complet, chose qui est rare dans les classifications contemporaines qui ont été, en grande partie, réalisées pour des flores régionales. Sa classification peut également être considérée comme le point culminant des classifications précédentes (Maxted 1993a). Vingt classifications majeures du genre *Vicia* ont été établies depuis Linné (Maxted 1991a). Cependant, certains groupes d'espèces se répètent tout au long de l'histoire du genre.

##### IV-2- Classification taxonomique

La classification APGIII (2009) classe le genre *Vicia* comme suit :

Règne : Plantae

Clade : Angiospermes

Clade : Dicotylédones vraies

Clade : Noyau des Dicotylédones vraies

Clade : Rosidées

Clade : Fabidées

Ordre : Fabales

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *Papilionoideae*

Tribu : *Fabeae*

Genre : *Vicia* L., 1753

Le nombre des espèces varie significativement. Il est estimé à environ 150 par Kupicha (1976) à environ 210 par Hanelt et Mettin (1989), indiquant des problèmes avec la délimitation des espèces dans le genre. Dans la majorité des traitements, les espèces ont été regroupées en trois ou quatre groupes, *Cracca* L., *Ervum* L., *Vicia* L. et parfois *Faba* Mill., reconnue soit comme sous-genre ou même comme un genre à part entière (Ball 1968 ; Davis et Plitman 1970 ; Radzhi 1971). Kupicha (1976) avait divisé le genre en deux sous-genres, *Vicia* et *Vicilla*, avec 22 sections (Tableau 6). Maxted *et al.* (1991b) ont divisé le genre en deux sous-genres également, *Vicia* et *Vicilla*, mais avec 9 et 17 sections, respectivement.

**Tableau 6.** Résumé de la classification sectionnelle des sous-genres *Vicilla* et *Vicia* (Kupicha 1976 ; Maxted 1993a)

<b>Sous-genre <i>Vicilla</i> (sensu Kupicha 1976)</b>	
<i>Vicilla</i>	15 espèces
<i>Cassubicae</i>	9 espèces
<i>Perditae</i>	1 espèce
<i>Cracca</i>	40 espèces (incl. <i>V. cracca</i> , <i>V. villosa</i> , <i>V. monantha</i> )
<i>Variiegatae</i>	3 espèces
<i>Pedunculatae</i>	3 espèces
<i>Americanae</i>	1 espèce
<i>Subvillosae</i>	1 espèce
<i>Volutae</i>	1 espèce
<i>Panduratae</i>	3 espèces
<i>Ervum</i>	3 espèces
<i>Erviodes</i>	1 espèce ( <i>V. articulata</i> )
<i>Ervilia</i>	1 espèce ( <i>V. ervilia</i> )
<i>Lentopsis</i>	1 espèce
<i>Trigonellopsis</i>	3 espèces
<i>Austarles</i>	13 espèces
<i>Mediocintae</i>	1 espèce
<b>Sous-genre <i>Vicia</i> (sensu Maxted 1993a)</b>	
<i>Atossa</i>	4 espèces
<i>Microcarinae</i>	1 espèce
<i>Hypechusa</i>	14 espèces (incl. <i>V. galeata</i> , <i>V. noeana</i> , <i>V. hybrida</i> )
<i>Peregrinae</i>	3 espèces
<i>Wiggersia</i>	2 espèces
<i>Vicia</i>	5 espèces (incl. <i>V. sativa</i> )
<i>Bythynicae</i>	1 espèce
<i>Narbonensis</i>	7 espèces (incl. <i>V. narbonensis</i> )
<i>Faba</i>	1 espèce ( <i>V. faba</i> )

Les auteurs ont inclu trois unités dans la section *Faba* du sous-genre *Vicia*, deux parmi elles sont monotypiques : *V. faba* et *V. bithynica* alors que la troisième, plus large, contient sept espèces regroupées dans le complexe d'espèces *Narbonensis*. Plus tard, Maxted (1993a) a proposé une nouvelle classification du sous-genre *Vicia* où neuf sections sont repertoriées, la section *Faba* a été substituée par trois sections distinctes : la section *Bithynicae*, la section monospécifique *Faba* et le NSC. Différents aspects de la classification proposée par Maxted (1993a) ont été ensuite confirmés (Fennell *et al.* 1998, Venora *et al.* 2000, Leht et Jaaska 2002, Frediani *et al.* 2005). Cependant, beaucoup de questions restent obscures, comprenant entre autres certaines compositions sectionnelles et les relations phylogénétiques entre les sections (Caputo *et al.* 2006). Aucune révision détaillée semblable n'a été entreprise pour le sous-genre *Vicilla*.

#### IV-2-1- Le sous-genre *Cracca* (*Vicilla sensu Kupicha*)

Le sous-genre *Cracca*, inclut approximativement 140 à 160 des espèces du genre *Vicia*. Sur le plan phylogénétique, c'est est un assemblage assez hétérogène avec une large variation de beaucoup de caractères. Le genre est beaucoup plus variable sur le plan biochimique : il comprend un plus grand nombre d'acides aminés libres et des glucides de faible poids moléculaire dans les graines, comparé au second sous-genre (Tschiersch *et al.* 1967 ; Yasui *et al.* 1987) ; ainsi que différents acides aminés non-protéogènes. La présence de la canavanine semble être limitée au sous-genre *Cracca* mais pas équitablement distribuée à l'intérieur de ce groupe. De même, il présente l'ensemble du spectre de variation chromosomique observée. Les plus grandes sections du sous-genre sont *Vicilla*, *Cassubicae*, *Cracca* avec des taxa plus nombreux principalement en Europe et le Nord (jusqu'au centre) de l'Amérique (mais aussi *V. cracca* avec une distribution globalement zonale) et enfin la section *Australes*. Les autres sections sont mono- ou oligotypiques et incluent des espèces annuelles ou pérennes.

#### IV-2-2- Le sous-genre *Vicia*

Le sous-genre *Vicia* est moins large et ne comprend pas plus de 40 à 50 espèces. Ces dernières sont presque exclusivement annuelles et très rarement pérennes. Il est, morphologiquement, moins variable, que le sous-genre *Cracca*, manque d'acides aminés libres inhabituels, excepté pour la 3-cyanoalanine et son dérivé -glutamyl, qui caractérise la sect. *Atossa* et la sect. *Vicia*. Les autres groupes se distinguent par un niveau très élevé d'arginine dans le pool d'acides aminés libres des graines et (comme c'est le cas des autres espèces) par un taux moindre des autres acides aminés protéogènes communs. La distribution des espèces est plus restreinte. Elle couvre principalement la région Méditerranéenne et les pays du Proche et Moyen-Orient de la région floristique irano Turanique. Le sous-genre *Vicia* semble être une

branche plutôt nouvellement évoluée ; son évolution doit être corrélée avec la diminution de la superficie de la mer Téthys et le développement de régions plus arides de climat de type Méditerranéen. Le groupe le plus variable du sous-genre est la sect. *Hypechusa* (Kupicha 1976). La section *Atossa* est un groupe particulier à cause de la croissance pérenne de ses espèces.

#### IV-3- Les débats de la taxonomie

Les débats se focalisent autour de deux complexes *V. sativa* et *V. narbonensis*. Les botanistes ne s'accordent pas sur le rang et le nombre de taxa appartenant à chacun de ces deux complexes (Stankevich 1978, Zohary et Plitmann 1979, Maxted 1995, Potokina 1997 ; Plitmann 1967, Davis et Plitmann 1970, Schäfer 1973, Maxted 1993a, Bennet et Maxted 1997). Les problèmes de la distinction sont la résultante des approches régionales de la taxonomie. La grande variabilité dans les traits morphologiques et dans les caryotypes et les résultats contradictoires des études morphologiques ont rajouté à la confusion (Hanelt et Mettin 1989 ; Maxted *et al.* 1991b).

##### IV-3-1- Le complexe *Vicia sativa*

Alors que certains auteurs reconnaissent huit taxa dans ce complexe, d'autres le considèrent comme une seule espèce *V. sativa* L. *sensu lato* avec des sous-espèces et variétés (Potokina 1997). Cette espèce varie sur le plan cytologique et il n'existe pas de distinction morphologique claire entre certains de ces taxa, spécialement ceux qui sont le plus répandus (*sativa*, *cordata*, *segetalis* et *angustifolia*), parce que les caractères couramment utilisés pour leur identification se chevauchent considérablement. Ball (1968) considère *V. angustifolia* comme une sous-espèce de *V. sativa* (i.e. subsp. *nigra* (L.) Ehrh.) alors que Scoggan (1979) la considère comme *V. sativa* var. *angustifolia* (L.) Wahl. D'autres, toutefois, ont traité ces variantes, incluant *V. angustifolia*, comme une espèce à part entière (Hanelt et Mettin 1966, dans Hollings et Stace 1978). Van de Wouw *et al.* (2001) reconnaît six sous-espèces dans le complexe et exclut *V. incisa* en lui donnant un rang d'espèce (Tableau 7).

**Tableau 7.** Taxa du complexe *Vicia sativa* (Van De Wouw *et al.* 2001b)

<i>Vicia sativa</i> L. subsp. <i>amphicarpa</i> (L.) Batt. subsp. <i>cordata</i> (Wulfen ex Hoppe) Asch. Et Graebner subsp. <i>macrocarpa</i> (Moris) Arcang. subsp. <i>nigra</i> (L.) Ehrh. (syn. = <i>V. angustifolia</i> L.) subsp. <i>sativa</i> subsp. <i>segetalis</i> (Thuill.) Gaudin
--

Outre la vesce commune, d'autres membres du complexe ont également des intérêts agronomiques. Tout comme la sous-espèce *sativa*, la sous-espèce *cordata* est de temps en temps cultivée comme fourrage (Hanelt et Mettin 1989). Occasionnellement, la sous-espèce

*macrocarpa* a été également cultivée (Bonnier 1934). *V. sativa* subsp. *amphicarpa* a le potentiel d'améliorer la productivité des pâturages dégradés. Elle pousse dans les zones à faibles précipitations et pourrait s'avérer précieuse dans les pâturages en zones semi-arides de la Méditerranée (Christiansen *et al.* 1996). Il est relativement facile d'utiliser le pool de gènes du complexe pour introduire des traits désirables dans les taxa cultivés. Les sous-espèces *cordata* et *sativa* se ressemblent sur différents aspects ; les agronomes s'intéressant à la vesce commune devraient également prendre en considération la possibilité d'utiliser la sous-espèce *cordata* (Van de Wouw *et al.* 2003).

#### **IV-3-2- La vesce commune (*V. sativa* subsp. *sativa*)**

La vesce commune est cultivée comme fourrage et engrais vert. Sa surface de culture a décliné depuis les années 1960, mais durant les dernières années, l'intérêt porté à cette culture tant dans la région Méditerranéenne que dans les autres régions au climat Méditerranéen a augmenté. En 2000, plus d'un million d'hectares ont été plantés avec des vesces dont plus de la moitié dans la région Méditerranéenne (FAO 2001). La vesce commune est souvent cultivée pour la production de foin dans les mélanges céréale-vesce avec un ratio de 0.75 de vesce commune et 0.25 de la céréale (Orak et Nizam 2004). Dans la région Méditerranéenne, elle a un large potentiel de remplacement dans la jachère en rotation avec les céréales (Abd El-Moneim 1993), dans laquelle elle peut contribuer d'une manière importante à la balance d'azote (Papastyliou 1999). Les grains broyés peuvent être utilisés comme concentré dans l'alimentation du bétail (Açikgöz 1988). Au Moyen Orient, elle est également utilisée pour la production fourragère dans les systèmes de culture avec l'avoine ou l'orge (Al-Masri 1998) et donne souvent des rendements plus élevés que les autres légumineuses annuelles (Christiansen *et al.* 2000). Elle peut également augmenter les rendements en lait des chèvres qui la consomment sous forme de foin (Berhane et Eik 2006). L'affouragement peut, en particulier, être utile pour aider le bétail à passer la mauvaise saison, ou pour des animaux faisant face à des besoins particuliers (allaitement, jeune âge, efforts à fournir pour le travail, maladie). La vesce commune peut fixer plus de 100 Kg/ha d'azote (Mueller et Thorup-Kristensen 2001) et peut être cultivée sur des sols salins (Akhtar et Hussain 2009).

#### **- Composition et toxicité**

Les graines s'avèrent toxiques, au moins chez les animaux monogastriques, lorsqu'elles sont consommées régulièrement et en quantité importante. L'inclusion de 50% de vesce au régime alimentaire entraîne un taux de mortalité élevé chez les poules et un retard de croissance chez les rats (Tate 1996). La toxicité pour l'homme est mal estimée, mais probable, au moins à fortes doses. Elle résulte notamment de la présence, dans les graines, d'environ 1% de  $\gamma$ - glutamyl- $\beta$ -

cyanoalanine, substance affectant le métabolisme des acides aminés soufrés (Tate 1996 ; Tate et Enneking 1992). En outre, les graines de vesce cultivée contiennent de la vicine, susceptible de provoquer le favisme (Brown 1992). Cette toxicité pourrait cependant être réduite par lessivage ou trempage des graines (Tate 1996 ; Zohary et Hopf 1994). Par ailleurs, une consommation occasionnelle ou en faibles quantités semble sans conséquences (Bouby et Léa 2006). Des graines de vesce sont consommées ponctuellement en Turquie, fraîches ou bouillies (Baytop 1994 ; Ertug-Yaras 1997). Au début des années 1990, l'Australie exportait de la vesce cultivée comme substitut bon marché de graines de lentille, en particulier en direction des pays du Moyen-Orient et des pays asiatiques (Tate et Enneking 1992). Avec une reconnaissance croissante de l'importance des légumineuses pour la santé humaine, beaucoup d'attention a été accordée à la composition chimique des grains de vesce commune (Açıkgöz *et al.* 1985 ; Pastor-Cavada *et al.* 2009 ; Samarah et Ereifej 2009). Dans les grains, les acides gras ont un degré d'insaturation élevé (65-75%) (Akpınar *et al.* 2001). L'acide glutamique (19.9%) et l'acide aspartique (14.8%) sont les acides aminés les plus prédominants dans les grains de la vesce commune (Açıkgöz *et al.* 1985 ; Karadag et Yavuz 2010). Selon Uzun (2011), les grains sont riches en Ca, Mg, Mn, Zn et Cu. Cependant, selon Açıkgöz *et al.* (1985), les grains de vesce commune renferment des taux extrêmement faibles en Ca, Mg et Mn mais sont riches en P. Ainsi, la composition minérale apparaît significativement différente selon l'origine géographique, qui est attribuée aux facteurs génétiques et aux conditions environnementales des aires de production (Akpınar *et al.* 2001).

#### - **La vesce dans les associations fourragères**

L'association graminée-légumineuse peut se montrer avantageuse et devrait permettre un fourrage à la fois abondant et riche en protéines, donc un fourrage équilibré (Theriez 1965, cité par Bentamallah 1984) qui dépend de la compatibilité des espèces, de leur proportion dans l'association et surtout de leur stade optimum de coupe. Dans la pratique, ces conditions sont très difficiles à satisfaire et plus particulièrement pour l'association vesce-avoine (Bentamallah 1984), en raison d'un problème de choix variétal. En plus, on constate souvent que la vesce, disparaît face à l'agressivité de l'avoine (Ouknider et Jacquard 1988). En culture pure, la vesce est plus riche en azote que le pois. Cependant, la teneur en azote des associations pois-avoine, pois-orge et pois-triticales, est plus élevée que celle de la vesce-avoine, vesce-orge et vesce-triticales. Ceci montre l'importance de l'équilibre de l'association quant à la qualité du fourrage : plus le taux de la légumineuse est élevé, plus la teneur en azote de l'association est améliorée. D'après Ouknider et Jacquard (1986), la teneur de la cellulose brute est indépendante du pourcentage de la légumineuse dans le mélange. Le fourrage le plus digestible est la vesce-



triticale, le moins digestible est la vesce-orge. La digestibilité de la matière sèche diminue au fur et à mesure que le taux de la légumineuse diminue dans l'association. Ainsi, la digestibilité reste sous la dépendance de la proportion de la légumineuse dans le fourrage (Ouknider et Jacquard 1986). Le développement de la vesce se trouve affecté quand la biomasse de la graminée est élevée. En association, la vesce au lieu d'émettre des rameaux en abondance comme en culture pure, elle tend à acquérir la hauteur de son compétiteur engendrant alors un déséquilibre dans la composition du mélange au profit de la graminée (Ouknider et Jacquard 1988). Par conséquent, il faut choisir des espèces ayant une force de concurrence à peu près égale, car le problème de la concurrence entre les plantes fait ressortir le problème de l'étouffement de certaines espèces par d'autres plus vigoureuses. Les ratios graminée-légumineuse doivent être étudiées et l'analyse des qualités nutritives des différentes associations doit être effectuée d'une manière plus détaillée. La date de récolte a une grande influence sur la qualité de l'association. C'est pour cela qu'avant d'établir un mélange, il faut prendre en considération la durée de leur cycle végétatif ainsi que leur rythme de végétation, car si l'une croît plus vite que l'autre, un déséquilibre et une disproportionnalité entre les deux plantes peuvent en découler et dénaturer la composition botanique souhaitée (Hamrit 1995).

#### **IV-3-3- Situation de la vesce en Algérie**

Quézel et Santa (1962) mentionnent près de 36 espèces et sous-espèces de vesces spontanées en Algérie. *V. sativa* a été introduite par les colons pour la production de foin de vesce-avoine. L'amélioration génétique de la vesce a été entreprise dès 1937 par la Station Centrale de Maison Carrée. Ce programme de sélection a abouti à la création de certaines variétés. Le travail de sélection ne s'est pas poursuivi et les variétés mises au point se sont mélangées avec les semences importées en quantité importante depuis l'indépendance. L'Algérie a importé de façon assez régulière différentes variétés de France, d'Espagne, de Turquie et d'ailleurs, car la production de semences a souvent été nettement inférieure aux besoins (INRAA 2006). Dans notre pays, la vesce est une ancienne culture utilisée uniquement en association avec l'avoine. Elle est utilisée le plus souvent sous forme de foin et rarement en grains. La culture de la vesce avoine n'arrive pas à s'adapter à toutes les conditions agro-écologiques de l'Algérie par manque de diversité spécifique et variétale : une seule espèce de vesce est cultivée (*Vicia sativa*, variété Languedoc). En outre, cette espèce est très sensible au stress abiotique, l'égrenage des gousses (Acikgoz 1988) et la production de semences nulle.

#### **IV-3-4- Le complexe *Vicia narbonensis***

Le complexe d'espèces *Narbonensis* est constitué par *Vicia narbonensis*, *Vicia serratifolia*, *Vicia galilaea*, *Vicia hyaeniscyamus*, *Vicia johannis*, *Vicia kalakhensis* et *Vicia*

*eristalioides*. La vesce de Narbone (*V. narbonensis*) a le potentiel de devenir une culture importante pour le grain et le foin pour l'alimentation animale dans les zones tempérées arides. *V. narbonensis* var. *narbonensis* est cultivée comme culture mineure au Moyen-Orient (Maxted 1995). Des auteurs l'ont observé en culture en Syrie et elle continue également à être cultivée dans le Nord de l'Iraq et le Sud Est de la Turquie. Les recherches concernant l'extension de sa culture sont focalisées dans le Sud de l'Australie (Castleman *et al.* 1996) ainsi qu'à l'ICARDA. Cette espèce a montré un haut rendement, les graines contiennent un taux élevé de protéines et montre une tolérance au froid et à la sécheresse. Elle montre une adaptation dans des zones recevant 250–300 mm de précipitations annuelles avec des températures basses en hivers (Abd El Moneim 1992). Le NSC est retrouvé la plupart du temps dans les bordures des champs, les prairies, comme mauvaises herbes des champs cultivés et dans les friches. Les taxa de ce groupe préfèrent, généralement, les sols calcaires, excepté pour *V. narbonensis* var. *jordanica* H. Schäfer et *V. hayaenscyamus* Mout., qui ont été uniquement retrouvées sur des sols basaltiques. D'une manière similaire, *V. johannis*, une espèce avec une distribution plus au nord que *V. narbonensis* et donc une meilleure adaptation au froid, pourrait présenter un potentiel comme une culture fourragère. Les membres du complexe peuvent être retrouvés dans les pays entourant la Méditerranée, l'Europe et l'Asie du Sud-Ouest (Bennett et Maxted 1997).

#### V- Cytogénétique

Chez les vesces, il existe une grande variabilité dans la taille des chromosomes, le contenu d'ADN nucléaire, les séquences d'ADN répétitives et non-répétitives, le nombre de chromosomes ( $2n = 10, 12, 14, 24, 28, 36, 42$  ;  $x = 5, 6, 7$ ), l'euchromatine (75-88%) et l'hétérochromatine (11-25%), l'hétérogénéité de la composition de bases (17.08-19.52), les séquences d'ADN satellite, le contenu G+C (34.89-38.06%), les unités de répétition d'ADN ribosomal et la densité de l'ADN (0.096-0.263) par unité de surface (Chooi 1971; Raina et Rees 1983 a, b; Raina et Narayan 1984; Narayan *et al.* 1985 ; Raina et Bisht 1988 ; Raina 1990 ; Raina et Ogihara 1995). La principale différence entre les deux sous-genres est l'absence totale de taxa polyploïdes dans le sous-genre *Vicia*. Alors que les génomes diploïdes les plus larges (lot chromosomique haploïde  $> 50 \mu\text{m}$ ) appartiennent principalement aux sections *Faba* (*V. faba*), *Hypechusa* (*V. melanops*, *V. anatolica*) ou *Peregrinae* (*V. peregrina*), qui appartiennent toutes au sous-genre *Vicia*, les chromosomes de petite taille sont répartis sur l'ensemble du genre. Il existe une prévalence des chromosomes méta ou submétacentriques dans le sous-genre *Cracca*, alors que les chromosomes subtélocentriques prédominent dans le sous-genre *Vicia* (Hanelt et Mettin 1970). Les tétraploïdes et les hexaploïdes sont bien souvent indiscernables et la majorité des ancêtres diploïdes des espèces polyploïdes sont inconnus.

**- Cytogénétique de *Vicia sativa***

Trois nombres différents de chromosomes ont été reportés pour *V. sativa*. La majorité présente les nombres diploïdes  $2n = 12$ . Les nombres  $2n = 10$  et  $2n = 14$  sont occasionnellement observés (Ladizinsky 1978 ; Ladizinsky et Temkin 1978). Le rang taxonomique controversé du complexe *sativa* est apparemment dû à l'hybridation entre individus de différents cytotypes. Selon Rowlands (1959), des contaminations dans les cultures commercialisées de lentilles (*Lens esculenta* L.  $2n = 14$ ) sont dues à l'hybridation spontanée avec *V. sativa* ( $2n = 12$ ). Par conséquent, une contamination génétique est également possible dans le complexe *sativa*. Les populations sauvages constituent un pool de gènes potentiel pour la résistance aux facteurs de stress, les maladies des insectes et des plantes, la précocité ... etc. (Çeliktas *et al.* 2006).

**VI- Evolution et hybridation des espèces**

Le processus de spéciation est initié par des réarrangements chromosomiques, causés par des mutations ou des hybridations entre les taxa sympatriques les plus proches. Ces altérations de la structure du génome fonctionnent comme un mécanisme d'isolement qui est renforcé par une auto-pollinisation prédominante des plantes annuelles. Les réarrangements chromosomiques spontanés doivent également être liés aux changements des nombres basiques des chromosomes ; ils sont évidemment prérequis pour l'existence de caryotypes à 14, 12 et 10 chromosomes. Beaucoup d'auteurs se sont intéressés à l'hybridation au sein du genre (Mettin 1962 ; Donnelly et Clark 1962 ; Watanabe et Shimano 1966 ; Rousi 1973 ; Cubero 1982 ; Yamamoto 1977 ; Ladizinsky 1978 ; Ladizinsky et Shefer 1982). Il en ressort que : (a) l'hybridation entre les membres de la section *Vicia* peut être facilement atteinte. Les hybrides sont plus ou moins stériles ; cependant, des descendants peuvent être obtenus après un back-cross, une autofécondation ou un doublement de compléments de chromosomes. (b) bien que la fertilité des hybrides obtenus entre *V. faba* et *V. narbonensis* a été prouvée, les embryons hybrides avortent à un stade ultérieur. (c) l'hybridation intersectionnelle ou même inter-subgénérique échoue dans la majorité des cas, mais quelques cas ont réussi (Cubero 1982 ; Ramsay et Pickersgill 1986). Une hybridation occasionnelle se produit dans la nature, particulièrement dans les habitats instables (Zohary et Plitman 1979).

**VII- Les ressources génétiques des espèces de *Vicia L.* en Méditerranée**

L'aire de culture des espèces traditionnelles cultivées comme *V. ervilia* (Esteban 1996) et *V. articulata* (Hammer et Perrino 1995) a généralement baissé. L'aire de production des espèces récemment domestiquées comme *V. villosa*, *V. benghalensis* et *V. pannonica* semblent, cependant, en augmentation. Leur grande adaptation et leur excellente capacité à produire de la biomasse les rendent très attractives pour les fermiers. La vesce velue (*V. villosa* Roth) est

cultivée comme engrais vert dans la culture de la tomate (Abdul Baki *et al.* 1997). La vesce cultivée est la culture fourragère la plus commune dans la région Méditerranéenne. L'expansion de cette espèce a été entravée par les préoccupations au sujet de la toxicité des graines pour la consommation humaine (Tate et Enneking 1992 ; Enneking 1995). Cependant, le commerce clandestin de cette espèce pour la consommation humaine continue (Tate *et al.* 1999). Beaucoup d'espèces du genre sont considérées comme des mauvaises herbes (Gams 1924 ; Aarssen *et al.* 1986). *Vicia cracca*, une espèce pérenne, est très envahissante et particulièrement difficile à contrôler. *Vicia sativa* subsp. *nigra* et *Vicia villosa* peuvent causer des problèmes chez les céréales en rendant la récolte mécanique très difficile, engendrant ainsi la perte de la culture et augmentant l'incidence de maladies fongiques (Aarssen *et al.* 1986). Parmi les autres espèces considérées comme mauvaises herbes dans les champs : *V. benghalensis*, *V. tetrasperma* (L.) Schreber, *V. tenuissima* (Bieb.) Schinz & Thell., *V. hirsuta* (L.) S.F.Gray, *V. disperma* DC., *V. ervilia*, *V. articulata*, *V. sepium* L., *V. bithynica* L., *V. narbonensis*, *V. peregrina* L., *V. lutea* L., *V. grandiflora* Scop. et *V. pannonica* Crantz (Hanf 1990). Quelques génotypes de *Vicia sativa* sont connus pour mimer la forme des grains de lentille et sont retrouvés en mélange avec cette dernière (Erskine *et al.* 1994).

### VIII- Ecologie du genre

L'écologie des espèces du genre *Vicia* varie considérablement, mais ces espèces ne tolèrent généralement pas les conditions environnementales extrêmes. Beaucoup d'entre elles sont adaptées aux habitats un peu plus ouverts dans les forêts, aux bords des forêts ainsi que dans les forêts aux allures de parcs ouverts (*V. cassubica* et ses alliés, le groupe de *V. tenuifolia* et *V. pisiformis* parmi les espèces vivaces du vieux monde, caractérisées par une distribution de type continental). Dans la plupart des cas, les espèces héliophiles sont adaptées à des environnements plus ou moins xériques. Les taxa héliophiles et xérophiles sont principalement préadaptés pour la colonisation des habitats instables et ceux créés par l'homme. Du fait que tous les membres du sous-genre *Vicia* soient caractérisés par des spots nectarifères sur les stipules ; sur la base de leur sécrétion du nectar, un mutualisme entre les vesces et les fourmis a été développé comme une stratégie de défense contre les herbivores (Burkart 1966).



**Figure 8.** L'intérêt d'ouvrières de *Lasius neglectus* pour *Vicia sativa* (Wagenknecht 2016)

## IX- Reproduction

La reproduction a lieu par les graines, bien que les espèces pérennes aient pu acquérir la capacité supplémentaire de multiplication végétative. La production des grains résulte de la pollinisation croisée ; les fleurs sont adaptées à la pollinisation par les hyménoptères. Un basculement de l'allogamie vers l'autogamie a lieu indépendamment dans les groupes d'espèces annuelles des deux sous-genres. Des espèces annuelles, à petites fleurs, du sous-genre *Cracca* (*V. hirsuta*, *V. ervilia*, *V. articulate*) ainsi que les espèces *V. sativa* et *V. lathyroides* du sous-genre *Vicia* sont connues comme plantes autogames. Toutefois, un certain taux de fécondation croisée peut avoir lieu pour *V. sativa* (Hanelt et Mettin 1970).

## X- Centre de diversité

La région Méditerranéenne est le centre de diversité le plus important des espèces du genre *Vicia*. Des centres de diversité secondaires existent dans l'Amérique du Sud, l'Amérique du Nord et le Sud de la Sibérie (Kupicha 1981 ; Nikiforova 1988 ; Hanelt et Mettin 1989). La concentration relative des espèces peut renseigner sur le centre d'origine, ce qui pourrait suggérer une origine en Europe du Sud-Est et en Asie du Nord-Ouest. Plus de la moitié des taxa de *Vicia* sont endémiques à cette région. Il existe, cependant, des preuves que les taxa ayant des centres de distribution aux Balkans, au Sud-Ouest et au Sud-Est de l'Asie sont généralement centrés dans ces zones du fait de la détérioration climatique et du mouvement floristique des flores distribuées le plus au Nord (Takhtadjan 1969). Stebbins (1967) suggère que les espèces avec le plus de plasticité génotypique et phénotypique évoluent rapidement à partir du centre de diversité, alors que les espèces les plus primitives resteront au centre. Ceci rendrait compte de la distribution courante et des différentes formes de *V. sativa* ainsi que de la nature localisée de quelques espèces primitives très restreinte (*V. dionysiensis*). Contrairement à cette hypothèse, Willis (1921) avait, cependant, souligné que l'évolution et la dispersion des plantes se produit à la même vitesse. Les espèces les plus anciennes et les plus primitives sont donc probablement les plus répandues et se retrouvent actuellement sur la périphérie de distribution, alors que les espèces qui ont évolué le plus récemment se trouvent au centre d'origine. Ceci expliquerait la distribution à grande échelle de *V. sepium*. Bien que la dernière hypothèse, n'explique pas clairement la grande distribution de *V. sativa*, considérée comme une espèce avancée. Les données archéologiques suggèrent que *Vicia sativa* était une mauvaise herbe qui s'est propagée de la région Méditerranéenne à l'Europe Centrale avec l'assemblage précoce des cultures de céréales, des lentilles et de la vesce amère (*Vicia ervilia*). Avec l'expansion de l'agriculture, il y a eu une augmentation dans la diversité sur le plan intraspécifique par une adaptation aux nouveaux habitats. *V. sativa*, *V. villosa* et *V. narbonensis* peuvent être cités

comme exemples. Les nouveaux taxa domestiqués se seraient développés pour répondre aux besoins de la production agricole dans des niches écologiques et économiques spécifiques. Les développements des cultures de *Vicia* à l'ICARDA et en Australie reflètent cette tendance (Frankel 1977). Le sous-genre *Vicia* a certainement son centre de diversité dans le Levant, comme cela a été démontré par Maxted (1995). Les montagnes sont aujourd'hui quelques-uns des derniers refuges pour les espèces rares du genre.

### XI- Statut de conservation des ressources

Les premières collections de vesce ont été réalisées par Vavilov durant les années vingt (Vavilov 1996) et les expéditions allemandes durant la 2<sup>nd</sup>e guerre mondiale en Albanie et en Grèce (Flitner 1995). Les espèces qui n'ont pas le potentiel d'être utilisées immédiatement n'ont pas été conservées de façon systématique. Ces espèces ont été largement collectées par Maxted et ses collaborateurs en collaboration avec l'IBPGR et l'ICARDA, et plus tard par l'ICARDA et CLIMA. Tout ce matériel a été dupliqué à l'unité des ressources génétiques à l'ICARDA et dans le pays de collecte. Les informations détaillées concernant le statut actuel de conservation est documenté par WIEWS et SINGER. Bien que beaucoup d'espèces annuelles natives de la région Méditerranéenne ont été conservées de manière adéquate, la germination et la croissance jusqu'à fructification des espèces pérennes sont un problème majeur à l'ICARDA et ont résulté en une perte des accessions. L'intégrité génétique et la pureté des accessions est un autre volet qui demande de l'attention. La pureté des accessions peut être difficile à apprécier dans les mélanges de variétés qui sont fréquemment retrouvées avec les autochtones.

**Tableau 8.** Nombre des accessions de *Vicia* conservées *ex situ* dans les collections majeures (Van De Wouw *et al.* 2001a)

Espèces	Institut						
	ATFC	Bari	W-6	ICARDA	INIA	IPK	VIR
<i>V. articulata</i>	26	19	14	21	83	14	11
<i>V. benghalensis</i>	58	49	34	19		9	44
<i>V. ervilia</i>	254	65	168	324	232	137	548
<i>V. faba</i>	1410	1461	564	5497	1064	1507	1261
<i>V. monantha</i>	15	19	8	197		10	3
<i>V. narbonensis</i>	267	71	48	224	17	69	54
<i>V. pannonica</i>	35	130	7	136	5	27	54
<i>V. peregrina</i>	4	29	29	259	13	9	21
<i>V. sativa</i>	724	1726	1178	2840	863	772	2252
<i>V. villosa</i>	110	275	177	342	143	23	263
Autres espèces *	276(39)	306(57)	357(35)	1105(52)	15(7)	226(49)	168(37)
<b>Total</b>	<b>3179</b>	<b>4150</b>	<b>2584</b>	<b>11064</b>	<b>2435</b>	<b>2803</b>	<b>4679</b>

\* Les nombres entre parenthèse indiquent le nombre des autres espèces de *Vicia* conservées

ATFC=Australian Temperate Field Crop Collection, Horsham, Australie - Bari=Istituto del Germoplasma, Bari, Italy - W-6=Regional Plant Introduction Station, Washington, USA - ICARDA=International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Syrie - INIA=Istituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, Espagne - IPK=Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Allemagne - VIR=Vavilov Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russie.

It is a strange economy of Nature, that the plants which produce the most food for man and beast, are the ones that feed upon and eventually consume the fertility of the soil.

It is a strange economy of Nature, that the plants that produce the smallest amount of food for man and beast, are the ones that feed the soil with the elements it needs to make it fertile

The vetch plant, while producing no direct food for man, yet furnishes succulent fat-producing food for beast, and the most precious soil-building materials in the greatest abundance

**Cité par Smith (1913)**

## **I- Prospection et collecte**

### **I-1- Présentation et consignes**

La collecte ne consiste pas seulement à ramasser des plantes ou parties de plantes en attribuant à chacune une fiche de renseignements. L'enregistrement des informations doit faire l'objet d'une attention particulière. Dépourvu de données propres à son identification et à son origine, un échantillon n'est guère exploitable. Pour fournir aux conservatoires des plants ou des semences en bon état, il faut aussi avoir connaissance des recommandations concernant les modalités de conditionnement et d'acheminement. Les périodes favorables aux prospections sont en certains endroits relativement courtes. Un maximum de déplacements doit alors être effectué en un minimum de temps. Le plus souvent, le maximum de résultats sera obtenu, comme on peut s'y attendre, dans les endroits assez reculés. C'est un principe de base très simple, mais qui généralement assure une relative efficacité. L'étiquetage devra être pratiqué avec le plus grand soin afin d'éviter les risques de confusion ou de perte, le matériel devenant alors difficilement utilisable. Il n'est pas nécessaire de procéder à de nombreux prélèvements dans les zones où les climats et les systèmes agraires présentent une bonne uniformité. En revanche, leur fréquence devra être plus élevée lorsque les facteurs environnementaux ou les systèmes de culture offrent une certaine hétérogénéité, ou varient rapidement. C'est le cas en montagne, où d'une vallée à l'autre où les conditions changent : altitude, organisation sociale, par exemple. Des différences se produisent même d'un flanc de vallée à l'autre, en raison de l'exposition. L'hétérogénéité apparente de la plante est en principe directement liée à sa diversité génétique. En pratiquant un échantillonnage sur un plus grand nombre de sites, on aura plus de chance de prélever des taxa différents et d'obtenir une plus large variabilité. Le plus facile est de faire un prélèvement tous les trois pas pour les plantes développant une végétation très dense comme les plantes fourragères (Marchenay et Lagarde 1986).

#### **- Plantes à gousses**

Les gousses contiennent souvent un nombre limité de graines. En général, on cueillera arbitrairement cinq gousses mûres sur trois pieds adjacents, tous les 3 pas par exemple, de façon à atteindre le total de 50 graines à chaque arrêt. Le chiffre de 100 graines semble être un seuil au-dessous duquel il ne faudrait pas descendre (Marchenay et Lagarde 1986).

### **I-2- Traitement des graines après la récolte**

Dans la plus grande partie des cas, les graines collectées seront déjà séchées à l'air. Dans la mesure où elles sont issues de plantes bien mûres, il n'y aura pas de problème jusqu'à la fin de la prospection, surtout si l'on a utilisé des sachets en papier ou en coton que l'on aura pris



**Quatrième chapitre : Collecte et données écogéographiques**

soin de laisser ouverts. L'ennemi numéro un est en effet l'humidité. Il peut parfaitement arriver qu'il se mette à pleuvoir le jour de la collecte et que l'on ne puisse faire autrement que de collecter. On sera alors amené à pratiquer un séchage artificiel, ne serait-ce que pour éviter le développement de moisissures. Le soleil, s'il veut bien revenir, est le meilleur procédé. A défaut, les graines seront placées à proximité d'une source de chaleur artificielle. La température ne devra jamais dépasser 40°C. Il vaut mieux les sécher plus longtemps et à basse température si l'on ne veut pas altérer leur pouvoir germinatif. Par ailleurs, un premier « nettoyage » permettra de disposer d'un échantillon propre, sans trop d'impuretés. Généralement, il n'est pas utile de traiter les graines collectées avec un produit insecticide ou fongicide puisque certains composés chimiques altèrent le pouvoir germinatif (Marchenay et Lagarde 1986).

**I-3- Identification de l'échantillon**

La fiche d'identification permet de répertorier correctement un taxon retrouvé. Les informations qu'elle contient sont indispensables à tout matériel collecté et introduit dans un conservatoire. Immédiatement après la collecte, chaque échantillon se voit attribuer un numéro. A cette référence correspond un seul et unique échantillon ; si celui-ci vient à être éliminé, son numéro ne sera pas réutilisé. Parallèlement à cette numérotation, la tenue d'un registre est recommandée : on y reportera le numéro de l'échantillon, le nom de l'espèce et du cultivar, son origine, ainsi que la date de collecte. Le nom latin de la plante ne figure pas sur cette fiche : il peut en effet être une source de confusion (Marchenay et Lagarde 1986).

**I-4- Photographie des échantillons**

A chaque fois que cela est possible, trois prises de vue par échantillon sont recommandées : vue d'ensemble de la culture, plante entière, partie consommée. Fleurs, fruits et plantes de petite taille doivent être photographiés de près. Le fond peut être du papieranson, par exemple, ou une pièce d'étoffe non brillante de couleur neutre. En extérieur, ne jamais faire de prises de vue rapprochées en lumière solaire directe ; les ombres portées sont très néfastes. Lorsque les organes sont détachés de la plante, on pourra toujours faire, ailleurs et au calme, des clichés dans de meilleures conditions. Les photographies peuvent constituer des documents utiles à la description ; il est donc préférable de travailler en couleurs (Marchenay et Lagarde 1986).

**I-5- Echantillons d'herbier**

Lorsque les peuplements sont uniformes, on choisira deux spécimens bien conformes au type variétal pour les mettre en herbier. Pour les populations au sein desquelles coexistent visiblement plusieurs types, on échantillonnera la diversité en choisissant trois ou quatre

Quatrième chapitre : Collecte et données écogéographiques

individus parmi les types distincts. Dès leur récolte, les plantes sont placées entre deux couches de papier absorbant, du papier journal le plus souvent, où elles doivent être parfaitement étalées. Ainsi préparés, les échantillons sont mis sous presse entre deux plaques rigides. Durant quelques jours, les papiers doivent être changés quotidiennement pour éviter toute altération des plantes (Marchenay et Lagarde 1986).

**I-6- Durée de conservation**

La durée de conservation des graines stockées est extrêmement variable et dépend surtout de l'espèce et des conditions de conservation. Cette durée est en étroite relation avec la faculté germinative. La germination des semences est liée à toute une série de facteurs physiologiques et climatiques. A titre d'exemple, les vesces ont généralement une enveloppe dure, qui restreint l'absorption d'eau et les échanges gazeux et peuvent garder leur viabilité durant des dizaines, voire exceptionnellement des centaines d'années (Marchenay et Lagarde 1986).

**I-7- Précautions à prendre pour les échantillons de vesce**

Lors de la récolte de ces plantes, des précautions sont à prendre. La plus importante, dans la mesure du possible, est d'avoir des échantillons entiers et fructifiés ; le type biologique, souvent, est délicat à définir : plante annuelle ou vivace fleurissant la première année. Enfin, il convient de noter la couleur de la corolle sur le matériel frais : étendard, ailes et carène ; la dessiccation provoque des transformations de teinte souvent importantes (Raynaud 1976).

**II- Enquête écogéographique et établissement d'une base de données**

**II-1- Présentation et intérêts**

Le terme d'enquête écogéographique est appliqué aux différents procédés de rassembler et de collectionner les informations sur la taxonomie, la distribution géographique, les caractéristiques écologiques, la diversité génétique et l'ethnobiologie des espèces cibles, aussi bien que la géographie, le climat et le milieu humain des régions en cours d'étude (Guarino *et al.* 2002). Les résultats peuvent être utilisés dans la formulation des stratégies de conservation et des priorités de collecte (Maxted *et al.* 1995). Ces informations peuvent être obtenues de la littérature, des spécimens d'herbiers, de banques de gènes, des jardins botaniques et des stations météorologiques ainsi que des enquêtes sur terrain en vue de l'établissement d'une base de données (IBPGR 1985 ; Maxted *et al.* 1995 ; Dulloo *et al.* 2008). Une enquête écogéographique vise à déterminer : (i) la distribution d'un taxon particulier dans des régions et des écosystèmes particuliers ; (ii) les profils de diversité infraspécifique ; et (iii) les relations entre les accessions et la fréquence de variantes ainsi que les conditions écologiques associées. Les informations écogéographiques peuvent être utilisées pour localiser un matériel

génétique important et les populations représentatives peuvent être utilisées pour guider la sélection d'échantillons pour la conservation et l'utilisation (IBPGR 1985).

## **II-2- Importance des données taxonomiques**

Bien que cela puisse sembler évident, l'identification correcte des taxa collectés ou sélectionnés pour la conservation est essentielle. Ceci est beaucoup plus difficile que cela puisse paraître, puisque le niveau de précision de l'identification de taxa dans la littérature est très variable et souvent très faible. Bien que fondamentale, l'identification scientifique des taxa n'est souvent pas vérifiée avec exactitude; les conséquences peuvent être sérieuses et très coûteuses. Les flores, les monographies, les révisions, les listes de contrôle (checklists) peuvent être très intimidantes pour les non-spécialistes car elles sont hautement techniques et répondent souvent aux besoins des taxonomistes plutôt qu'aux intérêts des utilisateurs moins spécialisés. Quelques guides d'identification ne sont pas clairement rédigés et négligent des informations fondamentales comme les illustrations des espèces. Les clés sont absentes dans de nombreux ouvrages classiques. Même lorsque de telles composantes sont incluses, elles sont souvent très techniques et difficiles à comprendre pour un utilisateur inexpérimenté (Heywood 2004). Les flores doivent être utilisées pour cibler les aires de répartition des taxa concernés et leur degré de rareté (Golding et Smith 2001). Malheureusement, les flores ne sont pas conçues pour cet usage et l'extraction et la bonne interprétation des données peuvent s'avérer difficile sans l'aide d'un taxonomiste professionnel (Hunter et Heywood 2011).

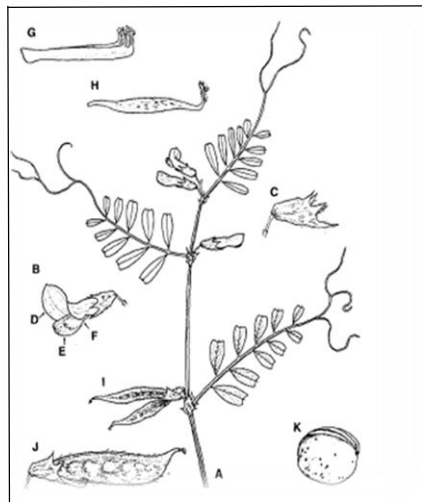
## **II-3- Utilisation des systèmes de positionnement global**

L'importance de l'utilisation des systèmes de positionnement global dans toute étude écogéographique fiable n'est pas à négliger. Les systèmes GPS sont devenus plus communs. Une collecte appuyée par des données écogéographiques détaillées, combinée à l'utilisation des GPS, permettra d'améliorer le degré de crédibilité des études écogéographiques (Bennet et Maxted 1997).

Before sensible conservation decisions can be made, a basic understanding of the taxonomy, genetic diversity, geographic distribution, ecological adaptation and ethnobotany of a plant group, as well as of the geography, ecology, climate and human communities of the target region, is essential  
**Guarino *et al.* (2005)**

### I- Les marqueurs morphologiques et les propriétés physiques du grain

Linné (1737), en examinant les fleurs de centaines de plantes d'espèces du genre *Vicia* n'avait pas pu trouver de caractères assez discriminatoires pour justifier une séparation générique. Après plus de deux siècles et demi, cette position semble encore justifiée aujourd'hui (Maxted 1993). En effet, le genre *Vicia* L., facilement reconnaissable sur le terrain, devient très délicat à étudier au niveau spécifique. Les caractères pratiques sont souvent fluctuants et l'on est obligé alors de faire appel à des caractères plus fins, difficilement observables à l'œil nu.



**Figure 9.** Diagramme général de la vesce montrant les caractères végétatifs, les caractères de la fleur, du fruit et de la graine

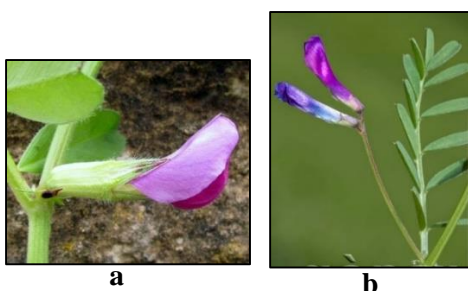
A : Port ; B : fleur ; C : calice ;  
D : étendard ; E : aile ; F : carène ;  
G : étamines ; H : ovaire, style et stigmate ;  
I : fruit ; J : fruit ; K : graine (Maxted 1995)

Le caractère le plus précis pour dégager les espèces reste la pilosité du style (Figure 10). Dans la section *Vicia*, elle se situe sur sa face inférieure, sous le stigmate. Dans les autres sections, le style est soit glabre, soit velu tout autour, sous le stigmate.



**Figure 10.** Photo de la pointe du style de *V. americana* avec le groupe de poils sur tous les côtés de la pointe, une caractéristique qui permet de différencier ce genre du genre *Lathyrus* (Slichter 2005)

A ce caractère fin, il faut ajouter l'inflorescence (Figure 11) : sessile ou brièvement pédonculée, à l'aisselle des feuilles (excepté pour *V. bithynica* qui possède sur la même plante à la fois des inflorescences sessiles et des inflorescences longuement pédonculées). Les autres caractères employés sont peu stables dans la majorité des cas ; entre autres, la forme des stipules (Figure 12) qui peut varier tout au long de la tige (Raynaud 1976).



**Figure 11.** Fleurs de vesce  
(a) Fleur sessile (*V. sativa* subsp. *sativa*) (Pasquali 2009)  
(b) Fleur pédonculée (*V. monantha* subsp. *calcarata*) (Bernal 2016)



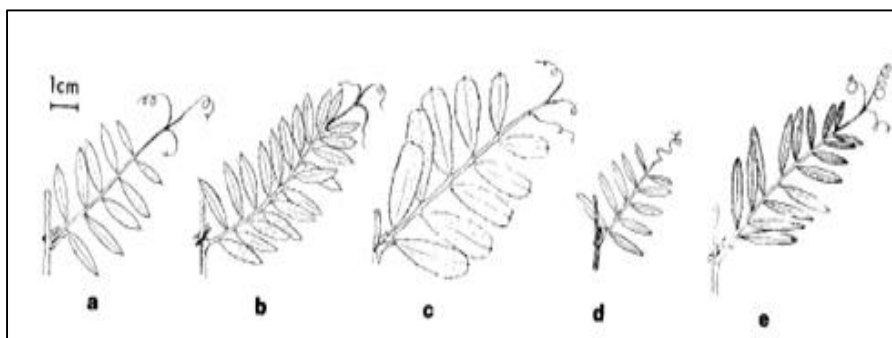
**Figure 12.** Stipules très découpées de *V. sativa* présentant des spots nectarifères (Le Bourgeois 2016)

A travers l’histoire taxonomique du genre *Vicia*, certains caractères ont été utilisés pour distinguer les groupes subgénériques (Tableau 10). Ces caractères peuvent être divisés en deux types : ceux utilisés pour établir les divisions majeures (sous-genres et sections) et ceux utilisés pour distinguer les subdivisions au sein des divisions majeures préalablement établies.

**Tableau 10.** Caractères de discrimination entre les deux sous-genres *Vicia* et *Vicilla* (Maxted 1995)

Caractère	Sous-genre <i>Vicilla</i>	Sous-genre <i>Vicia</i>
<b>Stipules nectarifères</b>	Absents	Présents sur la face abaxiale du stipule
<b>Longueur du pédoncule</b>	= ou > feuille	< feuille ou absent
<b>Type du style</b>	Compressé dorsalement, pubéscents ou touffu, latéralement compressé	Dorsalement comprimé, touffu
<b>Type de la carène</b>	Bordures arrondies, au dessus du style	Partie apicale encerclant le style et les anthères
<b>Gousse</b>	Stipitée, semi-toruleuse	Non-stipitée
<b>Canavanine</b>	Présente	Absente

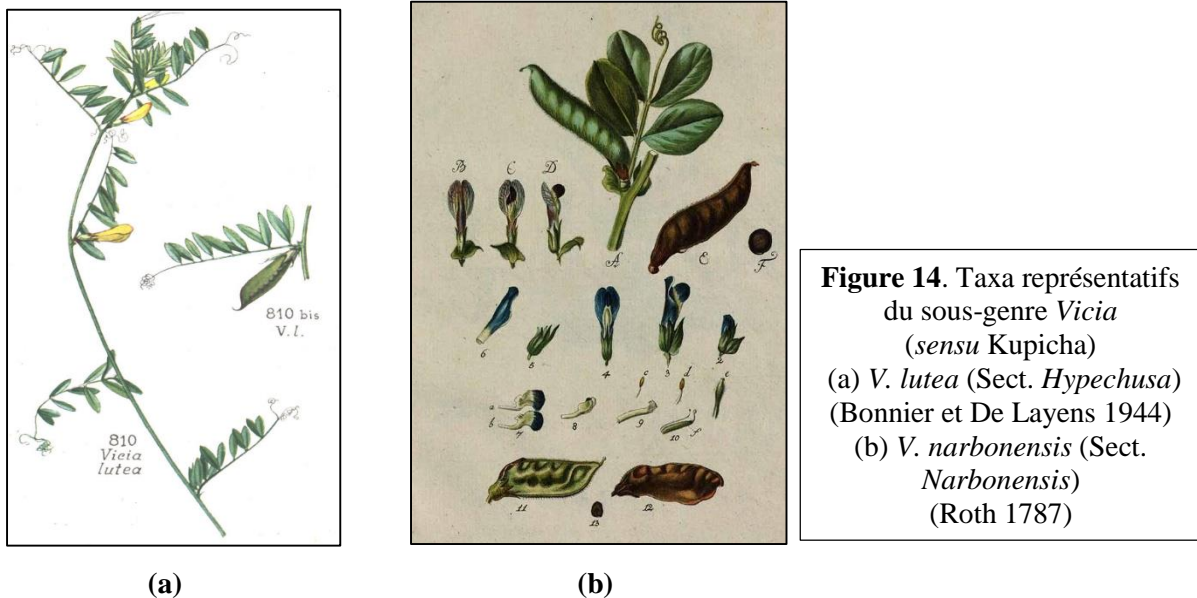
Les caractères de diagnostic mineurs utilisés pour la distinction des sous-groupes au sein des groupes majeurs sont : nombre de fleurs par inflorescence ; nombre de folioles par feuille, taille des folioles (Figure 13) ; forme de l’ouverture du calice ; couleur de la fleur, forme et pubescence du vexillum ; pubescence de la gousse ; taille relative de la gousse ; courbure de la suture de la gousse ; types des poils sur la gousse ; forme de la graine ; longueur relative du hile ; position relative du hile et du lens de la graine et type de la surface de la graine (Maxted 1995).



**Figure 13.** Feuilles de cinq espèces de vesce.  
 (a) : *V. angustifolia* ;  
 (b) : *V. cracca* ;  
 (c) : *V. sativa* ;  
 (d) *V. tetrasperma* ;  
 (e) : *V. villosa*  
 (Hafliger et Brun-Hood 1975)

Le sous-genre *Vicia* est le plus petit et le plus compact avec plusieurs caractères distinctifs communs. Il est plus facile à délimiter et a été de ce fait plus étudié et d'une manière plus détaillée (Maxted 1993a, b, 1994 ; Van De Wouw *et al.* 2001a, 2003 ; Leht et Jaaska 2002). Il est monophylétique et possède quelques traits de caractères synapomorphiques tels que les spots nectarifères sur les stipules et les racèmes réduits.

Concernant *V. sativa*, il existe une variabilité génétique pour plusieurs caractères végétatifs et reproductifs : tige par plant, longueur de la tige, longueur des inter-nœuds, feuilles par tige, folioles par feuille, hauteur de la plante, date de floraison, gousses par tige, graines par gousse et poids des grains (Blum et Lehrer 1973). Beaucoup d'auteurs ont étudié la taxonomie d'espèces locales, principalement au niveau sectionnel, sur la base de la morphologie (Tzvelev 1980 ; Nikiforova 1985, 1988 ; Roti-Michelotti et Serrato-Valentini 1989 ; Endo et Ohashi 1996).



Le sous-genre *Cracca* (*Vicilla sensu* Kupicha) est considéré comme étant plus primitif et diversifié que le sous-genre *Vicia*. C'est un assemblage plutôt hétérogène avec une large variation de nombreux caractères. Il est donc plus dur à définir. Les espèces de ce sous-genre sont, dans la majorité, pérennes et appartiennent à des habitats variables. Ce sont souvent des plantes herbacées grimpantes avec des vrilles, mais aussi des herbes non rigides, avec des feuilles mucronées ou imparipennées. Il est caractérisé par sa possession de plusieurs états primitifs ou au moins des traits dérivés de caractères (croissance pérenne, fleurs nombreuses, longs racèmes pédonculés, stipules simples...), bien que ces caractères soient toujours partagés uniquement par une partie des taxa du sous-genre *Cracca*



(a)



(b)

**Figure 15.** Taxa représentatifs du sous-genre *Vicilla* (*sensu* Kupicha)  
 (a) *V. monantha* (Sect. *Cracca*) (Sturm 1796)  
 (b) *V. tenuifolia* (Sect. *Cracca*) (Bonnier et De Layens 1944)

Selon Pimentel et Riggins (1987), Pogue et Mickevich (1990) et Meier (1994), les caractères morphologiques doivent être traités dans les analyses cladistiques comme des variables multi-traits. Ces auteurs ont apporté des arguments contre le codage présence/absence des caractères morphologiques qui introduirait une redondance dans les données. Cependant, Pleijel (1995) a montré que le codage binaire présence/absence des traits de caractères représente encore une approche plus simple et plus directe que les modes alternatifs de codage.

#### - Les propriétés physiques du grain

Afin de concevoir des équipements et des installations pour le transport, la séparation, le séchage, l'aération et le stockage des semences de vesce, il est nécessaire de déterminer leurs propriétés physiques en fonction de leur teneur en humidité (Yalçın et Ozarslan 2004). Certains auteurs se sont intéressés à ce volet (Yalçın et Ozarslan 2004 ; Altuntas et Karadag 2006 ; Taser *et al.* 2005). Toutefois, les travaux relatifs aux propriétés des grains en Algérie sont inexistantes. La taille des grains fait partie d'un ensemble de caractéristiques qui définissent l'histoire de vie des espèces (Westoby 1998). La relation entre la taille des grains et le nombre de grains peut s'avérer un mécanisme important soulignant l'abondance et la dynamique des plantes (Jakobsson et Eriksson 2000). Les relations entre la taille des grains et les autres traits de la plante présentent également un moyen d'aborder l'évolution des taxa (Westoby *et al.* 1992).

## II- Les marqueurs biochimiques

### II-1- Les enzymes

Les enzymes sont mises en évidence de façon spécifique : au cours de la révélation, le produit accumulé par l'enzyme est impliqué dans une seconde réaction qui conduit à la coloration visualisée sur le gel.



### **II-1-1- Interprétation des zymogrammes**

Le zymogramme peut être l'expression d'un ou de plusieurs gènes. Il présente un nombre de bandes assez réduit. Le contrôle génétique des gènes codant pour les enzymes est le plus souvent connu. Le zymogramme peut donc être interprété en termes de génotype. Les allèles codant pour les diverses formes d'une enzyme sont codominants, les individus hétérozygotes présentent un zymogramme spécifique où est observée l'expression de chaque allèle. Les isozymes sont des enzymes qui ont un substrat commun mais différent dans leur mobilité électrophorétique (Markert et Moller 1959). L'analyse génétique peut indiquer que certaines formes électrophorétiques sont sous le contrôle d'allèles alternatifs d'un seul locus, dans ce cas, les produits alléliques sont appelés allozymes (Prakash *et al.* 1969). Pour un pouvoir maximal de résolutions, les biochimistes optent pour la PAGE. Parmi les propriétés de cette dernière est que la stringence du tamis moléculaire peut être contrôlée en modifiant la concentration d'acrylamide, augmentant ainsi la flexibilité dans la gamme des poids moléculaires ou des dimensions des protéines qui sont séparées (Leback 1976). D'autres avantages des gels de polyacrylamide incluent leur uniformité et leur transparence, facilitant la quantification densitométrique du produit. De nombreuses enzymes, couramment examinées, dans les études par électrophorèse ont des phénotypes complexes résultant de l'expression de plus d'un gène de structure, autrement dit, plus d'une forme d'isozyme peut être présente. Ces isozymes peuvent ou pas résider dans le même compartiment subcellulaire. Pour certaines applications, il est préférable et parfois essentiel d'identifier la part du phénotype fournie par chaque isozyme. La plupart des isozymes sont localisées dans des organelles comme les chloroplastes et les mitochondries (Newton 1983 ; Weeden 1983 ; Wendel et Weeden 1989).

### **II-1-2- Utilisation de l'électrophorèse des isozymes chez la vesce**

Différents travaux ont traité de la phylogénie des espèces du genre *Vicia* par le polymorphisme des isozymes (Jaaska 1997 ; Jaaska 2005 ; Yamamoto et Plitmann 1980 ; Leht et Jaaska 2002). Ces auteurs ont montré que les isozymes constituent de bons caractères taxonomiques pour la discrimination des espèces en sections monophylétiques et fournissent également des caractères pour la distinction entre les espèces.

### **II-2- Les protéines et l'interprétation des diagrammes protéiques**

Les protéines de réserve ou les protéines de structure sont mises en évidence de façon aspécifique : toutes les protéines en quantité suffisante pour être détectées sont révélées par la coloration. Les diagrammes de protéines de réserve de graines présentent souvent un nombre élevé de bandes. Le déterminisme génétique des protéines de réserve, souvent complexe, n'est

pas ou peu connu et il n'est pas toujours possible d'établir la correspondance entre le génotype et l'électrophorégramme. L'interprétation de tels diagrammes se fait de façon descriptive :

- Chaque bande peut être définie par sa mobilité relative, le diagramme type d'une variété est alors composé d'un ensemble de bandes, chacune décrite par sa mobilité relative ;
- Le diagramme peut présenter des zones bien individualisées de bandes ; pour chaque zone, des groupes de bandes sont définis.

### **II-2-1- Les protéines de réserve du grain**

Les protéines de réserve sont caractérisées par leur capacité à stocker les acides aminés et à fournir le carbone, l'azote et le soufre qui permettent la germination des graines et la croissance des plantes. Selon la classification d'Osborne (1924), les protéines de réserve peuvent être divisées en quatre groupes sur la base de leur solubilité :

- Les albumines : solubles dans l'eau ;
- Les globulines : insolubles dans l'eau et solubles dans les solutions salines ;
- Les prolamines : solubles dans les mélanges eau/alcool ;
- Les glutélines : solubles dans les acides dilués ou dans les solutions alcalines.

### **II-2-2- Utilisation des protéines de réserve chez les espèces du genre *Vicia***

Etant une méthode simple et reproductible, l'électrophorèse des protéines de réserve du grain a été largement appliquée dans l'investigation de la diversité génétique et l'évaluation des associations taxonomiques au sein du genre *Vicia* aux niveaux générique, spécifique et intraspécifique (Ladizinsky et Hymowitz 1979 ; Haider et El-Shansoury 2000 ; Mirali *et al.* 2007 ; Çelebi *et al.* 2009 ; Hameed *et al.* 2009 ; Emre *et al.* 2010 ; Emre 2011 ; Abdel Khalik et Al-Gohary 2013). Selon Valizadeh (2001), l'utilisation de la SDS-PAGE des protéines de réserve pourrait déterminer le polymorphisme interspécifique, mais pas celui des variétés et des populations de vesce.

## **III- Les marqueurs moléculaires de type ISSR**

### **III-1- Présentation**

Les ISSR impliquent l'amplification de segments d'ADN présents à une distance amplifiable entre deux régions identiques de répétitions de microsatellites orientées dans des directions opposées. La technique utilise les microsatellites dans une réaction PCR à amorce unique ciblant des loci génomiques multiples pour amplifier principalement les répétitions inter-séquences simples de différentes tailles. La température d'hybridation dépend du contenu GC du primer utilisé et est comprise entre 45 et 65°C. Les produits d'amplification sont généralement longs de 200–2000 bp et peuvent être détectés sur gels d'agarose ou de polyacrylamide. Les ISSR présentent la spécificité des marqueurs microsatellites, mais ne

nécessitent pas d'informations concernant la séquence pour la synthèse du primer (Joshi *et al.* 2000). La technique est simple, rapide et l'utilisation de la radioactivité n'est pas essentielle. Les marqueurs ISSR montrent d'habitude un grand polymorphisme (Kojima *et al.* 1998) bien que ce taux de polymorphisme soit variable selon la méthode de révélation utilisée. Fang et Roose (1997) ont reporté un taux de reproductibilité de plus de 99% en adoptant divers modes opératoires. Dans d'autres cas, la reproductibilité des produits d'amplifications ISSR est rangée de 86 à 94%, avec un maximum obtenu avec l'utilisation d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, une révélation au AgNO<sub>3</sub> et l'exclusion des bandes de faible résolution dans la lecture des profils (Moreno *et al.* 1998). Les ISSR ségrégent principalement comme marqueurs dominants (Gupta *et al.* 1994 ; Tsumura *et al.* 1996 ; Ratnaparkhe *et al.* 1998 ; Wang *et al.* 1998), bien qu'une ségrégation codominante a pu être observée dans certains cas (Wu *et al.* 1994 ; Akagi *et al.* 1996 ; Wang *et al.* 1998 ; Sankar et Moore 2001).

### **III-2- Utilisation des marqueurs ISSR chez la vesce**

Peu de travaux ont traité du polymorphisme des espèces de vesce par les ISSR (Liu *et al.* 2013 ; Bozkurt *et al.* 2013 ; Rajkovic *et al.* 2015). Ces études ont montré que le taux moyen de polymorphisme des amorces ISSR était très élevé et ont mis en évidence une discrimination au niveau des sections, des espèces et même des subdivisions confirmant les résultats que ce type de marqueur pourrait être utile dans la différenciation entre les espèces et dans les études de diversité au sein du genre *Vicia*. Les travaux de Han et Wang (2010) ont montré que l'aptitude de révéler la diversité génétique chez le genre *Vicia* était plus élevée par les ISSR que par les RAPD et que les marqueurs ISSR distinguent, avec succès, les espèces de vesce étudiées.

## **Références bibliographiques**

## A

- Aarssen LW, Hall IV, Jensen KIN (1986) The biology of Canadian weeds. 76. *Vicia angustifolia* L., *Vicia cracca* L., *Vicia sativa* L., *Vicia tetrasperma* (L.) Schreb and *Vicia villosa* Roth. Canadian Journal of Plant Science 66: 711-737.
- Abbas K, Abdelguerfi A (2005) Perspectives d'avenir de la jachère pâturée dans les zones céréalières semi-arides. Fourrages 184 : 533-546.
- Abbas K, Abdelguerfi-Laouar M, Madani T, M'hammedi Bouzina M, Abdelguerfi A (2006) Place des légumineuses dans la valorisation de l'espace agricole et pastoral en régions nord d'Algérie. Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes : applications biotechnologiques, agronomiques et environnementales. Workshop int., Alger 19-22 février 2006, A. Abdelguerfi éd. pp. 309-320.
- Abd El Moneim AM (1992) Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L.): A Potential Feed Legume Crop for Dry Areas in West Asia. Journal of Agronomy and Crop Science 169(5): 347–353
- Abd El-Moneim AM (1993) Agronomic potential of three vetches (*Vicia* spp.) under rainfed conditions. Journal of Agronomy and Crop Science. 170: 113-120.
- Abdel Khalik KN, Al-Gohary I (2013) Taxonomic relationships in some *Vicia* species from Egypt, based on seed morphology and SDS-PAGE of seed proteins. Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá 35 (4) : 603-611
- Abdelguerfi A (1987). Quelques réflexions sur la situation des fourrages en Algérie. Céréaliculture 16 : 1-5
- Abdelguerfi A (2003). La bio-invasion, la pollution et l'érosion génétique. Bilans des Expertises sur « Menaces pesant sur la diversité biologique » MATE-GEF/PNUD Projet ALG97/G31. pp 262-363
- Abdelguerfi A, Abdelguerfi-Laouar M (2004). Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza. CIHEAM : 29 -41 (Cahiers Options Méditerranéennes ; n. 62)
- Abdelguerfi A, Laouar M (2000) Herbaceous perennial plants from North Africa : legumes and grasses. In Ecology and survival of perennial legumes in dry mediterranean areas, International Workshop, Univ. Perugia (Italia), 12-14th October 2000.
- Abdul Baki AA, Teasdale JR, Korcak RF (1997). Nitrogen requirements of fresh-market tomatoes on hairy vetch and black polyethylene mulch. HortScience 32 (2): 217-221
- Acikgoz E (1988) Annual forage legumes in the arid and semiarid regions of Turkey. In: D.B. Beck & L.A. Materon (Eds.), Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. ICARDA, Aleppo. pp. 47–54.
- Açıkgöz E, Katkat V, Omeroğlu S, Okan B (1985) Mineral elements and amino acid concentrations in field pea and common vetch herbage and seeds. Journal of Agronomy and Crop Science 55: 179-185.
- Aidoud A, Nedjraoui D (1992) The steppes of alfa (*Stipa tenacissima* L) and their utilization by sheeps. In Plant animal interactions in Mediterrean-type ecosystems. MEDECOS VI, Grèce. 62–67.
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Nakamura A, Fujimura T (1996). A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting. Genome 39:1205- 1209.
- Akhtar P, Hussain F (2009) Growth performance of *Vicia sativa* L. under saline conditions. Pakistan Journal of Botany 41: 3075–3080.
- Akpınar N, Akpınar MA, Türkoğlu Ş (2001) Total lipid content and fatty acid composition of the seeds of some *Vicia* L. species. Food Chemistry 74: 449-453.
- Alcaraz C (1976) Recherches géobotaniques sur la végétation de l'ouest algérien. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle, Afrique du Nord 67 : 19-36.

- Alefeld F (1859) Ueber die Vicieen. *Botanische Zeitung* 9: 352-366.
- Alefeld F (1860) *Hypechusa*, nov. gen. Viciearum. *Botanische Zeitung* 19: 165-166.
- Alefeld F (1861a) Ueber Vicieen. *Bonplandia* 9(8-9): 116-131.
- Alefeld F (1861b). Ueber Vicieen. *Bonplandia* 9(5-6): 66-72.
- Alefeld F (1861c). Ueber Vicieen. *Bonplandia* 9(7): 99-105.
- Allegri G, Biasiolo M, Costa CVL, Bettero A, Bertazzo A (1993) Content of non-protein tryptophan in human milk, bovine, milk and soy-based formulas. *Food Chemistry* 47: 23-27.
- Al-Masri MR (1998). Yield and nutritive value of vetch (*Vicia sativa*) – barley (*Hordeum vulgare*) forage under different harvesting regimens. *Tropical Grasslands* 32: 201-206.
- Altuntas E, Karadag Y (2006) Some physical and mechanical properties of sainfoin (*Onobrychis sativa* Lam.), Grasspea (*Lathyrus sativus* L.) and Bitter Vetch (*Vicia ervillia* (L.) Willd.) seeds. *Journal of Applied Sciences* 6(6): 1373-1379
- Amirouche R, Misset MT (2009) Flore spontanée d'Algérie : différenciation écogéographique des espèces et polyploïdie. *Cahiers Agricultures* : 18 (6) 474-480
- André J (1981) L'alimentation et la cuisine à Rome. Les Belles Lettres, Paris (252 p)
- Anonyme (2014) [https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Cvet leguminose.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cvet_leguminose.jpg)
- APG II (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.12
- Araùjo BM (2002) Biodiversity hotspots and zones of ecological transition. *Conservation Biology* 16: 1662-1663.
- Arianoutsou M, Thanos CA (1996) Legumes in the fire-prone Mediterranean regions: an example from Greece. *International Journal of Wildland Fires* 6: 77–82

## B

- Bahhady FA, Christiansen S, Thomson EF, Harris H, Eskridge KM, Papecristiansen A (1997) Performance of Awassi lambs grazing common vetch in on-farm and on-station trials. *Proc. Symp. on Crop/Livestock Integration, Amman, Jordan*.
- Ball PW (1968) *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora europaea*, vol 2., Rosaceae to Umbelliferae. Cambridge University Press, Cambridge. pp 129–136
- Battandier JA, Trabut L (1884) *Flore d'Alger et catalogue des plantes d'Algérie*. Alger : Adolphe Jourdan libraire-éditeur
- Battandier JA, Trabut L (1902) *Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie*. Alger : Vve Giralt imprimeur-éditeur
- Baytop T (1994) *Türkçe Bitki Adlari Sozlugu. A Dictionary of Vernacular Names of Wild Plants of Turkey*, Turk Dil Kurumu Yayinlari n° 578, Turk Tarih Kurumu Basimevi Ankara (508 p.)
- Benbadji N, Bouazza M (2000) Quelques modifications climatiques intervenues dans le Sud-Ouest de l'Oranie (Algérie Occidentale). *Revue des Energies Renouvelables* 3: 117-125
- Bennett SJ, Maxted N (1997) An ecogeographic analysis of the *Vicia narbonensis* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 411–428
- Bentamallah S (1984) Intérêt de l'association Avoine - Sulla en zone subhumide Tunisienne : 41-51
- Berhane G, Eik LO (2006) Effect of vetch (*Vicia sativa*) hay supplementation on performance of Begait and Abergelle goats in northern Ethiopia: I. Milk yield and composition. *Small Ruminant Research* 64: 225–232
- Bernal M (2016) *Flora De Aragon: Vicia monantha subsp. calcarata*. <http://flora-aragon.blogspot.com/>

- Blum A, Lehrer W (1973) Genetic and environmental variability in some agronomical and botanical characters of common vetch (*Vicia sativa* L.). *Euphytica* 22: 89-97
- Boissier E (1872) *Flora Orientalis*, Vol. 2. Geneva & Basel: H. Georg.
- Bonnier G (1934) Flore complète de France, Suisse et Belgique Tome 3. Ed. E. Orhac, Paris.
- Bonnier G, De Layens G (1944). Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique. Librairie générale de l'Enseignement, Paris
- Bouby L, Léa V (2006) Exploitation de la vesce commune (*Vicia sativa* L.) au Néolithique moyen dans le Sud de la France. Données carpologiques du site de Claparouse (Lagnes, Vaucluse). *Compte Rendus Palevol* 5 : 973–980
- Boussaid M, Ben Fadhel N, Zaouali Y, Ben Salah A, Abdelkefi A (2004) Plantes pastorales en milieux arides de l'Afrique du Nord. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. *Zaragoza : CIHEAM (Cahiers Options Méditerranéennes)* 62 : 55-59
- Bozkurt M, Ertugrul K, Uysal T (2013) The determination of genetic relationships among some *Vicia* L. (Vetch) taxa by using ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation* 6/3: 135-139
- Brown EG (1992) Coping with toxic pulses. *Nature* 360 (9)
- Burkart A (1966). Notas sobre las especies argentinas de *Vicia* (Leguminosae) del area mesopotamico-pampeana. *Darwiniana* 14 : 161-93

## C

- Caputo P, Frediani M, Venora G, Ravalli C, Ambrosio M, Cremonini R (2006) Nuclear DNA contents, rDNAs and karyotype evolution in subgenus *Vicia*: III. The heterogeneous section *Hypechusa*. *Protoplasma* 228: 167-177
- Castleman G, Mock I, Enneking D, Siddique KHM, Francis CM (1996) Potential of narbon bean as a grain legume for southern Australia. Co-operative Research Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture. Annual Report for 1994/1995. CLIMA, Perth, Australia.
- Çelebi A, Açıık L, Aytaç Z (2009). Biosystematics studies among *Ebenus* L. species based on morphological, RAPD-PCR and seed protein analyses in Turkey. *Pakistan Journal of Botany* 41(5): 2477-2486.
- Çeliktas N, Can E, Hatipoglu R, Avci S (2006) Comparison between a wild population and cultivar of common vetch (*Vicia sativa* L., Fabaceae) on cytological and agronomic characteristics. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 49: 389-393
- Chaumont M, Paquin C (1971) Notice explicative de la carte pluviométrique de l'Algérie septentrionale. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle, Afrique du Nord*. 24p + cartes 1/500 000.
- Chooi WY (1971) Variation in nuclear DNA content in the genus *Vicia*. *Genetics* 68: 195-211
- Christiansen NL et al. (1996). The report of the Ecological Society of America Committee on the Scientific Basis for Ecosystem Management. *Ecological Applications* 6: 665-691.
- Christiansen S, Bounejmate M, Bahhady F, Thomson E, Mawlawi B, Singh M (2000). On farm trials with forage legume–barley compared with fallow–barley rotations and continuous barley in north-west Syria. *Experimental Agriculture* 36: 195–204.
- Comai S, Bertazzo A, Bailoni L, Zancato M, Costa CVL, Allegri G (2007) Protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in legume seeds. *Food Chemistry- Analytical Nutritional and Clinical Methods* 103: 657–661
- Consultative Group on International Agricultural Research, <http://www.cgiar.org/research/rescattle.html>
- Cubero JI (1982) Interspecific hybridization in *Vicia*. In *Faba Bean Improvement*. Proc. Faba bean Conf. Cairo, Egypt, 1981, ed. F. Hawtin, C. Webb. The Hague: Martinus Nijhoff

## D

- Daget P (1980) Un élément actuel de la caractérisation du monde méditerranéen, le climat Colloque de la fondation L. Emberger sur la mise en place. Evolution et la caractérisation de la flore et de la végétation du Circum. Montpellier 9-10/04 : 101-120
- Davis PH, Plitmann U (1970) *Vicia* L. In: Davis PH. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. University Press, Edinburgh, pp. 274-321
- Decruyenaere V, Stilmant D, Agneessens R, Buldgen A, Dardenne P, Bartiaux-Thill N (2007) Les productions fourragères : vers une gestion et une utilisation optimales des ressources locales, pp. 1-6
- Desfontaines R (1798-1799) Flora Atlantica, sive, Historia plantarum, quae in Atlante, agro Tunetano et Algeriensi crescunt. Tomes 1 et 2. Paris : Apud Blanchon
- Dobignard A (2009). Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. Genève : Conservatoire et jardins botaniques de la ville de Genève (<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/recherche.php>).
- Donnelly ED, Clark EM (1962) Hybridization in the genus *Vicia* L. Crop Science 2: 141-145.
- Doyle JJ, Doyle JL, Ballenger JA, Dickson EE, Kajita T, Ohashi H (1997) A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the *Leguminosae*: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. American Journal of Botany 84: 541–554.
- Dubief J (1950-1963) Le climat du Sahara. Mem. Inst. Rech Sahar. Alger, 2 tomes 314p, 275p.
- Dulloo ME, Labokas J, Iriundo JM, Maxted N, Lane A, Laguna E, Jarvis A, Kell SP (2008) Genetic reserve location and design, in J.M. Iriundo, N. Maxted and M.E. Dulloo (eds), Conserving Plant Genetic Diversity in Protected Area, pp23–64, CAB International, Wallingford, UK

## E

- Emberger L (1955) Une classification biogéographique des climats. Rev Trav Lab Geol Bot Zool Fac Sc Montpellier 7: 1–43.
- Emre I (2011) Determination of genetic diversity in the *Vicia* L. (Section *Vicia*) by using SDS-PAGE. Pakistan Journal of Botany 43(3): 1429-1432
- Emre I, Turgut-Balık D, Genç H, Şahin A (2010) Total seed storage protein patterns of some *Lathyrus* species growing in Turkey using SDS-PAGE. Pakistan Journal of Botany 42 (5): 3157-3163.
- Endo Y, Ohashi H (1996) The infrageneric position of East Asian species of *Vicia* (Leguminosae). Journal of Japanese Botany 71: 254–262.
- Enneking D (1995). The toxicity of *Vicia* species and their utilization as grain legumes. Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (CLIMA) Occasional Publication 6. Nedlands: CLIMA.
- Erskine W, Smartt J, Muehlbauer FJ (1994) Mimicry of lentil and the domestication of common vetch and grass pea. Economic Botany 48: 326-332.
- Ertug-Yaras F (1997) An ethnoarchaeological study of subsistence and plant gathering in central Anatolia, Unpublished PhD thesis, Washington University, St. Louis, MO, USA (768 p.).
- Esteban J (1996) El Yero (Bitter vetch). In: Franco Jubete, F. and Ramos Monreal, A. (Eds.). *El cultivo de las Leguminosas de grano en Castilla y León*, Valladolid: Junta de Castilla y León. Consejería de Agricultura y Ganadería, 161-193.

## F

- Fang DQ, Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 408–417.



- FAO (1996) The state of the world of plant genetic resources for food and agriculture. Rome, Italy.
- FAO (1999). FAO production yearbook vol.52 1998, FAO statistics series no 135. Rome
- FAO (2001) FAO production yearbook vol. 54 2000, FAO statistics series no 135. Rome.
- Fedchenko BA (1948) *Vicia* L. In: Shishkin BK, Bobrov EG. (eds.) Flora of the USSR 13. Moscow, pp. 406–475.
- Fennell SR, Powell W, Wright F, Ramsay G, Wangh R (1998) Phylogenetic relationships between *Vicia faba* (Fabaceae) and related species inferred from chloroplast trnL sequences. *Plant Systematics and Evolution* 212: 247–259
- Flitner M (1995) *Sammler, Räuber und Gelehrte. Die politischen Interessen an pflanzen genetischen Ressourcen 1895-1995*. Frankfurt: Campus
- Frankel OH (1977) Natural variation and its conservation. In Muhammed, A., Aksel, R.& von Borstel, R.C. (eds.) Genetic diversity in plants. Plenum Publishing Corporation, pp 21-44.
- Frediani M, Caputo P, Venora G, Ravalli C, Ambrosio M, Cremonini R (2005) Nuclear DNA contents, rDNAs and karyotype evolution in *Vicia* subgenus *Vicia*: II. Section Peregrinae. *Protoplasma* 226: 181-190

## G

- Gams H (1924) *Vicia* L. In: Hegi, G. (Ed). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, München: Lehmann, Vol. 4(3), pp. 1506-1562.
- Gleason H (1952) The new Britton and Brown illustrated flora of the Northeastern United States and adjacent Canada, Vol. II. The New York Botanical Garden, New York. 655 pp.
- Godron DA (1849) Viciaeae. In: Grenier JCM, Godron DA, eds. Flore de France, Vol. 1. Paris: J. B. Baillikre
- Goldblatt P (1985) Index to plant chromosome numbers 1982-1983. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden* 13: 1-224
- Golding JS, Smith PP (2001) A 13-point flora strategy to meet conservation challenges. *Taxon* 50: 475–477
- Guarino L, Jarvis A, Hijmans RJ, Maxted N (2002) Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resources, in J. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown and M/T. Jackson (eds) *Managing Plant Genetic Diversity*, pp387–404, CAB International, Wallingford, UK
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.

## H

- Hafliger E, Brun-Hool J (1975) Geigy weed tables. Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland.
- Hagan ND, Higgins TJV (2004) Storage Proteins and their Metabolism. *Handbook of Plant Biotechnology*. Edition Paul Christou and Harry Klee. John Wiley & Sons Ltd. ISBN 0-471-85199-X.
- Haider AS, El-Shanshoury AR (2000) Variability of storage proteins and esterase isozymes in *Vicia sativa* subsp. *Biologia Plantarum* 43: 205-209.
- Hameed A, Shah TM, Atta BM, Iqbal N, Haq MA, Ali H (2009) Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes. *Pakistan Journal of Botany* 41(2): 703-710.
- Hamilton RS, Hughes SJ, Maxted N (2001) *Ex Situ* conservation of forage legumes. In *The Genetic Diversity of Legumes species in the Mediterranean*, Maxted and Bennett. Kluwer Academic Press. 263-291.
- Hammer K, Perrino P (1995) Plant genetic resources in south Italy and Sicily - studies towards *in situ* and on-farm conservation. *Plant Genetic Resources Newsletter* 103: 19-23.
- Hamrit S (1995) Situation des fourrages en Algérie. *Al Awamia* 89 : 97-108

- Han Y, Wang HY (2010). Genetic diversity and phylogenetic relationships of two closely related northeast China *Vicia* species revealed with RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics* 48: 385-401
- Hanelt P, Mettin D (1970) Über die systematische Stellung temperater und meridionaler Sippen der Gattung *Vicia* L. *Feddes Repertorium* 81: 147-61
- Hanelt P, Mettin D (1989) Biosystematics of the genus *Vicia* L. (*Leguminosae*). *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 199-223.
- Hanf M (1990) *Ackerunkräuter Europas mit ihren Keimlingen und Samen*. 3rd revised edn. Munich: BLV Verlagsgesellschaft
- Heywood V (2004) Meeting the demands for taxonomic information from users in conservation and genetic resources. *Phytologia Balcanica* 93: 425–434
- Hitchcock CLA, Cronquist A, Ownbey M, Thompson JW (1955) *Vascular plants of the Pacific Northwest*. Vol. III. University of Washington Press, Seattle, Wash. 614 pp.
- Hollings E, Stace CA (1978) Morphological variation in the *Vicia sativa* L. aggregate. *Watsonia* 12: 1–14.
- Houmani M (1999) Situation alimentaire du bétail en Algérie. *INRA* 4: 35–45
- Hunter D, Heywood V (2011) Chapter 8: Establishing an Information Baseline: Ecogeographic Surveying. In *Crop Wild Relatives: A Manual of in situ Conservation*. Earthscan, London. Washington, DC pp 169-203

## I

- IBPGR (1985) *Ecogeographical Surveying and in Situ Conservation of Crop Relatives*, International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Rome, Italy
- INRAA (2006) Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétique, pp 10-67

## J

- Jaaska V (1997) Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 44: 557–574
- Jaaska V (2005) Isozyme Variation and Phylogenetic Relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (Fabaceae). *Annals of Botany* 96: 1085–1096
- Jakobsson A, Eriksson O (2000) A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos* 88: 494-502.
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK, Brar DS (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311–1320.

## K

- Karadag Y, Yavuz M (2010) Seed yields and biochemical compounds of grasspea (*Lathyrus sativus* L.) lines grown in semi-arid regions of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 9: 8343-8348.
- Koch DCDJ (1836) *Florac Germanicae et Hefveticae, Sectio Prior*. Frankfurt: Friederici Wilmans.
- Kojima T, Nagaoka T, Noda N, Ogihara Y (1998) Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 37-45.
- Kupicha FK (1976) The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Royal Botanical Garden Edinburgh* 34: 287–326
- Kupicha FK (1981) *Vicieae*. In Polhill, R.M. and Raven, P.M. (Eds) *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew: 377-381.

## L

- Ladizinsky G (1978) Pulse domestication before cultivation. *Economic Botany* 41: 60–65

- Ladizinsky G (1987) Pulse domestication before cultivation. *Economic Botany* 41 : 60–65.
- Ladizinsky G (1989) Origin and domestication of the Southwest Asian grain legumes, in: D.R. Harris, G.C. Hillman (Eds.), *Foraging and Farming. The evolution of plant exploitation*, Unwin Hyman, London, pp. 374–389.
- Ladizinsky G, Hymowitz T (1979) Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies: review. *Theoretical Applied Genetics* 54: 145-151.
- Ladizinsky G, Shefer Y (1982) Polyploidy in the *Vicia sativa* aggregate. *New Phytologist* 91: 541-47
- Ladizinsky G, Temkin R (1978) The cytogenetic structure of *Vicia sativa* aggregate. *Theoretical Applied Genetics* 53: 33- 42
- Le Bourgeois Th (2016) Stipules très découpées. *Vicia sativa* L. - *Fabaceae* – Dicotylédone. CIRAD
- Le Houerou HN, Claudin J, Pouget M (1977) Etude bioclimatique des steppes algériennes avec une carte bioclimatique au 1/1000.000. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle, Afrique du Nord* : 36-40.
- Le Houérou HN (1989) Classification écoclimatique des zones arides de l'Afrique du Nord. *Ecologia Mediterranea* XV (3-4): 95-144
- Leaback DH (1976) Concentration gradient polyacrylamide gel electrophoresis. In I. Smith (ed.), *Chromatographic and electrophoretic techniques*, Vol. II, 25~271. Heinemann Medical Books, London.
- Leht M, Jaaska V (2002) Cladistic and phenetic analysis of relationships in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) by morphology and isozymes. *Plant Systematics and Evolution* 232: 237-260.
- Linnaeus C (1753). *Species Plantarum*, Vol 2. Salvius, Stockholm.
- Liu Y, Zhang JM, Wang XG, Liu F, Shen ZB (2013). Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 51 : 86–93
- Lucido M (1972) *Climatologie et hydroclimatologie du Hodna (Algérie)*. F.A.O. Rome.

## M

- Maire R (1955-1987) *Flore de l'Afrique du Nord*. Volumes 1-16. Paris : Paul Le Chevalier.
- Marchenay Ph, Lagarde MF (1986) *Prospection et collecte des variétés locales de plantes cultivées*. Guide pratique. Page PACA. Conservatoire botanique de Porquerolles. 19 ISBN : 2-9501451-1-8 pp 11-65
- Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 45: 753–763
- Maxted N (1993a) A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Viciae). *Botanical Journal of Linnean Society* 111: 155–182.
- Maxted N (1993b) Towards a faba bean progenitor! *FABIS* 31: 3-8.
- Maxted N (1994) A phenetic investigation of *Vicia* section *Peregrinae* Kupicha (Leguminosae, Papilionoideae, Viciae). *Edinburgh Journal of Botany* 51: 75–97.
- Maxted N (1995) An ecogeographical study of *Vicia* subgenus *Vicia*. *Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools* 8. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Maxted N, Callimassia M, Bmna M (1991b) Cytotaxonomic studies of Eastern Mediterranean *Vicia* L. *Plant Systematics and Evolution* 117: 22 1-234
- Maxted N, Khabttab A, Bisby FA (1991a) Domesticated legumes and their wild relatives: newly discovered relatives of *Vicia faba* do little to resolve the enigma of its origin. *Botanika Chronika* 10: 129-159.

- Maxted N, Van Slageren MW, Rihan JR (1995) Ecogeographic surveys, in L. Guarino, V. Ramanatha Rao and R. Reid (eds), *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical Guidelines*, pp255–287, CAB International, Wallingford, UK
- McMenamy RH, Oncley JL (1958) The specific binding of Ltryptophan to serum albumin. *Journal of Biological Chemistry* 233: 1436–1447
- Mebarkia A, Abdelguerfi A (2007) Etude du potentiel agronomique de trois espèces de vesces (*Vicia* spp.) et variabilité dans la région semi-aride de Sétif (Algérie). *Fourrages* 192 : 495-506
- Médail F, Quézel P (2005) Conséquences écologiques possibles des changements climatiques sur la flore et la végétation du bassin méditerranéen. *Boccone* 16 : 397-422.
- Médiouni K (2004) Elaboration d'un bilan et d'une stratégie nationale de développement durable de la diversité biologique. *Projet ALG/97/G31. FEM/PNUD. Tome I à VIII. Alger : éditions du ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement*
- Meier R (1994) On the inappropriateness of presence/absence recoding for non-additive multistate characters in computerized cladistic analyses. *Zoologischer Anzeiger* 232 516 S : 201-212
- Mettin D (1962) Bastardierungsver-suche in der Gattung *Vicia* I. *Zuchter* 32:146-55
- Mettin D, Hanelt P (1968) Bemerkungen zur Karyologie und Systematik eini-ger Sippen der Gattung *Vicia* L. *Feddes Repertorium* 77:11-30
- Miara MD, Ait Hammou M, Hadjadj-Aoul S, Hamerlain AS (2013) Bioclimats, étages de végétation et zonation altitudinale des groupements végétaux dans les monts de Tiaret (exemple des groupements forestiers et préforestiers du massif de Guezoul). *Ecologie-Environnement* (9) : 1-7
- Mirali N, El-Khoury S, Rizq F (2007) Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS–PAGE of seed proteins. *Biologia Plantarum* 51(4): 660-666
- Moreno S, Martin JP, Ortiz JM (1998). Inter simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine. *Euphytica* 101:117–125
- Mossé J, Huet JC (1990) Amino acid composition and nutritional score for ten cereals and six legumes or oilseeds: causes and ranges of variations according to species and to seed nitrogen content. *Sciences des Aliments* 10: 151–173.
- Mueller T, Thorup-Kristensen K (2001). N fixation of selected green manure plants in an organic crop rotation. *Biological Agriculture and Horticulture* 18: 345-363
- Müller HP (1983) The genetic control of seed protein production in legumes. In W. Gottschalk and H.P. Müller (Eds.), *Seed proteins, biochemistry, genetics, nutritive value* (pp. 309–353). Hingham, MA: M. Nijhoff/W., Junk Publishers.

## N

- Narayan RKJ, Ramachandran C, Raina SN (1985) The distribution of satellite DNA in the chromosome complements of *Vicia* species (Leguminosae). *Genetica* 66: 115-121
- Nedjraoui D (2003) Profil fourrager. *Algérie*. pp 5-30
- Newton KJ (1983) Genetics of mitochondrial isozymes. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*, 157-174. Elsevier, Amsterdam
- Nikiforova OD (1985) The system of the genus *Vicia* (Fabaceae) in Siberia. *Botanicheskii Zhurnal (Leningrad)* 70(5): 604-611
- Nikiforova OD (1988) Wild vetches of Siberia. *Nauka, Novosibirsk* (in Russian)
- Nozzolillo (1977) Identification of *Vicia* seedlings. *Canadian Journal of Botany* 55: 2439-2462.

## O

- Orak A Nizam İ (2004) Agronomic and morphological characters of some common vetch (*Vicia sativa* L.) genotypes under Trakya region conditions. *Journal of Agronomy* 3(2): 72-75.

- Osborne TB (1924) *The Vegetable Proteins*; Longmans-Green: London, U.K.
- Ouknider M, Jacquard P (1986) Production et valeur nutritive de l'association vesce-avoine en zone Méditerranéenne. *Fourrages I05* : 39- 62.
- Ouknider M, Jacquard P (1988) Un modèle d'association graminées légumineuses : le mélange vesce (*Vicia sativa* L), Avoine (*Avena sativa* L.). *Agronomie I (2)* : 97-106.
- Ozenda P (1977) *Flore du Sahara*. Paris, C.N.R.S. 622 p.
- Ozenda P (1991) *Flore de Sahara. Mise à jour et augmentée*. 3ème ed. Dunod. CNRS. Paris. 262 p.

## P

- Papastylianou I (1999) Estimation of nitrogen fixed by legumes in long-term vs. short-term cropping systems. *Agronomy Journal* 91: 329-334.
- Pasquali G (2009) *V. sativa* subsp. *sativa*, in flora of North America. USDA, NRCS. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 28 August 2009). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
- Pastor-Cavada E, Juan R, Pastor JE, Alaiz M, Girón-Calle J, Vioque J (2009). Antioxidative activity in the seeds of 28 *Vicia* species from Southern Spain. *Journal of Food Biochemistry* 35: 1373-1380.
- Peterson TA, Russelle MP (1991) Alfalfa and the nitrogen cycle in the corn belt. *Journal of Soil and Water Conservation* 46: 229–235
- Pimentel R, Riggins R (1987) The nature of cladistic data. *Cladistics* 3: 201-209.
- Pleijel F (1995) On character coding for phylogeny reconstruction. *Cladistics* 11: 309–315.
- Plitmann U (1967) *Biosystematical study in the annual species of Vicia of the Middle East*. Unpublished Ph.D. thesis. The Hebrew University of Jerusalem Library, Jerusalem, Israel.
- Pogue M, Mickevich M (1990) Character definitions and character-state delimitations: The bête noire of phylogenetic inference. *Cladistics* 6: 319-361
- Poiret JML (1789) *Voyage en Barbarie ou Lettres Ecrites de l'ancienne Numidie pendant les années 1785 et 1786. Seconde partie. Recherches sur l'Histoire Naturelle de la Numidie*. Paris : JBF née de la Rochelle.
- Potokina EK (1997) *Vicia sativa* L. aggregate (Fabaceae) in the flora of former USSR. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:199-209
- Prakash S, Lewontin RC, Hubby JL (1969) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* 61: 841-858
- Pujic P, Normand P (2009) La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. *Biofutur* 298 : 26-29.

## Q

- Quézel P, Santa S (1962-1963) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tomes 1 et 2. Paris : CNRS.

## R

- Radzhi AD (1971) *Conspectus systematis specierum Caucasicarum Generis Vicia L. Novit. Syst. Pl. Vasc. (Leningrad)* 7: 228-240
- Raina SN (1990) Genome organisation and evolution in the genus *Vicia*. In: S. Kawano (ed.). "Biological approaches and evolutionary trends in plants", pp. 183-201, Academic Press, London.
- Raina SN, Bisht MS (1988) DAM amounts and chromatin compactness in *Vicia*. *Genetica* 77: 65-77.
- Raina SN, Narayan RKJ (1984) Changes in DNA composition in the evolution of *Vicia* species. *Theoretical Applied Genetics* 68: 187-192.
- Raina SN, Ogihara Y (1995) Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in 49 *Vicia* species. *Theoretical Applied Genetics* 90: 477-486.

- Raina SN, Rees H (1983a) DNA variation between and within chromosome complements of *Vicia* species. *Heredity* 51: 335-346.
- Raina SN, Rees H (1983b) Variation in chromosomal DNA associated with the evolution of *Vicia* species. In: P.E. Brandham and M.D. Bennett (eds), "Kew chromosome conference. II", pp. 360, George Alien and Unwin, London.
- Rajković D, Ksenija Taški-Ajduković K, Nagl N, Isakov M, Milić D, Karagić D, Mikić A (2015) Potential Use of SSR and ISSR Markers in Estimation of DNA polymorphism within genus *Vicia*. *Ratar. Povrt.* 52(2): 1-7
- Ramsay G, Pickersgill B (1986) Interspecific hybridization between *Vicia faba* and other species of *Vicia*: Approaches to delaying embryo abortion. *Biologisches Zentralblatt* 105: 171-79
- Ratnaparkhe MB, Tekeoglu M, Muehlbauer FJ (1998). Inter simple sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical Applied Genetics* 97: 515–519
- Raynaud Ch (1976) Monographie et iconographie du genre *Vicia* L. au Maroc. *Bulletin de l'Institut des Sciences* N° 1 : 147-172
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
- Roth AW (1787) *Vicia narbonensis* L. *Botanische Abhandlungen und Beobachtungen*, t. 2, fig. A-F (Illustration contributed by: Bayerische Staatsbibliothek, Germany). <http://plantillustrations.org/illustration>.
- Roti-Michelotti G, Serrato-Valentini G (1989) Seed characteristics in Italian species of genus *Vicia* section *Ervum* and their diagnostic value. *Seed Science Technology* 14: 391-402.
- Rousi A (1973) Cytotaxonomical studies on *Vicia cracca* L. and *Vicia tenuifolia* Roth. III. The relation between karyotype and morphology. *Annales Botanici Fenneci* 10: 89-96.
- Rowlands DG (1959) A case of mimicry in plants- *Vicia cracca* L. in lentil crops. *Genetica* 30: 435-446
- Russelle M (2001) Alfalfa. *American Scientist* 89: 252–259

## S

- Samarah NH, Ereifej K (2009) Chemical composition and mineral content of common vetch seeds during maturation. *Journal of Plant Nutrition* 32:177–186
- Sankar AA, Moore GA (2001) Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of genetic linkage map. *Theoretical Applied Genetics* 102: 206-214.
- Schäfer HI (1973) Zur Taxonomie der *Vicia narbonensis* - Gruppe. *Kulturpflanze* 21: 211-273.
- Scoggan HJ (1979) *The flora of Canada*. Vol. 3. National Museum of Canada. Ottawa. Ont. 1115 pp.
- Seltzer P (1946) *Le climat de l'Algérie*. Alger, Carbonel 219 p
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5 (25): 2540-2568
- Sinclair TR, Muchow RC, Bennet JM, Hammond LC (1987) Relative sensitivity of nitrogen and biomass accumulation to drought in field-grown soybean. *Agronomy Journal* 79: 986-991
- Slichter (2005) *Vetches of the Columbia River Gorge of Oregon and Washington*. The Genus *Vicia*. [science.halleyhosting.com](http://science.halleyhosting.com)
- Smith W (1913) *The book of vetch*, pp 10-14
- Stankevich AK (1978) Sistematike politipnogo vida *Vicia sativa* L. *Bulletin VIRI* 81: 3–11.

- Stebbins GL (1967) Adaptive radiation and trends of evolution in higher plants. *Evolutionary Biology* 1: 101-140.
- Sturm JG (1796) Einzelblütige Linse, *Vicia monantha*, in *Deutschlands Flora in Abbildungen* (Painter: Jacob Sturm).

## T

- Taira H (1968) Amino acid composition of different varieties of foxtail millet (*Setaria italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16: 1025–1029.
- Takhtadjan A (1969) Flowering plants: origin and dispersal. Oliver & Boyd Edinburgh and London.
- Talukdar D (2013) Leguminosae. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd Edition, Vol. 4 :212-216
- Taser OF, Altuntas E, Ozgoz E (2005). Physical Properties of Hungarian and Common Vetch Seeds. *Journal of Applied Sciences* 5 (2): 323-326
- Tate ME (1996) Vetches: Feed or food. *Chem. Aust.* 63: 549-550
- Tate ME, Enneking D (1992) A mess of red pottage. *Nature* 359: 357-358.
- Tate ME, Rathjen J, Delaere I, Enneking D (1999) Covert trade in toxic vetch continues. *Nature* 400 (6742): 207
- Thomé WO (1885) *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, Gera, Germany
- Tournefort (1694). *Eléments de botanique*. Tome 1. Paris : l'Imprimerie Royale.
- Tschiersch B, Hanelt P (1967) Die freien Aminosäuren der Samen von *Vicia* L. und die systematische Gliederung der Gattung. *Flora* 157A: 389-406
- Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical Applied Genetics* 92: 40–45
- Tzvelev N (1980) Systema specierum generis *Vicia* L. in parte Europaea URSS. *Novitates Systematicae Plantarum Vascularium* 17: 200–208 (in Russian).

## U

- Uzun A (2011) Effect of maturity stage and seed treatment on germination, seed dormancy, and certain pod and seed traits of common vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment* 9 (3-4): 189-192

## V

- Valizadeh M (2001) Seed Storage Protein Profile of Grain Legumes Grown in Iran, Using SDS-PAGE. *Journal of Agricultural Science and Technology* 3: 287-292
- Van de Wouw M, Enneking D, Robertson LD, Maxted N (2001a). Vetches (*Vicia* L.). Chapter 9 in: Maxted, N. and Bennett, S. J., Eds. *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Dordrecht: Kluwer; pp.132-157
- Van de Wouw M, Maxted N, Bria Fordlloyd BV (2003) Agromorphological characterization of common vetch and its close relatives. *Euphytica* 130(2): 281–292
- Van De Wouw M, Maxted N, Chabane K, Ford-Lloyd BV (2001b) Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on amplified fragment length polymorphisms. *Plant Systematics and Evolution* 229: 95–105
- Vance CP, Graham PH, Allan DL (2000) Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In FO Pedrosa, M Hungria, MG Yates, WE Newton, eds, *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 506–514
- Vavilov NI (1996). *Five continents* (New Translation). IPGRI, Rome.
- Venora G, Blangiforti S, Frediani M, Maggini F, Gelati MT, Ruffini Castiglione M, Cremonini R (2000) Nuclear DNA contents, rDNAs, chromatin organization and karyotype evolution in *Vicia* sect. *faba*. *Protoplasma* 213:118–125

## W

- Wagenknecht J (2016) Stipules nectarifères chez *Vicia sativa* (Vesce cultivée) - Acideformik. [www.acideformik.com/](http://www.acideformik.com/)
- Wang G, Mahalingan R, Knap HT (1998) (CA) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical Applied Genetics* 96: 1086-1096
- Watanabe K, Shimano I (1966) Studies on the interspecific hybridization of common vetch, *Vicia sativa* L. and Yahazuendo, *V. angustifolia* L. var. *segetalis*. IV. Cytological analysis of the second generation of the artificially induced amphidiploid. *Nat. Inst. Anim. Ind. (Chiba) Bull.* 11: 1-11. (In Japanese with English summary)
- Wattiaux MA, Howard TM (2001) Technical Dairy Guide: Nutrition and Feeding. University of Wisconsin. [http://babcock.cals.wisc.edu/de/html/ch6/nutrition\\_eng\\_ch6.html](http://babcock.cals.wisc.edu/de/html/ch6/nutrition_eng_ch6.html)
- Weeden NF (1983) Plastid isozymes. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.), *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*, 139-156. Elsevier, Amsterdam
- Wendel JF, Weeden NF (1989) Visualization and interpretation of plant isozymes. *In Soltis D E, Soltis PS. Isozymes in plant biology*, p. 5–44. Portland, Oregon: Dioscorides Press
- Westoby M (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology scheme. *Plant and Soil* 199: 213-227.
- Westoby M, Jurado E, Leishman M (1992) Comparative evolutionary ecology of seed size. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 368-372.
- Willis, J.C., (1921). *Age and area; a study in geographic distribution and origin of species.* Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Wu K, Jones R, Dannaeburger L, Scolnik PA (1994) Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Reserach* 22: 3257-3258.

## Y

- Yalçın I, Ozarslan C (2004) Physical properties of Vetch Seed. *Biosystems Engineering* 88 (4): 507-512
- Yamamoto K (1977) On the interspecific hybrid between *Vicia amphicarpa* and *V. sativa*. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture. Kagawa University* 28: 23-31.
- Yamamoto K, Plitmann U (1980) Isozyme polymorphism in species of the genus *Vicia* (*Leguminosae*). *Japanese Journal of Genetics* 55: 151–164
- Yasui, T, Endo Y, Ohashi H (1987) Infrageneric variation of the low molecular weight carbohydrate composition of the seeds of the genus *Vicia* (*Leguminosae*). *Botanical Magazine (Tokyo)* 100: 255-72

## Z

- Zanardo V, Stocchero L, Biasiolo M, Costa C, Allegri G (1987) Dietary proteins and serum tryptophan levels in full-term newborn infants. In D.A. Bender, M.H. Joseph, W. Kochen, & H. Steinhart (Eds.), *Progress in tryptophan and serotonin research* (pp. 185–188). Berlin: W. de Gruyter
- Zegrar S, Oussedik A, Iften T (1997) Réalisation de la carte de sensibilité à la désertification à partir de l'imagerie spatiale. Séminaire International sur l'utilisation spatiale pour la prévention des risques majeurs Arzew, 9p.
- Zeraïa L (1983) Protection de la flore. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. Station Centrale de Recherche en Ecologie Forestière, Alger
- Zohary D (1989) Pulse domestication and cereal domestication: How different are they? *Economical Botany* 43 (1): 31–34.
- Zohary D, Hopf M (1994) *Domestication of Plants in the Old World*, Second edition, Clarendon Press, Oxford, Royaume-Uni, (279 p.).
- Zohary D, Plitmann U (1979) Chromosome polymorphism, hybridization and colonization in the *Vicia sativa* Group (*Fabaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 131: 143-156.



**Deuxième partie**  
**Résultats et discussion**

**Premier chapitre**  
**Diversité génétique associée aux paramètres**  
**écogéographiques et aux caractères**  
**morphologiques de la plante**

#### Prologue

La taxonomie et la nomenclature des espèces du genre *Vicia* sont très complexes. Le nombre des espèces reconnues dans le genre varie significativement, ce qui indique des différences dans la délimitation et la classification au sein du genre. Cette complexité taxonomique s'observe spécialement au sein du complexe *sativa* qui est parfois subdivisé en plusieurs espèces, mais l'absence de distinctions claires entre les types principaux conduit plutôt à réunir le tout dans une seule espèce polymorphe. La première étape vers une conservation plus efficace des ressources génétiques est celle d'entreprendre une étude écogéographique. Les cartes de distribution pourraient être utilisées dans la formulation d'une politique de conservation et spécifiquement dans l'organisation de futures missions de collecte (Bennett et Maxted 1997).

Dans ce premier volet, l'identification des taxa a été réalisée par le suivi du développement des graines, semées en serre, jusqu'au stade fructification (formation et maturité des gousses). Les objectifs du présent chapitre sont donc les suivants :

- L'utilisation d'une analyse morphologique multi-traités, en parallèle à une étude de la variabilité écogéographique afin de clarifier la diversité au sein et entre les sous-espèces du complexe *sativa* et d'évaluer les affinités phylogénétiques entre les accessions du complexe. Des corrections des données climatologiques ainsi que l'établissement des bioclimats des sites de collecte ont été également réalisés. Les relations entre les différents traits morphologiques et l'identification des caractères qui contribuent le plus à la discrimination entre les taxa ont été élucidées. Enfin, la corrélation entre la morphologie de ces taxa et les paramètres écogéographiques des stations a été réalisée. Cette partie a fait l'objet d'une première publication scientifique : Variation in *Vicia sativa* s.l from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters, publiée dans « Genetic Resources and Crop Evolution »
- Etudier la diversité de sept taxa du genre *Vicia* L. sur les plans inter et intra-spécifiques et évaluer les groupes d'espèces et les relations phylogénétiques des accessions ainsi que l'utilité de la morphologie de la plante dans la discrimination des espèces et des sections. Une étude écogéographique parallèle avec corrections des données climatologiques et définition des bioclimats a été également entreprise. L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet d'une deuxième publication scientifique : Characterization of 7 *Vicia* L. taxa (Fabaceae) from Algeria based on evidence from morphology and ecogeography, soumise dans « Bangladesh Journal of Plant Taxonomy ».

# Variation in *Vicia sativa* s.l. from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters

Sakina Bechkri · Douadi Khelifi

Received: 7 January 2016 / Accepted: 4 April 2016 / Published online: 25 April 2016  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

**Abstract** *Vicia sativa* s.l. is one of the most commonly grown forage crop in Mediterranean regions. It is widely distributed and presents at the same time the largest overlaps and the most difficult taxonomic problems. The present study is an attempt to characterize the diversity and the taxonomic relationships among the members of a collection of 34 *V. sativa* s.l. from a variety of geographical sources of North Algeria with the aim to improve their conservation and management along with a synthesis of the results obtained by previous researchers. Four taxa (*obovata*, *cordata*, *consobrina* and *angustifolia*) were analysed using 5 ecogeographic parameters and 78 morphological characters coded as multistate. The results reflect the great diversity of vetches and subspecies were not clearly recognizable from their plant morphology and ecogeography. Cluster analysis does not have provided clear separation among accessions. 11 morphological characters were excluded as they are homologous between all accessions. Important variation in standard colour, leaflets pairs per leaf, tendril length, hilum length and legume suture curvature was

found in most accessions of the collection. Even for the characters that contribute the most to the separation of the accessions, the range of variation does show overlap between the subspecies. The study has drawn accessions from a wider geographical range and a distribution map of each taxa was produced. The information obtained can be used as a guide for future collecting missions. Variation in morphological characters appeared to be related to the site from which the accession was collected with 44.89 %.

**Keywords** Algeria · Diversity · Ecogeography · Morphology · *Vicia sativa* s.l.

## Introduction

The genus *Vicia* L. is a member of the legume tribe *Vicieae* of the subfamily Papilionoideae of Leguminosae. It comprises 150 species accepted by Kupicha (1976) up to about 210 used by Hanelt and Mettin (1989). The genus has always been a subject of active research because it contains several species of economic importance, many of them domesticated since the very origin of agriculture. Subgenus *Vicia* has been extensively studied and the relationships between the known species are reasonable well understood, apart from the *Vicia sativa* complex, which is being currently studied (Van de wouw et al. 2001).

*Vicia sativa* (the common vetch) is widely cultivated as forage crop (Hueze et al. 2011). The major

---

S. Bechkri · D. Khelifi (✉)  
Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies  
Végétales, Faculté des sciences de la nature et de la vie,  
Université des Frères Mentouri, 25000 Constantine,  
Algeria  
e-mail: dkhelifi@yahoo.fr

S. Bechkri  
e-mail: s.bechkri@gmail.com

vetch-growing areas are concentrated mainly in Turkey, Syria, Ethiopia, Morocco, Spain and Algeria (Robertson et al. 1996). As a feed for ruminants, common vetch is a multipurpose crop that may be used as green forage, dry forage, forage meal, silage or haylage (Caballero et al. 1995). In several regions, common vetch is cultivated in mixtures with cereals such as oat, barley, triticale or wheat to provide both cool-weather weed suppression and prevent fall N scavenging (Hueze et al. 2011). The seed is traditionally used as an additive to voluminous feeds for ruminants (Enneking 1995). Its high dry matter and nitrogen accumulation and the absence of hard seeds, make it an excellent winter leguminous cover crop in annual vegetable rotations (Papastylianou 2004).

*V. sativa* is the most ubiquitous and polymorphic complex of the genus *Vicia*. As this complex is the most morphologically diverse and widespread, the debate about its taxonomy is extensive and ongoing. Numerous workers have reported detailed morphological studies of the *V. sativa* and each has proposed a novel classification of the included supra-specific taxa (Maxted 1995). Variability in all taxa, or populations, of *V. sativa* is homologous, parallel and consequently overlapping and many of the subdivisions are known to interbreed with each other (Bozkurt et al. 2013). The evolution of this complex is correlated to the expansion of agriculture which has resulted in concomitant increase in diversity at the intraspecific level through adaptation to new habitats (Hanelt and Mettin 1989). A problem with most studies is the limited geographical coverage of the material studied. Often the taxonomic classifications were produced for regional floras (Ball 1968; Romero Zarco 1999). The basic chromosome numbers in the genus *Vicia* are  $n = 5, 6$  and  $7$  and the great majority of the species have complements with  $2n = 10, 12$  and  $14$  respectively (Hanelt and Mettin 1989). Plants with these three basic chromosome numbers can exist even within one species of the same complex as is the case for *V. sativa* (Hollings and Stace 1974). Thus, it is very difficult to arrange this variability into a formal taxonomic classification.

In Algeria, the genus *Vicia* was described by Quézel and Santa (1962) in the single document covering the entire country. The authors used the following characters to classify accessions in *V. sativa* L.: size, shape, colour of leaflets and their number per leaf, stem form, standard glabrescence, legume glabrescence, calyx size and calyx teeth shape, length and colour of flower,

number of flowers per inflorescence and legume shape. They distinguished five subspecies: *amphicarpa* (L.) Batt., *obovata* Gaudin, *consobrina* (Pomel) Maire, *cordata* (Will) Batt. and *angustifolia* (L.) Gaudin using the following characters: flower size, number of flower per inflorescence, seeds size, plant pubescence, legume colour, leaflets shape and presence of tendril on leaves. Since Quézel and Santa (1962), no work has been undertaken to study the genus in Algeria and no key using more characters have been proposed. As the characterization of plant genetic resources is the first step towards improving their use, the aim of the present paper is to use a multivariate analysis of morphological variation, together with a parallel study of ecogeographic variation to clarify within and between subspecies diversity and evaluate the genetic variability and phylogenetic affinities in a collection of *V. sativa* s.l. from Algeria.

## Materials and methods

### Plant material and taxa identification

Thirty-four populations of *V. sativa* s.l from various bioclimatic and ecological conditions are used in the current study. Pods of 14 *V. sativa* subsp. *obovata*, 1 *V. sativa* subsp. *angustifolia*, 10 *V. sativa* subsp. *cordata* and 9 *V. sativa* subsp. *consobrina* were collected from 29 different places of North Algeria as shown in Table 1 and Fig. 1. In each sampling site, individual plants were randomly collected. Pods were shelled and the dry seeds of vetch were then poured into separate paper bags at room temperature and the bags sealed tightly until their utilization. Taxonomic identification of accessions was verified by the morphology of plants grown from seeds. The identification was checked using the key provided by Quézel and Santa (1962).

### Germination and growing

The trial was carried out in the laboratory of genetics, biochemistry and plants biotechnologies (N36°20.602' E006°37.480' Alt. 569 m) of Faculty of Biology in Constantine University (eastern Algeria). Dry seeds from each packet were scarified then imbibed overnight in distilled water. They were germinated in the dark at 25 °C on Wattman paper in Petri dishes until the appearance of the radicle. Seeds were considered to

**Table 1** Passport information and taxonomic identification of accessions investigated

Subspecies	Code	Date of collection	Province/locality/origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<i>V. sativa</i> subsp. <i>consobrina</i>	5	28.5.14	Guelma	N36°26.187'	E007°17.772'	339
	14	1st.6.14	Annaba, El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
	36	23.5.14	Béjaia, Affalou	N36°40.381'	E005°08.903'	1
	59	30.5.14	Jijel	N36°35.082'	E006°16.728'	141
	64	1st.6.14	Skikda, Azzaba	N36°43.532'	E007°04.706'	111
	86	13.6.14	Constantine, Djbel El ouehch	N36°23.690'	E006°39.011'	880
	65a	9.6.14	Tipaza, El Beldj Chenoua mountain	N36°37.667'	E002°21.150'	345
	52	4.6.14	Blida, National parc of Chréa	N36°24.538'	E002°45.519'	249
	93	30.5.14	Jijel	N36°48.699'	E005°41.679'	25
<i>V. sativa</i> subsp. <i>obovata</i>	6	22.5.14	Constantine, Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563
	7	30.5.14	Mila, Messaoud Boudjriou	N36°29.743'	E006°25.527'	325
	10	27.5.14	Constantine, Didouche Mourad	N36°28.409'	E006°38.239'	468
	17	22.5.14	Constantine, Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563
	20	3.6.14	Sétif, Ain arnat	N36°07.394'	E005°12.172'	866
	22	2.6.14	Oum El Bouaghi, Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
	28	30.5.14	Jijel	N36°35.094'	E006°16.732'	168
	51	6.6.14	Sidi Bel Abbes	N35°10.824'	W000°36.026'	490
	32	22.5.14	Constantine, Chaab ersas	N36°20.634'	E006°37.486'	562
	57	6.6.14	Tlemcen, Ain fezza	N34°52.732'	W001°13.726'	867
	61	1st.6.14	Annaba, Berrahal	N36°49.826'	E007°29.000'	38
	68	6.6.14	Ain Temouchent	N35°16.464'	W001°13.836'	281
	72	28.5.14	Constantine, Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	80	28.5.14	Constantine, Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	<i>V. sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i>	19	18.5.14	Constantine, Chaab ersas	N36°20.634'	E006°37.486'
<i>V. sativa</i> subsp. <i>cordata</i>	8	26.5.14	Biskra, El Kantra,	N35°11.517'	E005°40.673'	467
	11	6.6.14	Tlemcen	N35°05.699'	W001°26.612'	90
	13	26.5.14	Biskra, El Kantra, Ain Skhoun	N35°16.087'	E005°44.174'	584
	15	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24
	33	29.5.14	Skikda, El hadaik	N36°49.894'	E006°53.079'	26
	35	1st.6.14	Annaba, El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
	37	28.5.14	Guelma	N36°28.361'	E007°21.280'	223
	38	10.5.14	Jijel	N36°49.348'	E005°56.706'	14
	42	28.5.14	Constantine, Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	47	22.5.14	Constantine, University	N36°20.387'	E006°37.177'	604

have germinated when radicle length equalled seed diameter. Three germinated seeds from each accession were planted in a moist mixture of garden soil, sand and compost in 5 L capacity plastic pots and plants were grown under unheated greenhouse where a selective herbicide was applied to all of them.

#### Morphological analyses

The variation of 78 morphological characters with two to five states was analyzed (Table 2). These

characters grouped as stem, leaflets, stipules, tendril, flower, legume and seeds characteristics were examined with a binocular and a caliper. The observations on growth form were taken on three individual plants per population. In total, 102 individuals were examined. The morphological characters were selected from the species descriptions of several floras (Tamayunova 1961; Tamamschjan 1962; Ball 1968; Zohary 1972; Rasulova and Kamirova 1978; Pavlova 1989) and from taxonomic studies (Gunn 1979; Kupicha 1976; Nikiforova 1988). Leaf and stem



**Fig. 1** Geographical origin of the 34 Algerian populations studied

characters were measured at the first productive node. Leaflets were also measured at the lower part of the stems. Legume and seed characters were observed on harvested mature pods.

#### Ecogeographic parameters

A Global Positioning Systems (GPS GARMIN eTrex® model 30) was used to collect latitude, longitude and altitude of sites investigated. Each sampling site was characterized by the five ecological factors (Table 3) of Mediterranean climate (P = annual rainfall, M = average of the maximum temperature of the hottest month, m = average of a minimum temperature of the coldest month, Q2 = Emberger coefficient and A = altitude). The data recorded to ONM (National Office of Meteorology, Algeria) were used to characterize the climate parameters of sites investigated. However, data of four stations (Mila, Ain Temouchent, Tipaza and Blida) were not available; this is why data recorded to CLIMATE-DATA.ORG (<http://fr.climate-data.org/>) were used for these sites.

#### Corrections of climatic data

Data of reference stations did not reflect the point of view ecogeographical actual bioclimatic conditions. Because we have made correction of climate data based on extrapolations for different altitudinal point. According to the altitudinal gradient of Seltzer (1946) in his study on Algeria climate, the following gradients are advocated: For the pluviometry, every altitude of 100 m, an increase of 40 mm for continental sites and 80 mm for the coastline. For the temperature, every 100 meters, a decrease of 0.7 °C for M and 0.4 °C for m. This gives an increasing altitudinal gradient for the pluviometry and a decreasing one for the temperature. Correction factors allow us to have more accurate data on items considered. The rainfall correction is performed as follows:

$$\text{Correction factor: } K = \frac{A + P}{P}$$

where A: rainfall increase (mm):  $A = d \times 40/100$  for the continental and  $A = d \times 80/100$  for coastline. d: difference in altitude between the two stations. P: sum





Table 2 continued

Symbol	Character name	Character state		
Tendrils	TP	Tendrils presence	0—absent 1—present	2—in some leaves
	TB	Tendrils branching	0—not branched 1—branched	
	TL	Tendrils length	0—short 1—long	
	THD	Tendrils hair density	0—glabrous 1—sparse	2—dense
Flower	NFI	Number of flowers per inflorescence	0—one 1—1-4	2—5 or more
	FL	Flower length	0—up to 0.8(0.9) cm 1—2.5 cm	2—over 2.5 cm
	PeL	Pedicel length	0—shorter than calyx 1—equal or longer than calyx	
	PL	Peduncle length	0—absent 1—very short	2—up to as long as leaf 3—longer than leaf
	SCP	Standard colour pattern	0—absent 1—differently coloured spot	2—differently coloured veins 3—differently coloured back 4—darker
	SC	Standard colour	0—white 1—yellow	2—purple (bluish)
	SP	Standard pubescence	0—glabrous 1—pubescent at back	
	SASH	Standard apex shape	0—strongly emarginate 1—slightly emarginate	
	WCP	Wing colour pattern	0—absent 1—tip differently coloured	2—differently coloured veins
	WC	Wing colour	0—white 1—yellow	2—purple
	WL	Wing length	0—1/4 shorter than standard 1—little shorter than standard	2—longer than standard
	KC	Keel colour	0—white 1—yellow	2—purple
	KCP	Keel colour pattern	0—absent 1—dark tip	2—much darker
	KL	Keel length	0—shorter than wings 1—equal or longer than wings	
	CBSh	Calyx base shape	0—not gibbous 1—slightly gibbous	2—strongly gibbous
	CMSH	Calyx mouth shape	0—straight 1—slightly oblique	2—strongly oblique
	CH	Calyx hairiness	0—glabrous 1—clayx teeth only	2—general coverage
	CHD	Calyx hair density	0—sparse 1—dense	
	CC	Calyx colour	0—green 1—purple at base	2—teeth purple 3—purple 4—dark at base
	CTL	Calyx teeth length	0—equal 1—unequal	
	CUTL	Calyx upper teeth length	0—longer than tube 1—shorter than tube	

Table 2 continued

Symbol	Character name	Character state
CLTL	Calyx lower teeth length	0—longer than tube 1—shorter than tube
CUTSh	Calyx upper teeth shape	0—triangular 1—lanceolate
CLTSh	Calyx lower teeth shape	0—triangular 1—lanceolate
LSh	Legume shape	0—linear 1—lanceolate 2—rhomboid 3—oblong
LCS	Legume cross-section	0—rounded 1—slightly compressed
LP	Legume position	0—erect 1—horizontal
LSt	Legume stipitate	0—not 1—stipitate
Lpu	Legume pubescence	0—glabrous 1—entire coverage
LSf	Legume surface	0—smooth 1—slightly ridged with veins 2—only on sutures 2—strongly ridged with veins
LT	Legume torulose	0—not 1—torulose
LC	Legume colour	0—black 1—brown 2—yellowish brown 3—yellow
LSC	Legume suture curvature	0—suture parallel 1—sutures unparallel
LSH	Legume suture hairness	0—glabrous 1—hairy
LBe	Legume beak	0—absent 1—short 2—long
LBSH	Legume beak shape	0—straight 1—curved up 2—curved down
SNL	Seed number per legume	0—2 1—3-4 2—over 5
Ssha	Seed shape	0—spherical 1—cubical 2—elliptical
SCS	Seed cross-section	0—uncompressed 1—compressed
Ssu	Seed surface	0—smooth 1—wrinkled
Sco	Seed colour	0—black 1—brown 2—red—brown 3—yellowish
SCM	Seed colour mottling	0—absent 1—present
HL	Hilum length	0—long (70–80 %) 1—intermediate (20–40 %)
HC	Hilum colour	0—pale 1—seed colour 2—short (less than 20 %) 2—dark
LSI	Legume spongy inside	0—not 1—spongy
SSz	Seed Size	0—3-5(6) mm 1—over 6 mm

**Table 3** Climatic characteristics of reference stations (2004–2014)

Reference station	Latitude	Longitude	Alt. (m)	P (mm)	m (°C)	M (°C)
Jijel (airport)	36°48N	05°53E	8	1066.1	6.8	31.5
Skikda	36°53N	06°54E	2	829	8.8	29
Annaba	36°50N	07°48E	3	684.4	6.7	31.5
Béjaia	36°43N	05°04E	2	833	7.4	30.7
Constantine	36°17N	06°37E	693	486.6	2.2	35.2
Mila*	36°27N	06°16E	437	742	4.4	31.5
Sétif (Ain Arnat)	36°10N	05°19E	1007	401.8	−2	34.8
Oum El Bouaghi	35°52N	07°07E	889	410.4	1.1	35
Tlemcen (Zenata)	35°01N	01°28W	246	359.8	6.2	33.9
Ain Temouchent*	35°17N	01°08W	235	485	6.8	30.2
Biskra	34°48N	05°44E	82	143	6.9	41.3
Guelma	36°28N	07°28E	227	622.3	4.5	36.4
Sidi Bel Abbes	35°12N	00°37W	475	375.1	2.8	36
Tipaza El Beldj*	36°38N	02°21E	22	631	8.4	30.8
Blida*	36°27N	02°44	1458	916	−0.9	28.5

Alt. altitude, P annual rainfall, M and m are the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively

\* Data from “CLIMATE-DATA.ORG”

of monthly average rainfall of the reference station. The correction factor is multiplied by the monthly rainfall data for the reference station.

Calculation of the bioclimatic coefficient of Emberger (1955) and definition of the bioclimate

The pluviothermic Emberger quotient (Q2) is determined by the combination of three major climate factors. This quotient easy to interpret: the more Q2 values are larger and more stations are wet. We have used Stewart’s formula (1969) who transformed the equation and obtained the following formula for the mediterranean:

$$Q2 = \frac{kP}{M - m}$$

where k: constant which is equal to 3.43; temperatures are in degrees Celsius for M and m; P mm.

Interpretation of this quotient requires the use of Emberger climagramm which classifies each station in one of the 54 combinations bioclimatic Mediterranean climate.

Data analyses

Cluster analysis of morphological characters and eco-geographic parameters were performed with Euclidean

distances matrix based on the Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). In the other side, Principal Component Analysis (PCA) was undertaken to clarify correlation between morphological characters used and to identify characters which contribute the most in accessions distinction. These analyses were carried out with Data analysis software (STATISTICA version 6.1 program). Finally, to display correlation between Euclidean distance matrices of morphological characters and ecogeographic parameters, a Mantel test (Mantel 1967) based on Pearson’s correlation was used (XLSTAT Pearson edition, version 2014.5.03).

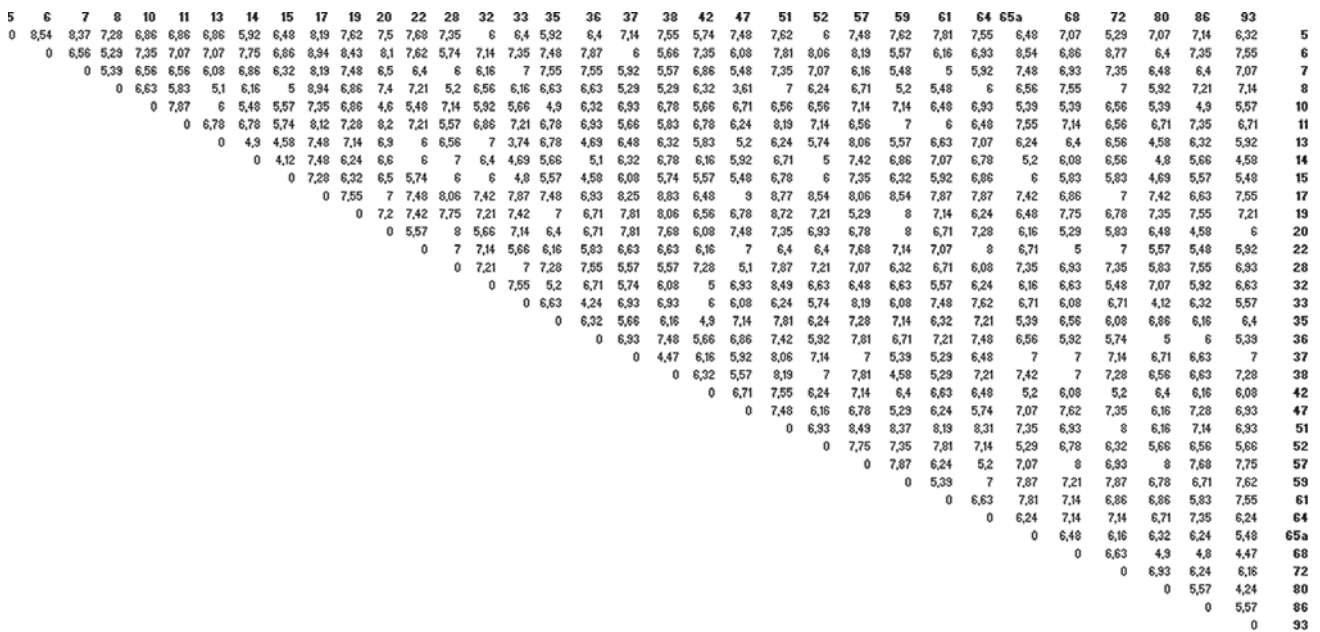
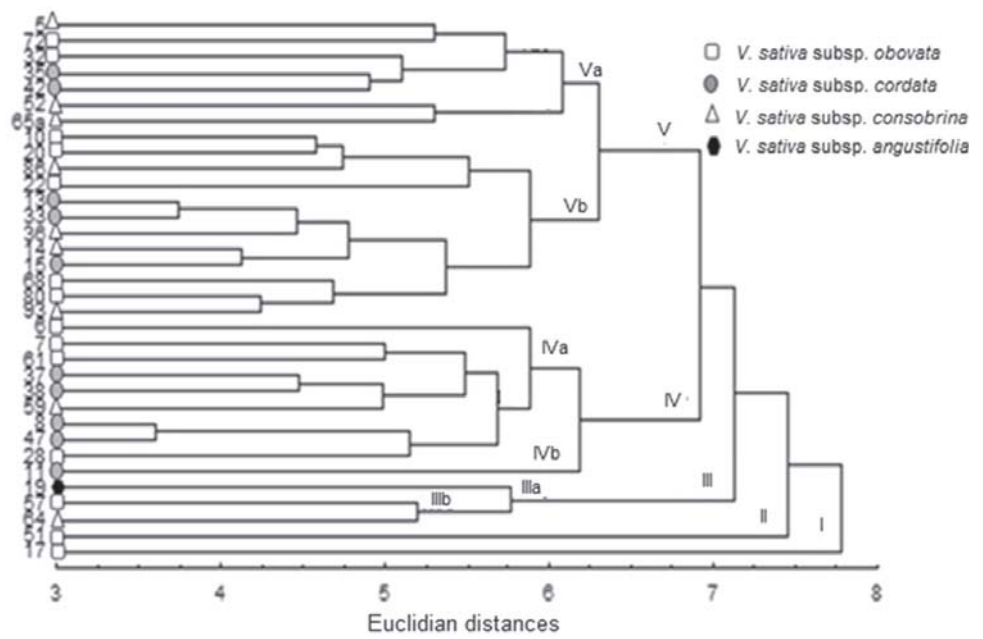
## Results

Cluster analysis based on morphological characters

The relationships between these subspecies, based on the variation in morphological characters are shown by the dendrogram illustrated in Fig. 2.

The cluster analysis of the tested accessions shows five main groups at a distance of 6.30. The accession 17, being itself the first group, joined the second group at a distance of 7.78, while 51, as the only member of the second group, joined the third group at a distance of 7.45. The cluster III (d = 7.12) comprises two sub-clusters: IIIa formed by the accession

**Fig. 2** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of 34 *V. sativa* s.l. accessions



**Fig. 3** Similarity matrix of morphological characters

19 and IIIb with two accessions (57 and 64). The cluster IV consists of 10 accessions and could further divided into two sub-clusters, IVa ( $d = 5.88$ ) which comprises 9 accessions (6-7-61-37-38-59-47-28) and IVb composed of one accession (11). The cluster V was also subdivided into 2 subclusters: Va ( $d = 6.08$ ) with 7 accessions (5-72-32-35-42-52-65) and Vb ( $d = 5.88$ ) with 12 accessions (10-20-86-22-13-33-36-14-15-68-80-93).

Within and between subspecies variability is examined by the similarity matrix of all pairs of studied populations (Fig. 3). The low distance value indicates high level of homology in the variation pattern of the morphological characters. Accessions 8 and 47 appears to be a sister taxa of *V. sativa* subsp. *cordata*. This clade is strongly supported by the lowest distance value ( $d = 3.61$ ). 65 characters are identical between the two accessions. Morphological differences between them

concern only 13 characters on 78 used (SH–SF–SNC–LBP–LHE–Spa–CBSH–CMSH–LSh–LCS–LP–LSt–SCS). No differences are observed in tendril characters. Accessions 20 and 10 (*V. sativa* subsp. *obovata*) have a distance of 4.58 with 17 different morphological characters (SH–SNC–LLP–LS–LBP–LAHD–SS–SNS–NFI–SCP–CBSH–CMSH–LC–SNL–Ssha–SCS–HL). On another side, samples 17 and 51 belonging to *V. sativa* subsp. *obovata* are outliers from the rest of the groups and form separate clusters (I and II). They are also very different from each other as they separate at quite a high level with  $d = 8.77$ . The accession 17 which forms the cluster I presents lot of different morphological characters compared with the other accessions belonging to the same subspecies especially concerning stem which is unbranched, the stem height which is small (up to 40 cm), leaflets pairs per leaf (1–3 pairs), leaflet hair elevation, tendril length (short), standard colour (white) and legume suture curvature (unparallel). The greatest distance ( $d = 9$ ) is observed between 17 and 47 which have 34 morphological differences (SB–SH–SEC–SNC–LPL–LRSh–LRS–LS–LBP–LAS–TP–TL–THD–SCP–SC–SASH–WCP–CMSH–CH–CHD–CC–CUTSh–CLTSh–LCS–LP–LSt–Lpu–LC–LSC–LSH–Ssha–Sco–HL–HC). Samples 51 and 32 (*V. sativa* subsp. *obovata*) with a distance of 8.49 present 33 different characters (SP–SHE–SHL–LRSh–LRS–LLP–LS–LBP–LAS–LB–LHE–LAHD–SS–Spa–TP–THD–NFI–SASH–KC–CBSH–CMSH–CHD–CC–LSh–LSt–Lpu–LT–LC–LSH–SCS–Ssu–Sco–SCM). Accessions 65a and 59 (*V. sativa* subsp. *consobrina*) with a distance of 7.87 have 20 differences concerning stem (4), leaflets (4), stipules (1), flower (6) and legume (4). Only one difference is observed for seed and no differences are observed for tendril characteristics. In parallel, accessions 93 (*V. sativa* subsp. *consobrina*) and 80 (*V. sativa* subsp. *obovata*) with a distance of  $d = 4.24$  present differences in: SNC–LBP–LAS–SS–SNS–Spa–SASH–KC–CMSh–LP–LT and LC. Samples 36 (*V. sativa* subsp. *consobrina*) and 33 (*V. sativa* subsp. *cordata*) have also a distance of 4.24 and are different in SH–SNC–LRSh–LS–LAS–SNS–SE–Spa–TL–CBSH–CMSH–CH–CHD–LP–LB. No differences are observed for seeds. A distance of 8.06 is observed between 19 (*V. sativa* subsp. *angustifolia*) which forms the subcluster IIIa and 38 (*V. sativa* subsp. *cordata*). The same distance is obtained between 59 (*V. sativa* subsp. *consobrina*) and 19. Between 6 (*V. sativa* subsp. *obovata*) and 19, a

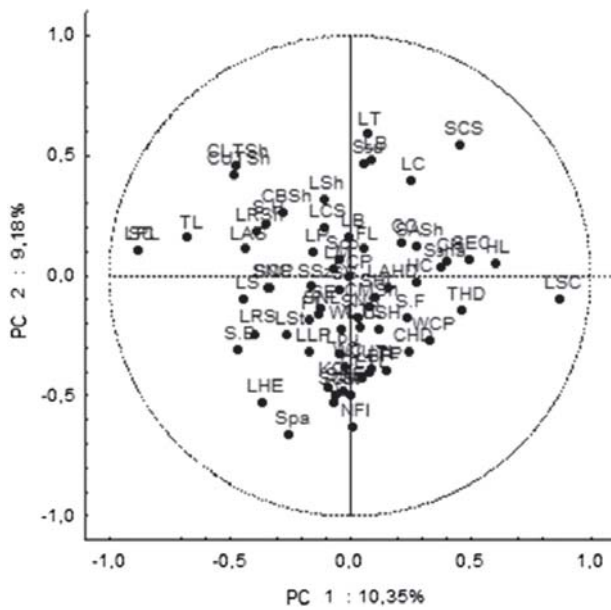
distance of 8.43 is obtained and 21 differences are observed (SB–SNC–LRS–LS–LAS–LHE–SNS–SE–Spa–THD–NFI–SCP–WC–CC–LSh–Lpu–LSH–Ssha–SCS–HC–SSz). The same observations were found between 51 (*V. sativa* subsp. *obovata*) which forms the cluster II one side and 37 (*V. sativa* subsp. *cordata*), 65a (*V. sativa* subsp. *consobrina*), 5 (*V. sativa* subsp. *consobrina*) and 6 (*V. sativa* subsp. *obovata*) another side with  $d = 8.06$ .

An important qualitative character is the colouring of the flowers. We found two different standard colours: all accessions present purple (or bluish) standard with differently coloured veins (accessions 5, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 20, 32, 33, 36, 38, 42, 47, 51, 52, 59, 61, 68, 72, 80, 86, 93), differently coloured spot (accessions 10, 14, 19, 22, 57, 64) or absent pattern (accessions 28, 35, 37, 65a) and the white standard without pattern for the accessions 17. All accessions present a flower length between 1 and 2.5 cm. One accession (52) has a flower length up 0.8 (0.9). All accessions have seed size of 3–5(6) mm and one accession (6) belonging to *V. sativa* subsp. *obovata* has seed size over 6 mm.

#### Principal Component Analysis based on morphological characters

To clarify relationships between morphological characters and to identify which characters contribute the most in accessions separation, a Principal Component Analysis (PCA) was carried out. 11 morphological characters (LAC–LAD–LMH–SSh–TB–PcL–SP–KL–LSf–LBSH–LSI) were excluded because they are 100 % identical between all accessions. Relationships between the remaining 67 morphological characters were used for PCA. The results are shown in Fig. 4.

The results of PCA revealed that the first twenty axes accounted for 89.26 % of the total variation with 10.34 % for PC1, 9.17 % for PC2 and 7.71 % for PC3. Two-dimensional (2D) plot was obtained using the first two PCs. The morphological characters which strongly contributed to the formation of PC1 are LSC, LPL, SC followed by TL and HL and those which most contribute to the formation of PC2 are Spa, LT, SCS, followed by LB, SSu and NFI. In the other side, characters which have a low loading in accessions distinction are KCP and LB for PC1 and KCP and LM for PC2. The strongest positive correlation was found between SC and LPL ( $r = 1.00$ ) and the strongest



**Fig. 4** Principal Component Analysis of 67 morphological characters

negative one was obtained between LPL and LSC, SC and LSC with  $r = -1.00$  ( $p < 0.05$ ).

Data correction and bioclimate definition

The results of correction of the pluviometric and temperature data and calculation of Q2 were used to define the bioclimate of each site using Emberger climagramm. All results are shown in Table 4.

There is a large difference between taxa in the range of latitudes, longitudes and altitudes from which they were collected (Table 1). All accessions occur between the latitudes of 34.52° and 36.49°N. Accessions 15, 61, 14, 35, 33 and 38 occur in the greatest range, and are the most northerly of the taxa occurring north. Accession 57 occurs the furthest south to latitude of 34.52°N at Tlemcen. *V. sativa* subsp. *consobrina* was collected in different sites with altitudes comprised between 1 and 880 m, belonging to four different bioclimates (SH, HI, SAS, SAM). *V. sativa* subsp. *obovata* was collected from different stations with altitudes comprised between 38 and 866 m and five different bioclimates (SAS, SH, SAM, SAI, HI). The unique accession of *V. sativa* subsp. *angustifolia* used in the present study was collected from a station belonging to SAS with an altitude of 562 m. *V. sativa* subsp. *cordata* was collected from stations with altitudes between 14 and 847 m and 6 different bioclimates (AS, SAI, SH, SA, HI, SAS).

Precipitation of all stations was between 296.99 and 1194.3 mm. The average of the minimum of the coldest month within these altitudes is ranged from 1.36 °C (cool winter) to 8.70 °C (warm winter).

Cluster analysis based on ecogeographic parameters

The relationships between these subspecies, based on the variation in ecogeographic parameters are shown by the dendrogram illustrated in Fig. 5.

At the distance of 666.71, the dendrogram can be divided in two major clusters (I, II). The cluster I is divided in two sub-clusters. The subcluster Ia ( $d = 190.63$ ) comprises 9 accessions (6-17-19-32-47-8-10-51-13) belonging to 3 different bioclimates (HSA-HA-MSA). The subcluster Ib contains 7 accessions (20-22-42-86-57-72-80) at the distance of 196.19. These accessions were collected from 4 different bioclimates (LSA-MSA-HSA-SH). At a distance of 483.94, the cluster II can be divided into four subclusters: IIa ( $d = 173.79$ ) with 4 accessions (28-59-38-93) all collected from LH bioclimate, IIb which comprises the accession 11 belonging to HA bioclimate ( $d = 447.61$ ), IIc contains 7 accessions (14, 35, 15, 61, 33, 36, 64) at a distance of 171.09 belonging to SH and LH. Finally, the subcluster IId ( $d = 323.60$ ) comprises 6 accessions (5, 7, 37, 52, 68, 65a) with the 4 bioclimates (SH-SA-MSA-LH).

The similarity matrix of all pairs of populations is shown in Fig. 6. Remember that the greatest distance obtained by morphology was observed between 17 (HSA, 563 m) which forms a separate cluster one side and 47 (HSA, 604 m) the other side. In parallel, the lowest distance obtained for morphology was between 8 (HA, 467 m) and 47 (HSA, 604 m). The same conclusion can be given for accessions 80 (HSA) and 93 (LH) and accessions 13 (HA) and 33 (SH). Samples 14 and 15 which have high homolgy level were collected from a site with the same bioclimate SH. Another example may be given concerning accessions 13 (HA, Alt. 584) and 33 (SH, Alt. 26 m) belonging to the same subspecies with a high morphology level and different ecogeographic parameters. Also, the dendrogram placed them in different groups and subgroups with  $d = 759$ . Accessions 10 (Constantine Alt. 468 m) and 51 (Sidi Bel Abbes Alt. 490 m) belonging to the same subspecies and to the same bioclimate (MSA) have a low distance ( $d = 27$ ) and are sister

**Table 4** Corrected data of climatic characteristics and calculation of Emberger quotient of sampling sites of *V. sativa* s.l. in Algeria

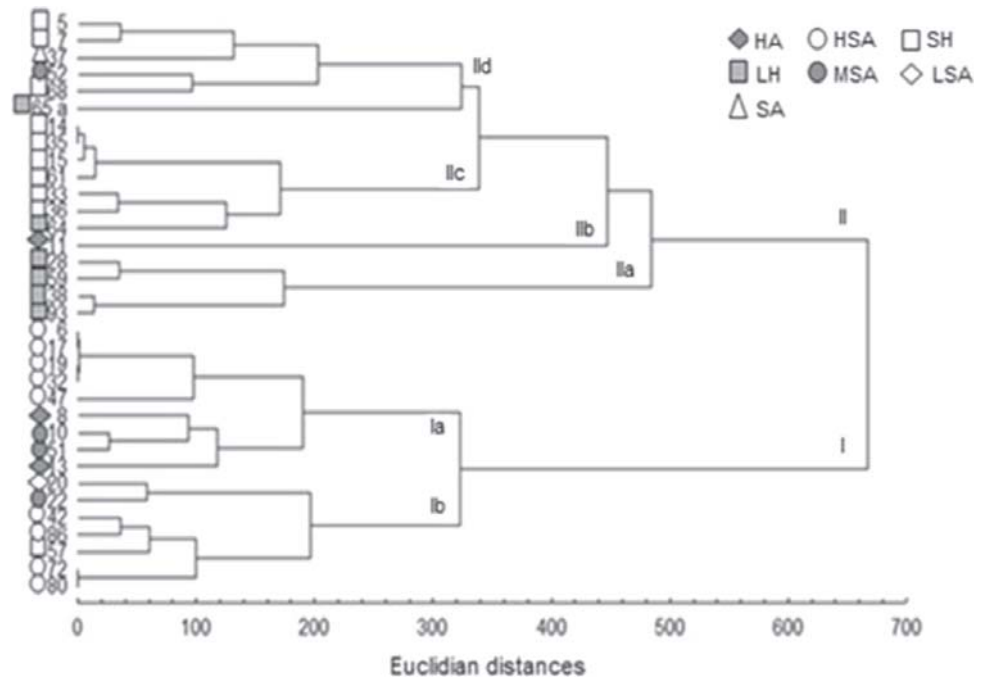
Station code	Alt. (m)	K	P (mm)	m (°C)	M (°C)	Q2	Bioclimate
5	339	1.0719	667.04	4.05	35.71	72.25	SH—temperate winter
14	28	1.0292	704.38	6.6	31.32	97.71	SH—mild winter
36	1	0.9990	832.16	7.40	30.70	122.48	SH—warm winter
59	141	1.0998	1172.49	6.26	30.56	165.49	LH—mild winter
64	111	1.1051	916.12	8.36	28.93	152.73	LH—warm winter
86	880	1.1537	561.39	1.45	33.89	59.35	HSA—cool winter
65 a	345	1.4095	889.39	7.10	28.53	142.34	LH—warm winter
52	249	0.4720	432.35	3.93	36.96	44.90	MSA—temperate winter
93	25	1.0127	1079.63	6.73	31.38	150.23	LH—mild winter
6	563	1.1068	538.56	2.72	36.11	55.32	HSA—cool winter
7	325	0.9396	697.18	4.84	32.28	87.16	SH—mild winter
10	468	0.8150	396.57	3.1	36.77	40.39	MSA—temperate winter
17	563	1.1068	538.56	2.72	36.11	55.32	HSA—cool winter
20	866	0.8596	345.38	1.43	35.78	34.48	LSA—cool winter
22	822	0.9346	383.55	1.36	33.40	39.38	MSA—cool winter
28	168	1.1200	1194.03	6.16	30.38	169.09	LH—mild winter
32	562	1.1076	538.95	2.72	36.11	55.35	HSA—cool winter
51	490	1.0159	381.06	2.74	35.89	39.42	MSA—cool winter
57	867	1.6903	608.16	3.71	29.55	80.73	SH—temperate winter
61	38	1.0409	712.39	6.56	31.25	98.94	SH—cool winter
68	281	1.0379	503.38	6.61	29.87	74.22	SH—mild winter
72	782	1.0731	522.17	1.84	34.57	54.71	HSA—cool winter
80	782	1.0731	522.17	1.84	34.57	54.71	HSA—cool winter
19	562	1.1076	538.95	2.72	36.11	55.35	HSA—cool winter
8	467	2.0769	296.99	5.36	38.60	30.64	HA—mild winter
11	90	0.8265	297.37	6.82	34.99	36.21	HA—mild winter
13	584	2.4041	343.78	4.89	37.78	35.84	HA—mild winter
15	24	1.0245	701.16	6.61	31.35	97.22	SH—mild winter
33	26	1.0231	848.14	8.70	29.53	139.67	SH—warm winter
35	28	1.0292	704.38	6.6	31.32	97.71	SH—mild winter
37	223	1.0025	611.62	4.51	36.52	65.53	SA—mild winter
38	14	1.0045	1070.9	6.77	31.45	148.82	LH—mild winter
42	847	1.1265	548.15	1.58	34.12	57.78	HSA—cool winter
47	604	0.9268	450.98	2.55	35.82	46.49	HSA—cool winter

*K* correction factor, *Alt* altitude, *P* annual rainfall, *M* and *m* the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively, *Q2* Emberger coefficient, *SH* subhumid, *SA* semiarid, *LH* less humid, *HSA* higher semiarid, *HA* higher arid, *MSA* means semiarid, *LSA* less semiarid

accessions in the dendrogram, whereas, they present a high morphology differences level. Accessions 6 and 19 belonging to different subspecies have a very low distance ( $d = 1$ ) because they were collected from the same site, separated by one meter in term of altitude. Accessions 93 (Alt. 25 m) and 38 (Alt. 14 m), with a distance of  $d = 14$ , belong to different subspecies and

have the same bioclimate (LH). Samples 38 and 42 belonging to the same subspecies have a high distance (988) and were placed in different subclusters (IIa and Ib, respectively), they have two different bioclimates (LH and HSA respectively) and present an important altitudinal differences (14 and 847 m respectively). The accession 37 (*V. sativa* subsp. *cordata*, 223 m,

**Fig. 5** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on ecogeographic diversity of 34 *V. sativa* s.l. accessions



5	6	7	8	10	11	13	14	15	17	19	20	22	28	32	33	35	36	37	38	42	47	51	52	57	59	61	64	65a	68	72	80	86	93	
0	259	37	394	301	447	407	314	318	259	258	619	561	562	258	368	314	380	129	524	522	343	325	253	531	551	306	347	233	176	466	466	551	524	5
	0	288	261	171	531	197	562	565	0	1	360	302	774	1	626	562	638	348	770	284	97	174	332	313	770	555	597	422	268	220	220	318	769	6
		0	428	336	467	441	297	301	288	287	647	590	527	287	339	287	353	135	490	544	374	360	279	549	516	288	313	201	189	490	490	572	490	7
			0	100	377	126	603	603	261	261	402	386	956	261	714	603	716	400	905	456	207	88	257	509	944	601	725	615	287	388	388	491	907	8
				0	391	128	540	541	171	171	401	354	862	171	640	540	644	327	820	409	147	27	222	453	851	537	640	518	224	339	339	444	822	10
					0	496	416	414	531	531	778	737	910	531	564	416	549	343	785	798	537	409	209	838	896	423	630	653	288	728	728	833	793	11
						0	666	667	197	197	282	241	956	197	759	666	765	450	931	334	110	101	347	390	949	662	752	605	349	267	267	368	931	13
							0	5	562	561	914	858	514	561	150	0	133	218	370	835	631	567	354	845	486	13	234	370	323	777	777	865	379	14
								0	565	564	916	861	518	564	153	5	135	221	373	838	634	568	354	848	490	18	238	375	324	780	780	868	382	15
									0	1	360	302	774	1	626	562	638	348	770	284	97	174	332	313	770	555	597	422	288	220	220	318	769	17
										0	361	303	773	0	625	561	637	347	769	285	98	174	331	314	769	554	596	421	287	221	221	319	768	19
											0	59	1107	361	985	914	996	697	1125	205	283	378	623	267	1108	908	954	761	610	197	197	218	1122	20
												0	1050	303	927	858	939	641	1066	168	228	332	575	233	1050	852	896	703	558	145	145	188	1064	22
													0	773	375	514	401	594	198	944	870	884	776	916	35	504	284	353	703	917	917	959	184	28
														0	625	561	637	347	769	285	98	174	331	314	769	554	596	421	287	221	221	319	768	32
															0	150	34	217	223	878	708	688	481	877	345	142	110	322	431	828	828	904	232	33
																0	133	218	370	835	631	567	354	845	486	13	234	370	323	777	777	865	379	35
																	0	318	241	895	717	670	477	895	371	128	112	349	432	843	843	922	250	36
																		0	511	627	414	354	182	644	576	213	336	313	128	586	586	659	515	37
																			0	988	862	845	688	973	163	363	183	378	629	949	949	1009	14	38
																				0	262	395	609	67	949	827	828	612	569	70	70	36	983	42
																				0	134	355	308	866	626	686	518	332	192	192	238	861	47	
																				0	246	442	874	564	665	639	250	325	325	430	846	51		
																				0	644	758	395	515	477	86	541	541	644	693	52			
																				0	923	836	820	696	696	124	124	124	53	968	57			
																				0	476	258	350	687	920	920	920	965	149	59				
																				0	223	357	321	769	769	769	856	371	61					
																				0	236	449	784	784	784	852	185	64						
																				0	393	578	578	633	372	65a								
																				0	504	504	603	632	68									
																				0	106	945	72											
																				0	106	945	80											
																				0	1004	86												
																				0		93												

**Fig. 6** Similarity matrix of ecogeographic parameters

subcluster IId) is the only sample belonging to SA bioclimate and has a distance of 128 with accession 68 (*V. sativa* subsp. *obovata*, subcluster IId) and a distance of 659 with 86 (*V. sativa* subsp. *consobrina*, subcluster Ib). The accession 20 (*V. sativa* subsp. *obovata*, Alt. 866 m) is the only one belonging to LSA bioclimate. It is a sister taxa with the accession 22 (*V. sativa* subsp. *obovata*) belonging to MSA bioclimate.

Correlation between morphology and ecogeography

Correlation between the two Euclidean distance matrices of morphological characters (matrix A) and ecogeographic parameters (matrix B) was carried out with Mantel test based on Pearson's correlation. The *p* value was calculated from the distribution of r(AB)



using 10,000 permutations. This test showed a correlation of 44.89 % between morphology and ecogeography ( $r = -0.026$ ,  $p = 0.555$ ,  $\alpha = 0.05$ ).

## Discussion

### Morphological characters

The current study is the first work using 78 morphological characters to study diversity of *V. sativa* s.l. in Algeria. In the present results, some accessions classified in the same subspecies by Quézel and Santa (1962) present a high homology level in morphological characters demonstrated by a low distance in the similarity matrix and by the dendrogram which places them in the same clade. In the other side, there are accessions classified by the same key in the same subspecies and have significant differences in morphological characters shown by great distances in the similarity matrix. They are also placed in different clades in the dendrogram. Some accessions were classified by Quézel and Santa (1962) in the subspecies *V. sativa* subsp. *consobrina* using leaflets pubescence and legume colour, when the utilization of the 78 characters of current study places them in different clusters and subclusters. In parallel, some accessions presenting low distances are classified in different subspecies by authors cited above according to pubescence of leaflets and colour of legume which is brown for *V. sativa* subsp. *consobrina* and by glabrescence and colour of legume which is black for *V. sativa* subsp. *cordata*. Leaflets obovate wedge and absence of tendrils in lower leaves are also used. Some accessions confirm the view of Quézel and Santa (1962) who delimited them in a separate subspecies using the number of flowers, flower length, seed size, leaflets pubescence and legume colour. The morphological resemblances which led Quézel and Santa (1962) to place some accessions in the same subspecies are not correlated with the data of morphological characters used in our study showing by conflicting results between accessions of the same subspecies. There are accessions which appear to belong to the same subspecies on the basis of few characters while they not have a lot of common characteristics, demonstrating that their morphology is intermediate between taxa.

Our results have demonstrated that in the *V. sativa* complex using morphological characters alone do not

produce a stable grouping. The UPGMA clustering method gives different results, although similarities can be observed. These results concord with a lot of studies where several markers have been used to assess the diversity of *V. sativa* L. and to systematize it at the infrageneric level (Potokina et al. 2000; Van de Wouw et al. 2001, 2003). Some authors associate groups of populations with the organisation reflected in dendrograms, while others make no such connections. Studies using DNA fingerprinting techniques based on RAPD (Potokina et al. 2000) and AFLP (Van de Wouw et al. 2001) do not confirm closer relationships, but show that all taxa are more or less equally distant from each other. A close relationship between the taxa can also be seen in our results; when it is difficult to determine distinct groups which could be individually identified as *consobrina*, *cordata* or as *obovata*. Discrepancies emerging between the phylogenetic trees may indicate the possible phylogenetic instability of these taxa as indicated by Leht (2009). Several authors concluded on the basis of morphological data that there are accessions more closely related to each other than the other taxa (Metten and Hanelt 1964; Potokina 1997). Also, the phylogenetic tree as found in this study has several accessions all belonging to the same clade and there is some evidence that some taxa are more similar to each other than to the other taxa in the complex (Fig. 2) and the phylogenetic analysis treat them as sister taxa. Several authors support that these taxa may be useful in plant breeding programmes and many intertaxon crosses have been performed within the *sativa* aggregate (Metten and Hanelt 1964; Yamamoto and Plitmann 1980).

Variability in members of *V. sativa* morphology, karyology and ecology renders them difficult to classify and several taxonomic classifications have been proposed for them. Taxonomists disagree about the rank and number of taxa belonging to the *V. sativa* complex. While some authors consider the whole aggregate as a single species (*V. sativa* L.) containing a group of taxa considered as subspecies or varieties (Ball 1968; Maxted 1995; Van de Wouw et al. 2003), others argue that the group consists of several species (Metten and Hanelt 1964; Potokina 1997). From a molecular taxonomic viewpoint, *V. sativa* is an aggregate that comprises several polymorphic annual autogamous taxa in a dynamic evolution. It is considered to be either a separate species or a single species (*V. sativa* sensu lato) with subspecies and varieties

(Potokina et al. 2000). Be they species or subspecies, there is no clear morphological distinction between some of these taxa, because the characters commonly used for their identification overlap considerably. Outcrossing could also be a source of variation in *V. sativa* as indicated by Hanelt and Mettin (1989). This makes the comparison of results obtained by different authors difficult as in effect they each define the taxa differently. Two accessions (17 and 51) were found to be outliers using morphological differences. These accessions which appear more closely related to the taxa of the *V. sativa* subsp. *obovata* than the three other subspecies, are clearly separated from the taxa of the complex and should not be considered to be part of the complex. The accession 17 which forms the cluster I presents lot of different morphological characters compared with the other accessions belonging to the same subspecies, whereas, the key provided by Quézel and Santa (1962) classifies it in the subspecies *V. sativa* subsp. *obovata* using seed morphology. For the qualitative character, colouring of the flowers, the white standard without pattern was found for the accessions 17. This rare variante may be ignored in a phylogenetic analysis as proposed by Stevens (1991). Van de Wouw et al. (2001) have suggested that the outliers are most likely the products of mutations or hybridisation between taxa. On the basis of one accession, the recognition of a separate taxon is not justified, since it might be a mutant or hybrid form. However, if more accessions with this character combination are found, this position will need to be reviewed.

PCA is to be recommended as available starting-point for any further research into this group of taxa. Our results demonstrated that several characters can be identified which appear to contribute most to the clustering of the different groups. The most important characters that separate the accessions within the *V. sativa* are both quantitative (LPL–TL–HL–LB–NFI) and qualitative (LSC–SC–Spa–LT–SCS–LB–SSu). Even for the characters that contribute most to the separation of the accessions, the range of variation does show overlap between the subspecies. Characters which contribute very little or not at all (LAD–LMH–SSh–TB–SP–LSf–LBSh–LSf) to the distinction of the accessions in the *V. sativa* complex are mostly qualitative. According to recommendations of Van de Wouw et al. (2003), quantitative characters are essential at this taxonomic level, since there are very

few qualitative characters that differ between the taxa. This is why several quantitative and polymorphic characters were included in the present study.

Leaf and stem characters were measured at the first productive node. Leaflets were also measured at the lower part of the stems, so that heterophylly, an indicator of the difference in leaf shape at the bottom and the top of the plant, which has been used by Tardío Pato et al. (1998). Concerning flower length, points in variation to separate the taxa varied in several studies (Mettin and Hanelt 1964; Ball 1968; Romero Zarco 1999), but a general consensus can be distilled for the length of the standard and most authors have used a cut off point in between 14 and 19 mm, also with overlap reported in this region. For seed size, this character not contributes to accession variability of *V. sativa* L. also demonstrated by low correlation (0.003546) in the PCA. Calyx hairiness doesn't give any clear distinction between subspecies. The three states for calyx hairiness and the two states for calyx hair density (Table 2) are obtained for all subspecies. The pattern of this character as found in the current study doesn't follow the description of Mettin and Hanelt (1964), with subsp. *nigra* in general possessing hairier calyces than the other subspecies. PCA shows that morphological characters which strongly contribute in accessions distinction concern characters of leaflets, tendril, flower, legume, seed and stipules, showing the importance of each part of the plant in accession distinction. Bozkurt et al. (2013) reported that the species show considerable variations in almost every trait of the plant.

#### Ecogeographic variability

The aim of this study was to collect geographic and ecological data from investigated sites of *V. sativa* s.l. The distribution maps will be used to formulate conservation policy and specifically in the planning of collecting missions. Analysis of the passport data does not result in a definitive guide to each subspecies ecogeography and can not be used to pin exactly where a particular taxa will be found, but will elucidate each taxons geographic and ecological location. If particular taxa are required, their specific ecogeographic requirements can be targeted. According to Maxted et al. (1995), the results of an ecogeographic survey help clarification of the priorities and the appropriate strategy that should be applied to conserve the target

genepool as a whole. This will naturally lead into more effective exploitation and utilization of the taxa in the complex. The utilisation of Global Positioning Systems in the current work meets the recommendations of Bennett and Maxted (1997) who support that an increasing knowledge of the importance of collecting complementary detailed ecogeographic data, combined with an increase in the use of GPS, will improve the degree of confidence that can be placed in ecogeographic studies.

According to (Hanelt and Mettin 1989), the ecology of *Vicia* species varies greatly, but they obviously do not tolerate extreme environmental conditions. Whereas, Francis et al. (2000) report that *V. sativa* has good adaption to adverse environmental conditions. Sites collect of the present study were characterized by favourable weather, thus providing optimal conditions for the growth and development of the tested accessions. Precipitation was above the defined limits for common vetch of 200 and 500 mm reported by Papastylianou (1995). According to Rihawi et al. (2010), common vetch is a cool season legume in Mediterranean environments where average annual rainfall ranges from 250 to 350 mm. Considering all stations of the current work, *V. sativa* L. occurs from sea level to 880 m. This is consistent with the findings of Maxted (1995) who reported that *V. sativa* L. occurs at altitude between 1 and 2900 m. Algeria has all the Mediterranean bioclimates from the perhumid in the north to the perarid in the south for the bioclimatic levels and from the cold to the hot for their temperature variants. Sites investigated belong to 7 different bioclimates (SH, HI, SAS, SAM, SA, AS, SAI) and are characterized by cool, wild, warm or tempered winter with a minimum average temperature of 1.36 °C. It is interesting to mention that it is from  $m = 1$  and not  $m = 0$ , as the risk of frost become important (Le-Houerou 1969). If the distribution of accessions continued to higher altitudes in North Algeria, then they would be required to contain some degree of frost tolerance. The patterns described in this study are not necessarily a true indication of the preferred altitude of each taxa but may reflect the number of accessions that occurred at each altitude. According to Bennett and Maxted (1997), some clarifications to the differences are clearly necessary but until collections are made with detailed soil and habitat types, a complete picture of a taxons ecogeography can not be determined.

Cluster analysis shows that accessions with high morphology differences and belonging to different subspecies can have an identical bioclimate and close altitudes as in the case of accessions 17 and 47. In parallel, there are accessions with high homology level which belong to the same bioclimate. Accessions 14 and 15 are a good exemple in this case. Two accessions belonging to the same subspecies with high homology level may belong to different bioclimates as in the case of 80 and 93 or 13 and 33. Cluster analysis also confirms that the groups can sometimes comprise accessions with close geographic origin as for 28 and 59. The same findings were done by Potokina et al. (2002). High distances are obtained between accessions belonging to the same subspecies as in the case of 20 and 28 or 93 and 86. On the other hand, the groups may comprise accessions from similar latitudes and climates. The same findings were done by Van de Wouw et al. (2003). The dendrogram obtained with ecogeographic parameters did not indicate clear division among accessions based on their geographical locations. Chung et al. (2013) reported a cluster analysis of *V. sativa* subsp. *sativa* in which there was no clear clustering pattern of geographically closer accessions, indicating that the association between genetic similarity and geographical distance was less significant. A correlation of 44.89 % is obtained between morphology and ecogeography. However, it is necessary to use a larger number of accessions from each geographical location to confirm the available pattern.

## Conclusion

A great variation was detected in the studied collection. The characterization of *V. sativa* s.l. via its morphological and ecogeographical descriptors is difficult due to the existence of continuous variation. The present data indicates that *V. sativa* L. may be a convenient assemblage of subspecies with considerable heterogeneity. The diversity present in the collection needs to be characterised and evaluated in detail by using both molecular and agro-morphological techniques for ex situ conservation to broaden the genetic base available for plant breeding. Further information on similarities in the karyotype and hybridisation experiments could clarify the relations between the taxa. Associated with the need for fresh collections, is the necessity to be able to identify the

wild material in the field. There is a need for more user multi-access keys for *Vicia* and the emergency to establish a new one for Algeria. As a consequence of climate change, the area of land receiving low rainfall in the Mediterranean region is increasing. The great variation detected in the studied collection suggests that, following selection and domestication, this collection could be very important as forage crops in areas with low rainfall.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

### References

- Ball PW (1968) *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) Flora europaea, vol 2., Rosaceae to Umbelliferae. Cambridge University Press, Cambridge, pp 129–136
- Bennett SJ, Maxted N (1997) An ecogeographic analysis of the *Vicia narbonensis* complex. Genet Resour Crop Evol 44:411–428
- Bozkurt M, Ertugrul K, Uysal T (2013) The determination of genetic relationships among some *Vicia* L. (Vetch) taxa by using ISSR markers. BioDiCon 6/3:135–139
- Caballero R, Goicoechea EL, Hernaiz PJ (1995) Forage yields and quality of common vetch and oat sown at varying seeding ratios and seeding rates of common vetch. Field Crops Res 41:135–140
- Chung JW, Kim TS, Suresh S, Lee SY, Cho GT (2013) Development of 65 novel polymorphic cDNA-SSR markers in common vetch (*Vicia sativa* subsp. *sativa*). Molecules 18(7):8376–8392
- Emberger L (1955) Une classification biogéographique des climats. Rev Trav Lab Geol Bot Zool Fac Sc Montpellier 7:1–43
- Enneking D (1995) The toxicity of *Vicia* species and their utilization as grain legumes. Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (CLIMA) Occasional Publication 6, Nedlands
- Francis GM, Enneking D, Abd El Moneim AM (2000) When and where will vetches have an impact as grain legumes? Lini'ng research and marketing opportunities for pulses in the twenty first century. In: Knight R (ed) Proceedings of the third international food legume research conference, Adelaide 1997 (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture), Kluwer, London, pp 375–384
- Gunn CR (1979) Genus *Vicia* with notes about tribe *Vicieae* (*Fabaceae*) in Mexico and Central America. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1601
- Hanelt P, Mettin D (1989) Biosystematics of the genus *Vicia* L. (*Leguminosae*) Annu Rev Ecol Syst 20:199–223
- Hollings E, Stace CA (1974) Karyotype variation and evolution in the *Vicia sativa* aggregate. New Phytol 73:195–208
- Hueze V, Tran G, Baumont R (2011) Common vetch (*Vicia sativa*). Feedipedia 12:53–62
- Kupicha FK (1976) The infrageneric structure of *Vicia*. Notes Roy Bot Gard Edinb 34:287–326
- Le-Houerou HN (1969) La végétation de la Tunisie steppique. Ann Inst Natl Rech Agron Tunis 42(5):624
- Leht M (2009) Phylogenetics of *Vicia* (*Fabaceae*) based on morphological data. Feddes Rept 120(7–8):379–393
- Mantel N (1967) Adaptation of Karber's method for estimating the exponential parameter from quantal data, and its relationship to birth, death, and branching processes. Biometrics 23:739–746
- Maxted N (1995) An ecogeographical study of *Vicia* subgenus *Vicia*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 8, International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Maxted N, Van Slageren MW, Rihan J (1995) Ecogeographic surveys. In: Guarino L, Rao VR, Reid R (eds) Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. CAB International, Wallingford, pp 255–286
- Mettin D, Hanelt P (1964) Cytosystematische Untersuchungen in der Artengruppe um *Vicia sativa* L. Kulturpflanze 12:163–225
- Nikiforova OD (1988) Wild vetches of Siberia. Nauka, Novosibirsk (in Russian)
- Papastylianou I (1995) Effect of rainfall and temperature on yield of *Vicia sativa* under rainfed Mediterranean conditions. Grass Forage Sci 50:456–460
- Papastylianou I (2004) Effect of rotation system and N fertilizer on barley and common vetch grown in various crop combinations and cycle lengths. J Agric Sci 142:41–48
- Pavlova NS (1989) *Vicia* L. Plantae vasculares orientis extremi Sovietici, vol 4. Nauka, Leningrad, pp 293–309 (in Russian)
- Potokina EK (1997) *Vicia sativa* L. aggregate (*Fabaceae*) in the flora of former USSR. Genet Resour Crop Evol 44:199–209
- Potokina EK, Vaughan DA, Eggi EE, Tomooka N (2000) Population diversity of the *Vicia sativa* aggregate (*Fabaceae*) in the flora of the former USSR deduced from RAPD and seed protein analyses. Genet Resour Crop Evol 47:171–183
- Potokina E, Blattner RF, Alexandrova T, Bachmann K (2002) AFLP diversity in the common vetch (*Vicia sativa* L.) on the world scale. Theor Appl Genet 105:58–67
- Quézel P, Santa S (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome 1. Editions du centre national de la recherche scientifique, Paris, pp 524–531
- Rasulova MR, Kamirova VV (1978) *Vicia*. In: Ovtshchikov PN (ed) Flora of Tadjik SSR, vol 5. Nauka, Leningrad, pp 568–569 (in Russian)
- Rihawi S, Iniguez L, Knaus WF, Zaklouta M, Wurzinger M, Soelkner J et al (2010) Fattening performance of lambs of different Awassi genotypes fed under cost-reducing diets and contrasting housing conditions. Small Rumin Res 94:38–44
- Robertson LD, Singh KB, Erskine W, Abd El Moneim AM (1996) Useful genetic diversity in germplasm collections of food and forage legumes from West Asia and North Africa. Genet Resour Crop Evol 43:447–460
- Romero Zarco C (1999) *Vicia* L. In: Castroviejo S (ed) Flora Iberica: plantas vasculares de la península Iberica e islas baleares. Real Jardín Botánico, Madrid, pp 360–417
- Seltzer P (1946) Le climat de l'Algérie. Alger, Carbonel 219 p
- Stevens PF (1991) Character states, morphological variation and phylogenetic analysis: a review. Syst Bot 16:553–583

- Stewart P (1969) Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Bull Soc Hist Nat Afr Nord* 65:1–2
- Tamamschjan SG (1962) Genus *Vicia* L. In: Takhtajan AL (ed) *Flora of Armenia*, vol 4. Armenian Academy of Sciences, Yerevan, pp 275–299 (in Russian)
- Tamayunova AP (1961) *Vicia* L. In: Pavlov NV (ed) *Flora of Kazhak*, vol 5. Kazhak Academy of Sciences, Alma-Ata, pp 453–469 (in Russian)
- Tardio Pato FJ, Garcia Gonzalo P, Ortiz Marcide JM (1998) Observaciones cariologicasen *Vicia amphicarpa* sensu lato. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56:261–268
- Van De Wouw M, Maxted N, Chabane K, Ford-Lloyd BV (2001) Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on amplified fragment length polymorphisms. *Plant Syst Evol* 229:95–105
- Van de Wouw M, Maxted N, Bria Fordlioyd BV (2003) Agromorphological characterisation of common vetch and its close relatives. *Euphytica* 130(2):281–292
- Yamamoto K, Plitmann U (1980) Isozyme polymorphism in species of the genus *Vicia* (*Leguminosae*). *Jpn J Genet* 55:151–164
- Zohary M (1972) *Vicia* L. *Flora Palestina*, Part 2. Israel Academy of Science, Jerusalem, pp 194–209

# Characterization of 7 *Vicia* L. taxa (Fabaceae) from Algeria based on evidence from morphology and ecogeography

Sakina BECHKRI and Douadi KHELIFI\*

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université des Frères MENTOURI 25000 Constantine. Algérie  
s.bechkri@gmail.com ; dkhelifi@yahoo.fr (\* corresponding author)

**Summary.** Variation of 78 multistate morphological plant characters and 5 ecogeographic parameters among 37 accessions belonging to 7 taxa (*V. monantha* subsp. *calcarata*, *V. monantha* subsp. *cinerea*, *V. lutea* subsp. *eu-lutea*, *V. lutea* subsp. *vestita*, *V. narbonensis*, *V. tenuifolia*, *V. leucantha*) of the genus *Vicia* L. from Algeria is described with the aim to improve their conservation and management. The results reflect the great diversity of vetches and cluster analysis showed clear separation among accessions. Species were clearly recognizable from their plant morphology but significant differences at subspecies level were observed regarding the results of investigated morphological traits. Important diversity in leaflet consistence, calyx hairness, stem form, Leaflet abaxial hair density, leaflet hair elevation, seed colour, spongy inside legume and peduncle length was found in most accessions of the collection, when 6 morphological characters were excluded as they are identical between all populations. The dendrogram obtained with ecogeographic parameters did not indicate clear division among accessions. A distribution map of each taxa was produced and data obtained can be used as a guide for future collecting missions.

**Key words:** Algeria, diversity, ecogeography, morphology, *Vicia* L.

## Introduction

The genus *Vicia* L. is distributed mainly throughout temperate zones of the northern hemisphere and in the south of extratropical America. It is reported that the Mediterranean region represents a centre of variability of the genus. Species have many profitable uses such as forage (Maxted 1994), nitrogen-fixing organisms, cover crops for saline soils (Maxted and Douglas 1997), animal feed (Kupicha 1976; Enneking 1995) and occasionally human nutrition (Frediani *et al.* 2005). The forage is often grown for hay in mixtures with cereal tutor crops. Among the species which occur as weeds in agricultural field are *V. lutea* L. and *V. narbonensis*. The latter is a leguminous species with the potential to become an important grain and straw crop for animal

feed in dry temperate areas. It has been shown to produce a high yield, the seeds contain a high protein content (Abd El Moneim, 1992).

The field examination of growing plants was widely used in order to classify unknown *Vicia* samples. However, the taxonomy and nomenclature of *Vicia* species are very confused. The number of species recognized in the genus has varied significantly from about 150 accepted by Kupicha (1976) up to about 210 used by Hanelt and Mettin (1989), which indicates differences in species delimitation and ranking in the genus, depending on the species concept and the criteria used for their delimitation. Maxted (1993) pointed out that there had been 20 major classifications of the group since Linnaeus. These problems have, at least partially, resulted from the publication of national or regional floristic accounts, but also because of the conflicting results produced by morphological and other studies, notably cytological and molecular investigations (Hanelt and Mettin 1989; Maxted *et al.* 1991b). Many characters vary considerably within the genus, but few prove useful for infrageneric grouping. Among these are characters of the morphology of the inflorescence, the flower, the leaf, the pod and the seed. Several not greatly different classifications were proposed for the genus on the basis of the above-mentioned character differentiations (Hanelt and Mettin 1989). The genus has been subdivided into four sections (*Ervum*, *Cracca*, *Vicia*, *Faba*) by Ball (1968). Kupicha (1976) has subdivided the genus into two subgenera (*Vicilla*, *Vicia*) which can be distinguished using stipule nectary, peduncle length, style type, keel shape, legume and canavanine. Subgenera *Vicilla* and *Vicia* have been further subdivided into 17 and 5 sections, respectively. The subgenus *Vicia* sensu Maxted (1993a) contains 9 sections including section *Hypechusa* composed of 14 species (incl. *V. lutea*) and section *Narbonensis* which comprises 7 species (incl. *V. narbonensis*). Potokina *et al.* (1999) indicated that *Narbonensis* should be considered a well-separated section which may be related to section *Vicia*. Moreover, Leht (2009) showed that *V. faba* clustered in the *Narbonensis* group with good support and treated the group as section *Narbonensis*. Section *Hypechusa* (subgenus *Vicia*) is based on the genus *Hypechusa* created by Alefeld (1860) who separated into it six *Vicia* species. *Hypechusa* is also treated as section by Kupicha (1976) and Maxted (1993). *V. lutea* was treated in a separate series *Luteae* B. Fedtch. by Fedtchenko (1948) and Radzhi (1970). The isozyme evidence provides further support to this treatment, even suggesting sectional status for *Luteae*. According to Jaaska and Leht (2007) and to Nouzova *et al.* (2000), *V. lutea* differs distinctly from the other *Hypechusa* species by showing no cross-hybridization of genomic DNAs. Caputo *et al.* (2006) placed *V. lutea* separately from a clade of series *Hypechusa*. The subgenus name *Cracca* (Dum.) Gams was rejected by Kupicha (1976) because it was published later than the subgenera proposed by

Rouy in 1899: *Vicilla*, *Ervoidea* and *Pseudoervoidea*. Tzvelev (1989) has applied *Cracca* Peterm. as a correct name of the subgenus (published in 1847: *Deutschl. Fl.*, 152). Section *Cracca* sensu Kupicha (1976) belongs to Subgenus *Vicilla* and is composed of 40 species including *V. monantha*, *V. tenuifolia*, *V. leucantha*.

In the case of the *Vicia* species, only a relatively minor proportion of the genepool is currently conserved and therefore available for utilisation. There is a clear requirement for further study of the genepool, accurately targeted conservation (particularly seed collection), along with characterisation and evaluation of the currently unavailable elements of the genepool. The first step towards more efficient conservation is to undertake an ecogeographic study (Maxted *et al.*, 1996). The distribution maps will be used to formulate conservation policy and specifically in the planning of future *ex situ* collecting missions.

In Algeria, the genus *Vicia* L. comprises 26 species according to the key used by Quézel and Santa (1962) in the unique flora covering the entire country. Using the relative length of the flower, the presence or the absence of the peduncle and the number of flowers by inflorescence, the authors divided the genus into three series where *V. narbonensis* and *V. lutea* belong to the serie 1, *V. monantha* and *V. tenuifolia* are grouped in the serie 2 and *V. leucantha* belong to the serie 3. Since Quézel and Santa (1962), no work has been undertaken to study the genus in Algeria. As the characterization of plant genetic resources is the first step towards improving their use and as effective exploitation of any crop germplasm must be preceded by efficient and comprehensive conservation of the genepool, whether *ex situ* or *in situ*, the purpose of the present work was to study the diversity of some *Vicia* L. taxa from Algeria on both an inter and intraspecific levels and evaluate species groupings and relationships in the genus. The paper is the second in a serie on *Vicia* L. species and describes variation of 78 morphological traits and 5 ecogeographic parameters among 7 *Vicia* taxa belonging to sections *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Cracca* to improve the resolution of phylogenetic relationships and to assess the usefulness of plant morphology as diagnostic characters to discriminate vetch species and sections.

## **Material and methods**

### **Plant material and taxa identification**

Thirty-seven populations of *Vicia* L. collected from their natural habitats in various bioclimatic conditions of north Algeria are used in the current study. Origins and field information are given in Table I. Localities of the studies taxa were shown in Figure I. Individual plants of 4 *V. lutea* subsp. *vestita* (Boiss.) Rouy., 5 *V. lutea* subsp. *eu-lutea* Maire, 16 *V. monantha* subsp. *calcarata* (Desf.) Maire, 3 *V. monantha* subsp. *cinerea* (M.B.) Maire, 5 *V. narbonensis* L., 3 *V. tenuifolia* Roth. and 1 *V. leucantha* Biv. were randomly collected in each sampling site. Pods were shelled



and the dry seeds were poured in to separate paper bags at room temperature and the bags sealed tightly until their utilization. As the only taxonomic study of the whole genus *Vicia* in Algeria was undertaken by Quézel and Santa (1962), the present study relies on their taxonomy. Taxonomic identification of accessions was verified by the morphology of plants grown from seeds. Vouchers were preserved in the herbarium of the laboratory of “Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales” (GBBV) of Faculty of Biology in Constantine University (eastern Algeria, N 36°20.602' E006°37.480' Alt. 569m).



**Figure 1.** Geographical origin of the 37 Algerian populations studied

### **Germination and growing**

Dry seeds from each packet were scarified then imbibed overnight in distilled water. They were germinated in the dark at 25°C on Wattman paper in Petri dishes until the appearance of the radicle. Seeds were considered to have germinated when radicle length equalled seed diameter. Three germinated seeds from each accession were planted in a moist mixture of garden soil, sand and compost in 5 L capacity plastic pots and plants were grown under unheated greenhouse where a selective herbicide was applied to all of them.

### **Morphological analyses**

The variation of 78 morphological characters with two to five states was analyzed (Table 2). These characters grouped as stem, leaflets, stipules, tendrils, flower, legume and seeds characteristics were examined with a binocular and a caliper. The observations on growth form were taken on three individual plants per population. In total, 111 individuals were examined. The morphological characters were selected from the species descriptions of several floras (Fedtschenko 1948; Tamayunova 1961; Ball 1968; Davis and Plitman 1970; Zohary 1972; Rasulovala and Karimova 1978; Pavlova 1989) and from taxonomic studies (Gunn 1970, 1979;

Kupicha 1976; Nikiforova 1988). Leaf and stem characters were measured at the first productive node. Leaflets were also measured at the lower part of the stems. Legume and seed characters were observed on harvested mature pods.

**Table 1.** Passport information and taxonomic identification of accessions investigated

Species	Subspecies	Code	Date of collection	Province /Locality/Origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<i>V. lutea</i> L.	<i>V. lutea</i> subsp. <i>vestita</i> (Boiss.) Rouy.	1	28.5.14	Skikda Ramdane Djamel	N36°45.977'	E006°53.432'	42
		4					
		58	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
		82	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.025'	E006°40.058'	448
	<i>V. lutea</i> subsp. <i>eu-lutea</i> Maire	82	28.5.14	Guelma	N36°28.361'	E007°21.280'	223
		62	1st.6.14	Skikda Azzaba	N36°43.531'	E007°04.708'	110
		63	1st.6.14	Skikda Ain Cherchar	N36°44.366'	E007°14.176'	52
		79	1st.6.14	El Tarf Ben M'hidi	N36°46.402'	E007°53.600'	11
		87	30.5.14	Jijel El Milia	N36°46.668'	E006°13.551'	28
		90	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24
<i>V. monantha</i> Retz	<i>V. monantha</i> subsp. <i>calcarata</i> (Desf.) Maire	3	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
		12	5.6.14	Relizane	N35°43.689'	E000°24.265'	105
		26	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757
		27	2.6.14	Oum El Bouaghi	N35°51.459'	E007°06.377'	887
		40	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711
		44	6.6.14	Tlemcen	N34°52.088'	W001°11.698'	843
		45	3.6.14	Bordj Bou Areridj	N36°04.070'	E004°41.899'	923
		49	28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
		60	2.6.14	Khenchla	N35°33.685'	E007°02.177'	860
		74	14.6.14	Tébessa	N35°15.936'	E007°30.306'	1078
		77	26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683
		78	20.5.14	Constantine El Coudiat	N36°21.787'	E006°36.418'	633
	84	10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586	
	<i>V. monantha</i> ssp. <i>cinerea</i> (M.B.) Maire	98	14.6.14	Tébessa Chria	N35°16.328'	E007°44.359'	1087
		29	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
		18	3.6.14	Bordj Bou Areridj Ain taghrout	N36°07.741'	E005°03.364'	934
		46	3.6.14	Bordj Bou Areridj El Achir	N36°04.017'	E004°40.525'	944
		91	14.6.14	Khenchla	N35°15.704'	E007°20.957'	1222
101		14.6.14	Khenchla	N35°15.807'	E007°28.934'	1077	
<i>V. narbonensis</i> L.	-	23	30.5.14	Constantine Hamma Bouziane (Chaabet El Medhbouh)	N36°26.391'	E006°33.282'	425
	-	30	30.5.14	Mila Messaoud Boudjriou	N36°29.748'	E006°25.530'	325
	-	34	27.4.14	Constantine Didouche Mourad	N36°29.216'	E006°38.731'	434
	-	55	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.023'	E006°40.051'	443
	-	81	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
<i>V. tenuifolia</i> Roth.	-	56	6.6.14	Ain Temouchent	N35°16.476'	W001°13.800'	276
	-	89	6.6.14	Sidi Bel Abbes Sidi Khaled	N35°06.59'	W000°44.238'	543
	-	97	6.6.14	Ain Temouchent Ain Tolba	N35°14.721'	W001°17.054'	222
<i>V. leucantha</i> Biv.	-	100	10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586

**Table 2. Morphological characters used for cladistic analysis**

	Symbol	Character name	Character state
<b>Stem</b>	S.B	Stem branching	0- unbranched      1 - in the upper part      2 - from the base
	S.H	Stem height	0 - small (up to 40cm)      1 - high (over 40cm)
	S.F	Stem Form	0- slender      1 - rigid
	SEC	Stem edges color	0- green      1 - purple
	SP	Stem pubescence	0- glabrous      1 - sparse      2 - dense
	SHE	Stem hair elevation	0- ascending      1 - adpressed      2 - curled
	SHL	Stem hair length	0- short      1 - long
	SNC	Stem node colour	0 - green      1 - purple
<b>Leaflets</b>	LPL	Leaflets pairs per leaf	0- 1-3 pairs      1 - more than 3 pairs
	LRSh	Leaflets relative shape	0- all of same shape      1 - different shapes
	LRS	Leaflets relative size	0- all of same size      1 - larger at leaf base
	LC	Leaflet consistence	0- thin      1 - normal      2 - fleshy
	LAC	Leaflet abaxial colour	0- pale      1 - same as adaxial
	LLP	Lower leaflets position	0- at base of rachis      1 - higher
	LS	Leaflet shape	0- lineal      1 - elliptical      2 - obovate      3 - ovate
	LBP	Leaflet broadest point	0- at apex      1 - in middle      2 - at base
	LAS	Leaflet apex shape	0- acute      1 - obtuse      2 - truncate      3 - emarginate
	LAD	Leaflet apex dentate	0 - not      1 - two teeth      2 - more than two
	LB	Leaflet base	0- rounded      1 - acute
	LM	Leaflet margin	0 - entire      1 - dentate      2 - undulate
	LMH	Leaflet margin hairness	0- glabrous      1 - ciliate
	LHE	Leaflet hair elevation	0 - ascending      1 - adpressed
LAHD	Leaflet abaxial hair density	0 - glabrous      1 - sparse      2 - dense	
<b>Stipules</b>	SS	Stipule size	0- small (shorter than 6 mm)      1 - large (longer than 6 mm)
	SSh	Stipule shape	0- lanceolate      1 - semi-hastate      2 - semi-sagittate      3 - ovate
	SNS	Stipule nectariferous spot	0 - absent      1 - dark      2 - pale
	SE	Stipule edge	0- entire      1 - dentate      2 - 2 - 3-partite
	Spa	Stipules of the pair	0 - identical      1 - different
<b>Tendrils</b>	TP	Tendril presence	0- absent      1 - present      2 - in some leaves
	TB	Tendril branching	0- not branched      1 - branched
	TL	Tendril length	0- short      1 - long
	THD	Tendril hair density	0- glabrous      1 - sparse      2 - dense
	NFI	Number of flowers per inflorescence	0- one      1 - 1 - 4      2 - 5 or more
	FL	Flower length	0 - up to 0.8(0.9) cm      1 - 2.5 cm      2 - over 2.5 cm
	PcL	Pedicel length	0- shorter than calyx      1 - equal or longer than calyx
	PL	Peduncle length	0- absent      1 - very short      2 - up to as long as leaf      3 - longer than leaf
	SCP	Standard colour pattern	0 - absent      1 - differently coloured spot      2 - differently coloured veins 3 - differently coloured back      4 - darker
	SC	Standard colour	0 - white      1 - yellow      2 - purple (bluish)
	SP	Standard pubescence	0- glabrous      1 - pubescent at back
	SASh	Standard apex shape	0- strongly emarginate      1 - slightly emarginate
	WCP	Wing colour pattern	0- absent      1 - tip differently coloured      2 - differently coloured veins
	WC	Wing colour	0- white      1 - yellow      2 - purple

<b>Flower</b>	WL	Wing length	0- ¼ shorter than standard 1 - little shorter than standard 2 - longer than standard
	KC	Keel colour	0- white 1 - yellow 2 - purple
	KCP	Keel colour pattern	0- absent 1 - dark tip 2 - much darker
	KL	Keel length	0- shorter than wings 1 - equal or longer than wings
	CBSH	Calyx base shape	0 - not gibbous 1 - slightly gibbous 2 - strongly gibbous
	CMSH	Calyx mouth shape	0- straight 1 - slightly oblique 2 - strongly oblique
	CH	Calyx hairness	0- glabrous 1 - clayx teeth only 2 - general coverage
	CHD	Calyx hair density	0- sparse 1 – dense
	CC	Calyx colour	0- green 1 - purple at base 2 - teeth purple 3 - purple 4 - dark at base
	CTL	Calyx teeth length	0- equal 1 – unequal
	CUTL	Calyx upper teeth length	0- longer than tube 1 - shorter than tube
	CLTL	Calyx lower teeth length	0- longer than tube 1 - shorter than tube
	CUTSh	Calyx upper teeth shape	0- triangular 1 - lanceolate 2 – subulate
	CLTSh	Calyx lower teeth shape	0- triangular 1 - lanceolate 2 - subulate
<b>Legume</b>	LSh	Legume shape	0 - linear 1 - lanceolate 2 - rhomboid 3 – oblong
	LCS	Legume cross-section	0- rounded 1 - slightly compressed 2 – compressed
	LP	Legume position	0- erect 1 - horizontal 2 – hanging
	LSt	Legume stipitate	0 - not 1 – stipitate
	Lpu	Legume pubescence	0- glabrous 1 - entire coverage 2 - only on sutures
	LSf	Legume surface	0- smooth 1 - slightly ridged with veins 2 - strongly ridged with veins
	LT	Legume torulose	0 - not 1 – torulose
	LC	Legume colour	0- black 1 - brown 2 - yellowish brown 3 – yellow
	LSC	Legume suture curvature	0- suture parallel 1 - sutures unparallel
	LSH	Legume suture hairness	0- glabrous 1 - hairy 2 – ciliate
	LBe	Legume beak	0- absent 1 - short 2 – long
	LBSH	Legume beak shape	0- straight 1 - curved up 2 - curved down
	<b>Seed</b>	SNL	Seed number per legume
Ssha		Seed shape	0- spherical 1 - cubical 2 – elliptical
SCS		Seed cross-section	0- uncompressed 1 – compressed
Ssu		Seed surface	0- smooth 1 - wrinkled
Sco		Seed colour	0- black 1 - brown 2 - red-brown 3 - yellowish
SCM		Seed colour mottling	0- absent 1 - present
HL		Hilum length	0 – long (70 - 80%) 1 – intermediate (20 - 40%) 2 – short (less than 20%)
HC		Hilum colour	0 - pale 1 - seed colour 2 - dark
LSI		Legume spongy inside	0 - not 1 - spongy
SSz		Seed Size	0 - 3-5(6) mm 1 - over 6 mm

### Ecogeographic parameters

A Global Positioning Systems (GPS GARMIN eTrex® model 30) was used to collect coordinates of sites investigated. Each sampling site was characterized by the five ecological factors (table 3) of mediterranean climate (annual rainfall, average of the maximum temperature of the hottest month, average of a minimum temperature of the coldest month, Emberger coefficient and altitude). The data recorded to ONM (National Office of Meteorology, Algeria)

were used to characterize the climate parameters of sites investigated. However, data of three stations (Mila, Ain Temouchent and El Tarf) were not available; this is why data recorded to CLIMATE-DATA.ORG (<http://fr.climate-data.org/>) were used for these sites.

**Table 3 Climatic characteristics of reference stations (2004-2014)**

Reference station	Latitude	Longitude	Alt. (m)	P (mm)	m (°C)	M (°C)
Jijel (airport)	36°48 N	05°53 E	8	1066.1	6.8	31.5
Skikda	36°53 N	06°54 E	2	829	8.8	29
Annaba	36°50 N	07°48 E	3	684.4	6.7	31.5
Relizane	35°44 N	00°32E	95	352,5	5,3	38,6
Constantine	36°17 N	06°37 E	693	486.6	2.2	35.2
Bordj Bou Areridj	36°04 N	04°46 E	928	392,9	1,7	36,4
Khenchla	35°28 N	07°05 E	983	520,8	1,8	34,9
Oum El Bouaghi	35°52 N	07°07 E	889	410.4	1.1	35
Tlemcen (Zenata)	35°01 N	01°28 W	246	359.8	6.2	33.9
Tébessa	35°25 N	08°07 E	821	382,6	1,7	35,6
Batna	35°45 N	06°19 E	822	346,8	0,1	36,4
Guelma	36°28 N	07°28 E	227	622.3	4.5	36.4
Mila*	36°27 N	06°16 E	437	742	4.4	31.5
Ain Temouchent*	35°17 N	01°08 W	235	485	6.8	30.2
El Tarf Ben M'hidi*	36°46 N	07°54 E	6	707	7,1	31,2

Alt altitude, P annual rainfall, M and m are the of the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively \* Data from “Climate data org”

### Climatic data corrections

Data of reference stations did not reflect the point of view ecogeographical actual bioclimatic conditions. Because we have made correction of climate data based on extrapolations for different altitudinal point. According to the altitudinal gradient of Seltzer (1946) in his study on Algeria climate, the following gradients are advocated: For the pluviometry, every altitude of 100 meters, an increase of 40 mm for continental sites and 80 mm for the coastline. For the temperature, every 100 meters, a decrease of 0.7°C for M and 0.4°C for m. This gives an increasing altitudinal gradient for the pluviometry and a decreasing one for the temperature. Correction factors allow us to have more accurate data on items considered. The rainfall correction is performed as follows:

Correction factor:  $K = \frac{A+P}{P}$  where: A: rainfall increase (mm):  $A = d \times 40/100$  for the continental and  $A = d \times 80/100$  for coastline; d: difference in altitude between the two stations; P: sum of monthly average rainfall of the reference station

The correction factor is multiplied by the monthly rainfall data for the reference station  
 Calculation of the bioclimatic coefficient of Emberger (1955) and definition of the bioclimate  
 The pluviothermic Emberger quotient (Q2) is determined by the combination of three major climate factors. This quotient easy to interpret: the more Q2 values are larger and more stations

are wet. We have used Stewart's formula (1969) who transformed the equation and obtained the following formula for the mediterranean:  $Q2 = \frac{kP}{M-m}$  where:

k: constant which is equal to 3.43; temperatures are in degrees Celsius for M and m; P mm.

Interpretation of this quotient requires the use of Emberger climagramm which classifies each station in one of the 54 combinations bioclimatic Mediterranean climate.

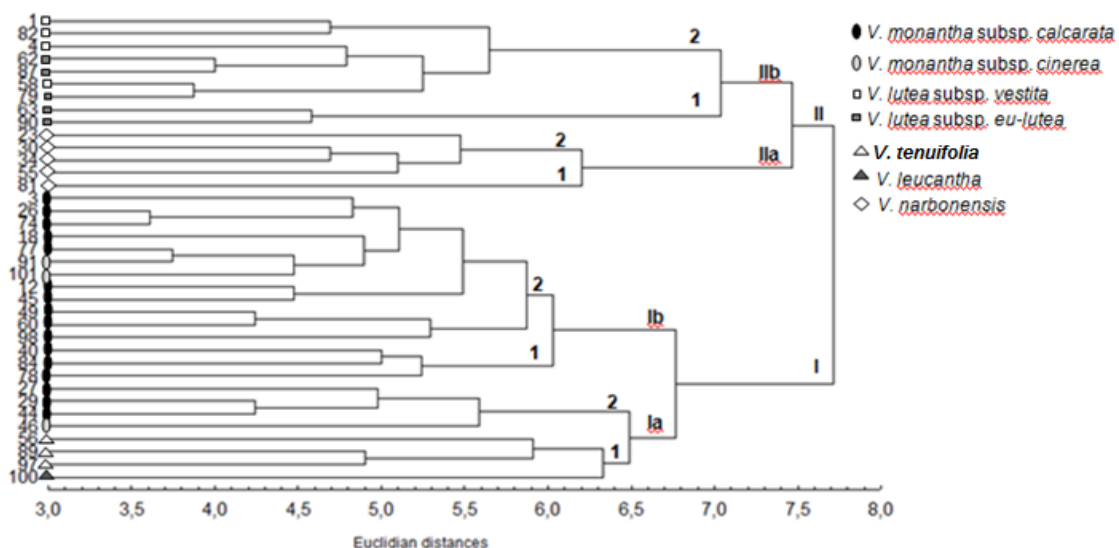
### Data analyses

Cluster analysis of morphological characters and ecogeographic parameters were performed with Euclidean Distances Matrix based on the Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA). In the other side, Principal Component Analysis (PCA) was undertaken to clarify correlation between morphological characters used and to identify characters which contribute the most in accessions distinction. These analyses were carried out with Data analysis software (STATISTICA version 6.1 program). Finally, to display a possible correlation between morphological characters and ecogeographic parameters, a Mantel test (Mantel 1967) based on Pearson's correlation was used (XLSTAT Pearson edition, version 2014.5.03).

### Results

#### Cluster analysis based on morphological characters

The dendrogram illustrated in Figure 2 shows the relationships between these subspecies, based on the variation in morphological characters.



**Figure 2.** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of 37 *Vicia* L. accessions

At a distance of 7.71, the dendrogram can be divided into 2 major clusters (I and II). The cluster I is divided into two sub clusters (Ia and Ib) at the distance of 6.76. Each sub cluster comprises two groups (1 and 2). The group Ia1 (d=6.33) contains 4 accessions (56-89-97-100). At a distance of 5.58, the group Ia2 contains 4 accessions (27-29-44-46). Concerning Ib1(d=5.24), it contains samples 40, 84 and 78. Ib2 (d=5.87) comprises 12 accessions (3-26-74-18-77-91-12-45-49-60-98). The cluster II can further be divided into two subclusters (IIa and IIb). IIa comprises two groups (1 and 2) where the accession 81 being itself the group 1 and accessions 23-30-34 and 55 form the second group (d=5.47). The subcluster IIb is also divided into 2 groups: IIb1 is composed of two accessions (63 and 90) and IIb2 (d=5.64) comprises 7 accessions (1-82-4-62-87-58-79).

### Interspecific polymorphism

The similarity matrix of all pairs of studied populations (Figure 3) shows within and between accessions variability. The low distance value indicates high level of homology in the variation pattern of the morphological characters.

**Figure 3.** Similarity matrix of morphological characters

Accessions 26 and 74 appears to be a sister taxa of *V. monantha* subsp. *calcarata*. This clade is strongly supported by the lowest distance (d=3.61). Differences between the two accessions concern only 13 characters on 78 used (SP-SHL-LB-LHE-TP-TL-THD-NFI-SCP-WCP-CBSh-CMSh-SNL). A low distance of 3.74 is also observed between accessions 77 (*V. monantha* subsp. *calcarata*) and 91 (*V. monantha* subsp. *cinerea*). Differences between the two concern 14 characters (SH-SEC-SNC-LC-LHE-SSh-TL-NFI-CMSh-CTL-LCS-LP-SNL-HL). The

higher distance ( $d=9.59$ ) is observed between 97 (*V. tenuifolia*) and 34 (*V. narbonensis*) which are different by 41 characters (SB-SEC-SP-LPL-LRSh-LRS-LC-LLP-LS-LAS-LB-LM-LHE-LAHD-SS-NFI-PL-WCP-WC-KC-CBSh-CMSh-CH-CC-CTL-CLTSh-LCS-LP-Lpu-LT-LC-LSH-LB-LBSh-SNL-Ssha-SCS-Ssu-SCM-HL-SSz). A big distance ( $d=9.49$ ) is also obtained between the accessions 81 (*V. narbonensis*) and 91 (*V. monantha* subsp. *cinerea*). These two accessions are different by 38 characters (SB-SH-SF-SEC-SNC-LPL-LRSh-LC-LLP-LS-LAHD-SS-SE-Spa-TL-THD-NFI-PL-SASh-WC-CBSh-CMSh-CH-CHD-CC-CTL-CLTSh-LCS-LSt Lpu-LC-LSH-SNL-Ssha-Sco-SCM-HL-LSI). Between accessions 34-44, 12-81, 49-81, 74-81, 12-90, 26-90, 55-98, distances of 9.17, 9, 9.43, 9.17, 9.38, 9.11 and 9.49 are respectively obtained.

### **Intraspecific variability**

For each species, a distance matrix is obtained and used to construct the dendrogram between accessions of the same species (data not shown).

#### ***Vicia lutea***

The cluster analysis of this species shows 2 groups. The first group comprises the accessions 63 and 90 distant of  $d=4.58$ . The second group contains 2 sub-clusters: the first one is composed of the two accessions 1 and 82 ( $d=4.69$ ) and the second one is composed of 5 accessions (4-62-87-58-79). The lower distance ( $d=3.87$ ) is obtained between the accessions 79 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*) and 58 (*V. lutea* subsp. *vestita*). Differences between the two concern 12 characters on 78 used (LAHD-SSh-TP-KC-KCP-CBSh-CMSh-CH-LCS-LC-LB-LSI). A distance of 4.0 is obtained between 62 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*) and 87 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*) which differ by NFI-SASh-CBSh-CMSh-CHD-CUTL-CUTSh-CLTSh-LCS-LP-LSC-LSH-LBe. The higher distance ( $d=7.68$ ) is obtained between accessions 4 (*V. lutea* subsp. *vestita*) and 63 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*) which differ by 27 characters (SB-SF-SP-LS-LAS-LAHD-SSh-SNS-TL-SCP-SC-KC-KCP-CBSh-CH-CHD-CC-CUTL-LCS-LP-LSf-LC-LSC-LSH-LB-SCS-SSz). In the same way, a distance of 7.21 is obtained between 79 and 90 presenting 15 differences (SP-LRS-LS-LB-SSh-TL-NFI-SCP-CMSh-CC-CUTSh-LCS-LC-LBe-SCS).

#### ***Vicia monantha***

Concerning this species, the dendrogram shows two clusters. The cluster I is divided into 2 subclusters. The accession 46 being its self the first subcluster, when the second subcluster contains 3 accessions (27-29-44). The cluster II is further divided into 2 subclusters. The first one contains 7 accessions (3-26-74-101-40-84-78) and the second subcluster is composed of 8 samples (12-45-18-77-91-49-60-98). A distance of 3.61 is obtained between 26 and 74 which are different by 13 characters (SP-SHL-LB-LHE-TP-TL-THD-NFI-SCP-WCP-CBSh-CMSh-



SNL). Between 77 and 91, a distance of 3.74 is observed. Differences between the two concern SH-SEC-SNC-LC-LHE-SSh-TL-NFI-CMSh-CTL-LCS-LP-SNL-HL. In parallel, the higher distance (d=8) is obtained between 46 and 40 different by the following characters: SB-SF-SEC-LC-LLP-LS-LAS-SSh-TP-THD-NFI-WCP-WC-KC-CMSh-CC-CTL-CUTL-LCS-Lpu-LC-LSC-LSH-SNL-Ssha-SCS-Ssu-Sco-HC-LSI. Accessions 78 and 45(d=7.94) differ by 24 characters on 78 used.

### ***Vicia narbonensis***

The five accessions of this species can be separated into 2 groups. The accession 81 forms a separate group. The group II is divided into two subclusters. The first one comprises the accession 23 and the second one contains the accessions 30, 34 and 55. The lower distance (4.69) is obtained between the accessions 30 and 34 which differ by SB-SF-SP-SHL-LPL-LRSh-LC-LLP-LS-LAS-LB-LM-LHE-LAHD-SS-SNS-Spa-TP-NFI-PL-WCP-KC-CBSh-CMSh-CH-CHD-CC-CUTL-CUTSh-CLTSh-LCS-LP-LPu-LT-LC-LSH-LBe-LBSh-SNL-SCS-Sco-SCM-HL. The higher distance (d=6.56) is observed between 30 and 81. Differences between the two concern SB-SHL-LS-LM-SNS-THD-NFI-SASh-WC-CBSh-CMSh-CHD-CC-CUTL-CUTSh-LSt-LC-LBe-LBSh-SNL-Ssha-SCS-Sco

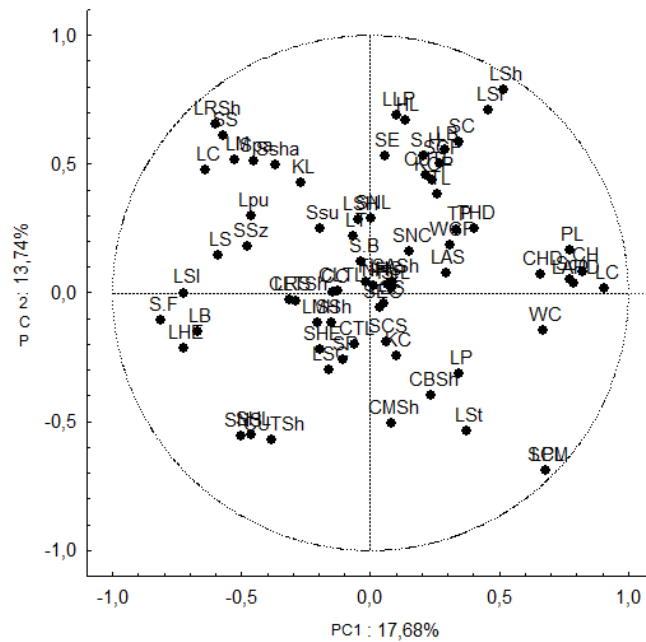
### ***Vicia tenuifolia* and *Vicia leucantha***

The three accessions belonging to the species *V. tenuifolia* (56-89-97) form the group Ia1 together with the unique accession of *V. leucantha* (100). A low distance (d=4.90) is obtained between accessions 97 and 89 which differ by SP-LRS-LC-LAS-LHE-SCP-SASh-WCP-WC-KC-CMSh-CLTSh-LSH-SNL-LSI. When a distance of d= 5.66 is obtained between 89 and 56. Differences between the two concern SEC-LRS-SS-Spa-SCP-SASh-WCP-WC-CBSh-CMSh-CHD-CC-LCS-LT-LSH. A distance of 9.00 is obtained between the sample (100) and accessions 34 and 55 belonging to *V. narbonensis* L. Differences between 34 and 100 concern SP-SNC-LRS-LC-LLP-LAS-LB-LHE-SS-SE-NFI-FL-SCP-SC-WCP-WC-KC-CBSh-CMSh-CHD-CUTL-CLTL-CUTSh-CLTSh-LCS-Lpu-LT-LSH-SNL-LSI. While samples 55 and 100 differ by 40 characters. A distance of 5.20 is observed between 100 and 89 (*V. tenuifolia*). Differences between the two concern SNC-LLP-LB-SS-SE-Spa-NFI-FL-SC-SASh-WC-CBSh-CMSh-CHD-CUTL-CLTL-CUTSh-CLTSh-LCS-Lpu-TT-LSH.

### **Principal Component Analysis based on morphological data**

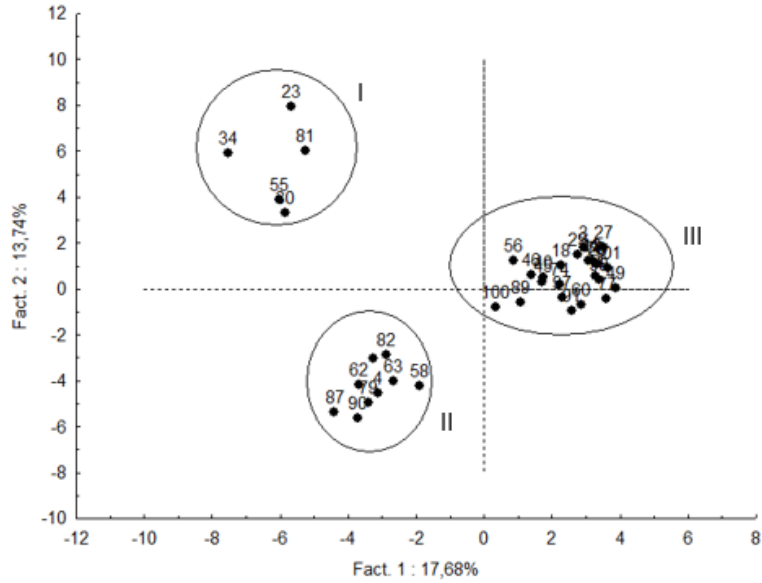
a Principal Component Analysis (PCA) was carried out to clarify relationships between morphological characters and to identify which characters contribute the most in accessions separation. 6 characters (LAC-LBP-LAD-TB-WL-LBSh) were excluded as they are

homologous between all accessions. The remaining 72 characters were used for PCA. The results are shown in figure 4.



**Figure 4.** Principal Component Analysis of 72 morphological characters

The results of PCA revealed that the first twenty axes accounted for 90.61% of the total variation with 17.68% for PC1, 13.74% for PC2 and 7.33% for PC3. Two-dimensional (2D) plot was obtained using the first two PCs. The morphological characters which strongly contributed to the formation of PC1 are LC, CH, SF, LAHD, LHE, Sco, LSI and PL. Those which most contribute to the formation of PC2 are LSf, SCM, HL, LPL, LLP and LRSh. In the other side, characters which have a low loading in accessions distinction are SNL, NFI, FL, SB for PC1 and LSI, CC, PcL, SP and LC for PC2. The strongest positive correlation ( $r = 1.00$ ) was found between SP and PcL and also between SCM and LPL. The strongest negative one ( $r = -0.89$ ) was obtained between LPL and LRSh, SCM and LRSH ( $p < 0.05$ ). In parallel, the projection of individuals (accessions) was done using the observation with the sum of the squared cosinus  $\geq 0.00$ . The results are shown in figure 5. The group I comprises accessions 23,34, 55, 80 and 81. The group II is composed of samples 4, 62, 63, 58, 82, 79, 90 and 87. The group III contains the remaining populations.



**Figure 5.** Principal Component Analysis of studied populations

### Ecogeographic parameters

#### Data correction and bioclimate definition

The results of correction of the pluviometric and temperature data and calculation of Q2 were used to define the bioclimate of each site using Emberger climagramm. All results are shown in table 4.

There is a large difference between taxa in the range of GPS coordinates from which they were collected (table 1). All accessions occur between the latitudes of 34.52° to 36.49° N. Accessions 90, 87, 79, 1, 63 and 62 occur in the greatest range, and are the most northerly of the taxa occurring north. Accession 44 occurs the furthest south to latitude of 34.52° N at Tlemcen. *V. lutea* was collected in different sites with altitudes comprised between 11 and 604 m, belonging to four different bioclimates (LH, HAS, MSA, SH). *V. narbonensis* was collected from different stations with altitudes comprised between 325 m and 604 m and three different bioclimates (MSA, SH, HSA). The unique accession of *V. leucantha* used in the present study was collected from a station belonging to HSA with an altitude of 586 m. *V. monantha* was collected from stations with altitudes between 105 and 1222m and 6 different bioclimates (MSA, LSA, SH, LH, HAS, HA). *V. tenuifolia* was collected from three stations with altitudes comprised between 222 and 543 m and two different bioclimates (MSA, SH). Precipitation of all stations was between 291.17 and 1082.09 mm. The average of the minimum of the coldest month within these altitudes is ranged from 0.63 °C (cold winter) to 8.64 °C (warm winter).

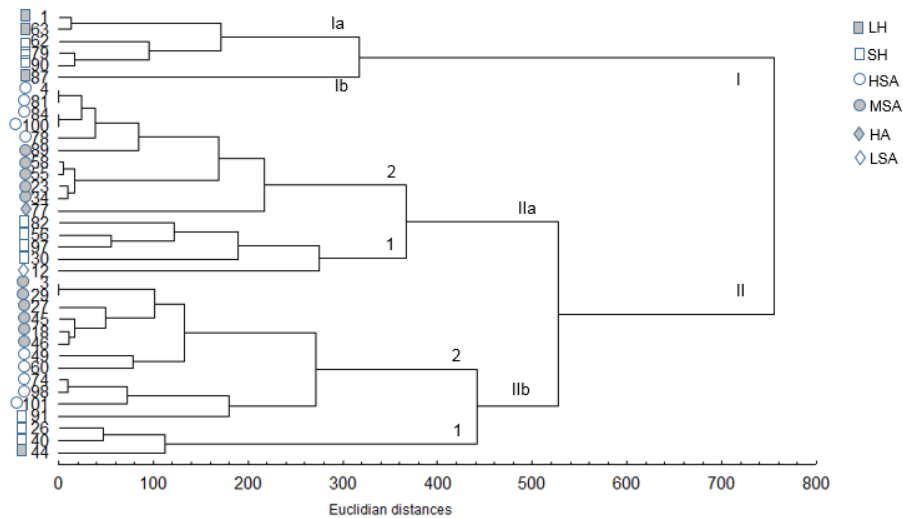
**Table 4. Corrected data of climatic characteristics and calculation of Emberger quotient of sampling sites investigated**

Code	Alt. (m)	K	P (mm)	m (°C)	M (°C)	Q2	Bioclimate
1	42	1,0386	860,99	8,64	28,72	147,07	LH - warm winter
4	604	0,9268	450,98	2,55	35,82	46,49	HSA - cool winter
58	448	0,7986	388,59	3,18	36,91	39,52	MSA - temperate winter
82	223	1,0025	611,62	4,51	36,52	65,54	SH - mild winter
62	110	1,1042	701,16	8,36	28,24	120,97	SH - warm winter
63	52	1,0482	868,95	8,6	28,65	148,65	LH - warm winter
79	11	1,0056	710,93	7,08	31,16	101,27	SH - warm winter
87	28	1,0150	1082,09	6,72	31,36	150,63	LH - mild winter
90	24	1,0245	701,16	6,61	31,35	97,21	SH - mild winter
3	822	0,9346	383,56	1,36	35,46	38,58	MSA - cool winter
12	105	1,0113	356,48	5,26	38,53	36,75	LSA - mild winter
26	755	1,3393	833,44	2,38	32,80	93,97	SH - cool winter
27	887	0,9980	409,57	1,108	35,014	41,43	MSA - cool winter
40	711	1,3111	815,89	2,56	32,80	92,54	SH - cool winter
44	843	2,3274	837,39	3,81	29,72	110,85	LH - temperate winter
45	923	0,9949	390,89	1,72	36,43	38,63	MSA - cool winter
49	847	1,1265	548,15	1,58	34,12	57,78	HSA - cool winter
60	860	0,9055	471,58	2,29	35,76	48,33	HSA - cool winter
74	1078	1,2686	485,36	0,67	33,80	50,25	HSA - cold winter
77	683	0,8396	291,17	0,65	37,37	27,20	HA - cold winter
78	633	0,9506	462,56	2,44	35,62	47,82	HSA - cool winter
84	586	0,9120	466,85	2,62	35,94	48,06	HSA - cool winter
98	1087	1,2780	488,96	0,63	33,73	50,67	HSA - cold winter
29	822	0,9346	383,56	1,36	35,46	38,58	MSA - cool winter
18	934	1,0061	395,29	1,67	36,35	39,10	MSA - cool winter
46	944	1,0162	399,26	1,63	36,28	39,52	MSA - cool winter
91	1222	1,1835	616,36	0,84	33,22	65,29	SH - cold winter
101	1077	1,0721	558,35	1,42	34,24	58,35	HSA - cool winter
23	425	0,7796	379,35	2,62	35,94	39,05	MSA - cool winter
30	325	0,9396	697,18	4,84	32,28	87,15	SH - mild winter
34	434	0,7870	382,95	3,23	37,01	38,88	MSA - temperate winter
55	443	0,7944	386,55	3,2	36,95	39,28	MSA - temperate winter
81	604	0,9268	450,98	2,55	35,82	46,49	HSA - cool winter
56	276	1,0338	501,38	6,63	29,91	73,87	SH - mild winter
89	543	1,0725	402,29	2,52	35,52	41,81	MSA - cool winter
97	222	1,0107	490,13	6,85	30,29	71,72	SH - mild winter
100	586	0,912	466,85	2,62	35,94	48,06	HSA - cool winter

K correction factor, Alt altitude, P annual rainfall, M and m the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively, Q2 Emberger coefficient, SH subhumid, LH Less Humid, HSA Higher Semiarid, HA Higher arid, MSA Means semiarid, LSA Less semiarid

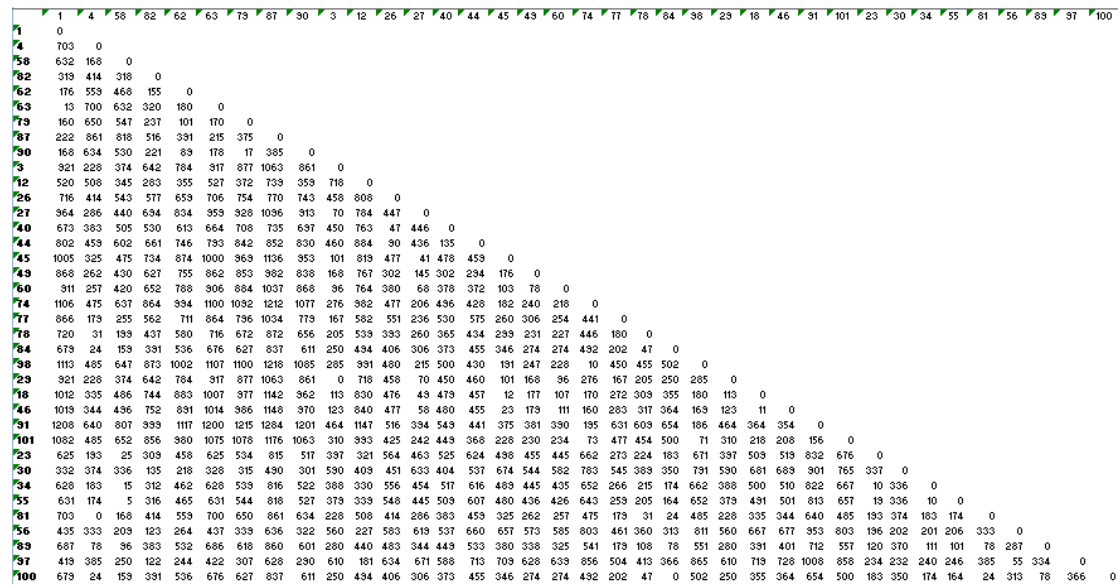
#### **Cluster analysis based on ecogeographic data**

The dendrogram illustrated in Figure 6 shows the relationships between these subspecies, based on the variation in ecogeographic parameters.



**Figure 6.** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on ecogeographic diversity of 37 *Vicia. L.* accessions

At the distance of 754.84, the dendrogram can be divided into two major clusters (I and II). The cluster I is composed of two subclusters. The accession 87 being itself the subcluster Ib. The subcluster Ia is composed of 5 accessions (1-63-62-79-90) at a distance of 171.91. Concerning the cluster II, it is further divided into two sub-clusters Ila and Iib. Ila1 ( $d=274.97$ ) comprises accessions 82-56-97-30 and 12, when at a distance of  $d=217.31$ , Ila2 is composed of accessions 4-81-84-100-78-89-58-55-23-34 and 77. The subcluster Iib1 ( $d=112.39$ ) contains 3 accessions: 26-40 and 44. Iib2 ( $d=271.71$ ) is composed of 3-29-27-45-18-46-49-60-74-98-101 and 91. The distances matrix of all pairs of studied accessions (Figure 7) shows that the higher distance ( $d=1284$ ) is obtained between 91 (*V. monantha* subsp. *cinerea*, Khenchla) and 87 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*, Jijel-El Milia) when the lower distance ( $d=5$ ) is observed between samples 55 (*V. narbonensis*, Constantine-Didouche Mourad) and 58 (*V. lutea* subsp. *vestita*, Jijel-El Milia). A high distance ( $d=1218$ ) is also observed between 98 (*V. monantha* subsp. *calcarata*, Tébessa-Chria) and 87. Between samples 1 (*V. lutea* subsp. *vestita*, Skikda-Ramdane Djamel) and 91, a distance of 1208 is observed. Samples 91 and 63 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*, Skikda-Ain Cherchar) are distant by  $d=1200$ . In parallel, a low distance of 11 is observed between accessions 46 (*V. monantha* subsp. *cinerea*, Bordj Bou Arreridj-El Achir) and 18 (*V. monantha* subsp. *calcarata*, Bordj Bou Arreridj-Ain Taghrout). Between samples 18 and 45 (*V. monantha* subsp. *calcarata*, Bordj Bou Arreridj), a distance of  $d=12$  is obtained. A distance of  $d=13$  is observed between samples 1 and 63.



**Figure 7.** Similarity matrix of ecogeographic parameters

### Correlation between morphology and ecogeography

Correlation between the two Euclidean distance matrices of morphological characters (matrix A) and ecogeographic parameters (matrix B) was carried out with Mantel test based on Pearson's correlation. The p-value was calculated from the distribution of  $r(AB)$  using 10000 permutations. This test showed a correlation of 42.39 % between morphology and ecogeography ( $r = -0.022$ ,  $p = 0.576 = 57.61\%$ ,  $\alpha = 0.05 = 5\%$ ).

### Discussion

#### Morphological characters

Several researchers have mostly studied the taxonomy of regional species of *Vicia*, mainly on the sectional level, on the basis of morphology (Tzvelev 1980; Nikiforova 1988; Endo and Ohashi 1996). The current study is the first work using 78 morphological characters to assess diversity of *Vicia* L. in Algeria. Majority of the morphological characters used in different cladistic studies are binary, usually only some characters included have three or more states. In our morphological multistate matrix, 33 out of 78 characters used have two states and 45 of remaining manystate characters are polymorphic. When the multistate characters were coded into presence/absence form, the need to code polymorphic states as new characters disappeared (Leht and Jaaska 2002). Our results have demonstrated that using morphological traits alone produce a stable grouping. The morphological resemblances which led Quézel and Santa (1962) to place populations in the same species are correlated with the data of the 78 morphological traits used in our study. Indeed, in the present results, accessions of the same species/subspecies present a high homology level in morphological characters demonstrated by a low distance in

the similarity matrix and by the dendrogram which places them in the same group. Cluster analysis of morphological traits revealed two basic monophyletic groups, differing only in the relative position of some accessions in subclusters: I) populations of *V. monantha* in one subcluster linked to two other species (*V. tenuifolia* and *V. leucantha*) belonging to section Cracca of the subgenus *Vicilla* (sensu Kupicha) together with four accessions of *V. monantha*; II) all accessions of *V. narbonensis* (section *Narbonensis*) in one subcluster linked with samples of *V. lutea* (section *Hypechusa*) in a second subcluster. These results concord with those of Shiran *et al.* (2014) which found that species of section *Hypechusa* were unexpectedly nested within the NSC (subgenus *Vicia*) and section *Cracca* (subgenus *Vicilla*), respectively.

### **Sections *Narbonensis* and *Hypechusa* (cluster II)**

All populations of *V. narbonensis* belong to the same subcluster (IIa). Quézel and Santa (1962) have used the following characters to rank samples in this species: presence of tendril, flower color and size, number of flowers per inflorescence, legume size and legume curvature aspect. Also, the utilization of the 78 characters of current study places them in the same subcluster. This observation shows that there are accessions which appear to belong to the same species on the basis of few characters while they have a lot of common characteristics. In parallel, a high distance can be obtained between accessions in this species as in the case of 30 and 81 showing morphological differences between accessions of *V. narbonensis*. This result can be explained by the fact that the key used by Quézel and Santa (1962) did not consider the infrageneric level for this species while several other keys distinguished five or seven varieties. However, the distinction of each variety is based on characters that are difficult to discern in the field (Maxted, 1990). The subcluster IIb is composed of all accessions of *V. lutea*: IIb1 contains samples belonging to *V. lutea* subsp. *eu-lutea* and IIb2 comprises samples of *V. lutea* subsp. *eu-lutea* together with samples of *V. lutea* subsp. *vestita*. These observations show that there is an overlap between accessions of these two subspecies. Indeed, Quézel and Santa used the color of flower to distinguish the two subspecies (yellow flowers more or less streaked brown for *eu-lutea* and purple or yellow flowers stained brown for *vestita*) but the utilization of characters of the present study shows a close relationship between the taxa when it is difficult to determine distinct groups which could be individually identified as *eu-lutea* or as *vestita*. Samples 58 (*V. lutea* subsp. *vestita*) and 79 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*) are a good example in this case. These two populations form one clade with the lower distance of  $d=3.87$  and have 66 common characters. Tzvelev (1980) reported that subspecies have been established within species showing significant intra-specific variation. This is consistent with our results where differences at subspecies level can be observed between samples of *V. lutea* subsp. *eu-lutea* as

in the case of 62 and 87. The two populations differ by 8 flower and 5 legume traits, when the remaining characters were identical.

According to Quézel and Santa (1962), *V. narbonensis* belongs to the same serie of *V. lutea* (serie 1). This serie is characterized by sessile or subsessile flowers, isolated, twin in leaf axils. Also, in the present study, they are grouped in the same cluster and have a lot of common characteristics. In the case of 1 and 30, similarities concern 6 characters of stem, 7 of leaflets, 3 of stipules, 3 of tendril, 19 of flower, 5 of legume and 4 of seed. In the other side, these two species, belonging to subgenus *Vicia*, section *Narbonensis* (*V. narbonensis*) and section *Hypechusa* (*V. lutea*) differ significantly from each other. Morphological differences are reflected in their placement in different subsections. The UPGMA results join the classifications of Kupicha (1976) and Maxted (1993) who place *V. narbonensis* and *V. lutea* in the same subgenus (*Vicia*). The apparition of the two sub-clusters (IIa and IIb) also join these two authors who place the two species in different sections and series (*V. lutea* in the section *Hypechusa*, serie *Hypechusa* and *V. narbonensis* in the section *Faba* by Kupicha and section *Narbonensis*, serie *Narbonensis* by Maxted). Our results concord with those of Jaaska and Leht (2007) which showed the species of sections *Hypechusa* as sister to the clade of section *Narbonensis*. Moreover, in our study, the seed morphology confirms this division, since samples belonging to the two species can have identical seed characters: compressed seed cross-section, smooth seed surface, brown seed color, seed presenting color mottling, hilum length (20-40%), pale hilum, spongy legume inside and seed size 3-6mm. The section *Hypechusa* reported to be monophyletic based on morphological RAPD and cp PCR– RFLP (Potokina *et al.* 1999) markers. A closer relationship between the NSC and section *Hypechusa* has been deduced based on isozyme studies by Jaaska (1997). The ITS sequence analysis (Shiran *et al.* 2014), in part, also supported this observation. Our data revealed that subgenus *Vicia* is a well-separated subgenus and agreed with the traditional results based on morphology reported by Diklic (1972) and with results on phylogenetic analyses (Potokina *et al.* 1999; Leht 2009).

### **Section Cracca (cluster I)**

The results of the analysis of the section *Cracca* indicate that the species fall into two distinct groups. However, the division between these two groups is not as distinct as between section *Hypechusa* and section *Narbonensis*.

Species of section *Cracca* sensu Kupicha belong all to one group. Fifteen accessions of *V. monantha* are classified in the same subcluster (Ib). But, there are no clear groups defined as *cinerea* or as *calcarata* showing an overlap between the morphology of these subspecies. An example can be given concerning samples 77 (*calcarata*) and 91 (*cinerea*) distant by 3.74 which



have 64 common characters when the key of Quézel and Santa distinguish between the two subspecies by only two characters (flower size and legume size). Accessions belonging to the same subspecies present also differences. Samples 26 and 74 belonging to *V. monantha* subsp. *calcarata* are a good example in this case. Differences concern characters of flower, stem, leaflets, tendril and legume. No differences for seed traits are observed. In another side, the cluster II regroup samples of *V. monantha* (subsp. *calcarata* and subsp. *cinerea*) belonging to the serie 2 together with the three accessions of *V. tenuifolia* (serie 2) and the unique accession of *V. leucantha* (serie 3). The subcluster Ia comprises populations of *V. tenuifolia*, *V. leucantha* and four populations of *V. monantha* showing also an overlap in morphological traits between these four accessions and the samples of *V. leucantha* and *V. tenuifolia*. The key of Quézel and Santa classifies *V. tenuifolia* and *V. monantha* in the same serie which is characterized by isolated or clustered flowers, always more or less pedunculated. They also have a lot of common characters according to the results of the present study. For example, the sample 97 (*V. tenuifolia*) and 44 (*V. monantha* subsp. *calcarata*) distant by  $d=5.66$  have 55 common morphological traits. The unique accession of *V. leucantha* is classified by Quézel and Santa in the serie 3 characterized by the flower small size (4-8mm) and a stringy peduncle, when it has a lot of common characteristics with the samples of the serie 2. For example, this accession and the accession 89 (*V. tenuifolia*) are distant by  $d=5.20$  and have 58 common characters. The species belonging to the cluster I are classified by Kupicha (1976) in the sub-genus *Vicilla*, section *Cracca*. Thus, the three species attributed to the section *Cracca* appear in a well-supported monophyletic group in the present work. *V. tenuifolia* and *V. leucantha*, form a subgroup of closely related species that revealed extensive homologous polymorphism with shared characters without any differentiation by species-specific traits. Seed morphology confirmed this division because both *V. tenuifolia* and *V. leucantha* can have similar characteristics, such as SB, SH, SF, SP, SHE, SHL; LPL, LRSh, LC, LAC, LS, LBP, LAS, LAD, LM, LMH, LHE, LAHD, SS, SSh, SNS, Spa, TP, TB, TL, THD, PcL, PL, SP, SASh, WC, WL, KC, KCP, KL, CH, CHD, CTL, LSh, LCS, LP, LSt, LSf, LT, LC, LSC, LBe, LBSh, SNL and all seed characters. However, both species also have different characteristics, such as SEC, SNC, LRS, LLP, SE, NFI, FL, SC, WCP, CBSH, CMSH, CC, CUTL, CLTL, CUTSh, CLTSh, Lpu, LSH. The largest section in the subgenus *Vicilla*, section *Cracca* (as interpreted by Kupicha), appears paraphyletic. In the present analysis, *V. leucantha*, the species transferred by Ball (1968) to his section *Ervum*, are in the same clade with the remaining *Cracca* species. In spite of this, our analysis of the morphological characters supports Kupicha's placement of

*V. leucantha* in section Cracca as was also done by Davis and Plitmann (1970). These results join those of Leht (2009) in his study of phylogenetics of *Vicia* based on morphological data.

### **Principal Component Analysis**

Due PCA is recommended as available starting-point for any further research into this group of taxa, this analyse was undertaken to distinguish characters which contribute the most in accessions separation. Among these morphological characters, three are quantitative (PL, HL, LPL) and the majority are qualitative (LC-CHD-SF-LAHD-LHE-SC-LSI-LS-SCM...). Those which contribute least to samples separation are both qualitative (SB-CC-LSI-SP) and quantitative (SNL-NFI-FL-PL). As quantitative characters are essential at this taxonomic level, several quantitative characters were included in the present study according to recommendations of Zelditch *et al.* (2000) who stress that quantitative data are fully appropriate for systematics, and particularly, phylogenetic studies. In the other side, there are many qualitative characters like color of seeds and hilum color, which usually are not used for taxonomy, but are important for cultivar identification. Information on the variability of these hereditary characteristic in populations from different geographical regions can also be useful for curators and collectors. Our data show that the qualitative variables allowed a clear separation of *Vicia* taxa and are good diagnostic taxonomic characters for the accessions. The same findings wer reported by Weber and Schifino-Wittmann (1999) in their study on several *Vicia* taxa in Southern Brazil where they underline a clear samples separation by corolla colour, pod and seed colour and pod constriction. Concerning characters that strongly contribute to the separation of the accessions, the range of variation does show overlap at subspecies level. PCA shows that morphological characters which strongly contribute in accessions distinction concern chracaters of leaflets, flower, stem, pod and seed showing the importance of each part of the plant in accession distinction. According to Davis and Plitmann (1970), *Vicia* species present considerable variations in almost every trait, but particularly in leaflet morphology. Our results show that, effectively, among characters which strongly contribute to samples distinction, six (LC, LAHD, LHE, LPL, LLP, LRSh) concern leaflets traits. In the present study, leaf and stem characters were measured at the first productive node. Leaflets were also measured at the lower part of the stems, so that heterophylly, an indicator of the difference in leaf shape at the bottom and the top of the plant, which has been used by Tardi'ó Pato *et al.* (1998). The results of PCA show that there is a strong positive correlation between characters of the same part of the plant like standard pubescence and pedicel length or between characters which belong to different parts like seed color mottling and leaflets per leaf. In parallel, traits of the same plant part can have a strong negative correlation as in the case of leaflets relative

shape and leaflets per leaf. In our results, no differences were observed for leaflet abaxial color, leaflet broadest point, leaflet apex dentate, tendril branching, wing length and legume beak shape. These characters are identical between the 37 *Vicia* populations and cannot be used for taxa identification. Morphological characters used in the present work allow good separation among accessions at species levels as shown by the use of the observation with the sum of the squared cosinus (Figure 4) which determines three distinct groups which could be individually identified when no groups at subspecies level were generated. The first group include all accessions of *V. narbonensis*. The second one contains samples of *V. lutea*. The third group include all accessions of subgenus *Vicilla* section *Cracca* (*V. monantha*, *V. tenuifolia* and *V. leucantha*) showing even an overlap among these three taxa.

### **Ecogeographic diversity**

The results of the ecogeographic survey elucidate each taxon geographic and ecological location, and thus which areas could most profitably be targeted for future collecting missions. The use of Global Positioning Systems (GPS) in the present study is supported by the fact that GPS are becoming more common. It is hoped that the number of collectors that record a latitude, longitude and altitude at each site of collection will increase as recommended by Bennett and Maxted (1997). Passport data have an important role in determining the distribution of taxa and their ecogeographical requirements. According to Van De Wouw *et al.* (2001), in the Mediterranean region, there is a need for more collection in Algeria, Egypt and Yemen.

The wide geographic ranges found in the present work may explain the high degree of variation among taxa and should be taken into account both in conservation programs and in the genetic improvement of this economically important wild *Vicia* species as suggested by El Bakatoushi and Ashour (2009). The UPGMA analysis based on ecogeographic parameters shows that the cluster I comprises 6 accessions all belonging to *V. lutea* collected from sites characterized by humid bioclimate. The cluster II contains the remaining accessions and is further divided into two subclusters. IIa comprises accessions belonging to the seven taxa studied with MSA, SH, HAS and one accession (12) belonging to LSA. IIb is composed of samples all belonging to *V. monantha*. (MSA, HAS, SH, LH). Remember that the lowest distance for morphology was obtained between 26 and 74 belonging to *V. monantha*. These two accessions have a distance of  $d=477$  for ecogeography and are placed in the same subcluster (IIb1). They belong to two different bioclimates: SH (accession 26) and HAS (accession 74). When, the higher distance concerning morphology was observed between 97 (*V. tenuifolia*) and 34 (*V. narbonensis*) placed in the subcluster IIa and distant of  $d= 240$ . These two accessions belong to MSA (sample 34) and SH (sample 97) bioclimates. Concerning ecogeography, the higher distance is obtained

between 91 (*V. monantha*, SH) and 87 (*V. lutea*, LH), the lowest distance is observed between 55 (*V. narbonensis*) and 58 (*V. lutea*) with relatively high distance ( $d=7.14$ ) regarding morphological traits. Cluster analysis also confirms that the groups can sometimes comprise accessions with close geographic origin as for the cluster I composed of accessions of *V. lutea* and the subcluster IIb which contains samples belonging to *V. monantha*. The same findings were done by Potokina et al. (2002). These results show that accessions with high morphology differences and belonging to different species/subspecies can have an identical bioclimate and close altitudes. An example can be given for the sample 100 (*V. leucantha*) which appears as a sister taxa of accessions 81 (*V. narbonensis*) and 4 (*V. lutea*). It is collected from the same station of sample 84 (*V. monantha*). These four different taxa belong to stations with the same bioclimate (HAS). On the other hand, the groups may comprise accessions from similar latitudes and climates. The same findings were done by Van de Wouw *et al.* (2003). The dendrogram obtained with ecogeographic parameters did not indicate clear division among accessions based on their geographical locations. There was no clear clustering pattern of geographically closer accessions, indicating that the association between genetic similarity and geographical distance was less significant. The same findings were reported by Chung et al. (2013). However, it is necessary to use a larger number of accessions from each geographical location to confirm the available pattern. Considering all stations of the current work, the studied samples of *Vicia* L. occur from 11 to 1222m. Algeria has all the Mediterranean bioclimates from the perhumid in the north to the perarid in the south for the bioclimatic levels and from the cold to the hot for their temperature variants. Sites investigated belong to 6 different bioclimates (SH, SAS, SAM, SA, AS, SAI) and are characterized by cool, wild, warm or tempered winter with a minimum average temperature ranged from 0.63 to 8.64°C. Samples of *V. narbonensis* were collected from sites receiving between 382.95 and 697.18 mm of precipitations and belonging to bioclimates characterized by cool or mild winter. This is consistent with findings of Bennett and Maxted (1997) who reported that the *V. narbonensis* complex taxa occur over a wide range of altitudes, from sea level to 3200m. According to Abd El Moneim (1992), *V. narbonensis* shows adaptation in areas receiving 250–300 mm annual rainfall with low winter temperatures. Accessions 74, 77, 91 and 98 belonging to *V. monantha* occur until 1222m and at these altitudes they require some frost tolerance as the temperatures can drop to 0.63°C as in the case of the accession 98. It is interesting to mention that it is from  $m = 1$  and not  $m = 0$ , as the risk of frost become important (Le-Houerou 1969). The patterns described above are not necessarily a true indication of the preferred altitude of each taxon but may reflect the number of collections that occurred at each altitude.

## Conclusion

To sum up, the present study is the first attempt to analyse phylogenetic relationships among some Algerian species of genus *Vicia* using cladistic analysis of 78 morphological characters and 5 ecogeographic parameters. The morphological analysis indicated some degree of similarity among the species. Section *Narbonensis* (*V. narbonensis*) and *Hypechusa* (*V. lutea*) was considered a separate group, while section *Cracca* was the most heterogeneous section. Significant differences at subspecies level were observed regarding the results of investigated morphological traits. It should be emphasized that morphology-based cladistic trees provide only preliminary phylogenetic hypotheses that should be tested with the use of DNA markers in future studies. The genus is well placed to help meet the increased global demand for animal feed and to provide crops for a diversity of farming systems. It is therefore important to ensure that its genetic resources are conserved and available for further crop development. It can be hoped that an increasing knowledge of the importance of collecting complementary detailed geographic and ecological data for herbarium and seed collections, combined with an increase in the use of GPS, will improve the degree of confidence that can be placed in ecogeographic studies. Several studies have mapped the distributions of the *Vicia* species. Their results must be used in conjunction with those described in this study to provide further information on the ecogeography of *Vicia* species. A comprehensive study covering all *Vicia* species would be necessary to make a more thorough classification. To clarify the position of species, collections need to be made in Algeria and grown for further identification in the same location. There is still a need to produce, preferably online, catalogues for *Vicia* cultivars and species along with characterisation and evaluation data.

## References

- Abd El Moneim AM. (1992) Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L.): A Potential Feed Legume Crop for Dry Areas in West Asia. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 169(5): 347–353
- Alefeld F (1860). *Hypechusa*, nov. gen. Viciearum”, “*Osterreich. Bot. Zeitschr*, 19: 165–166.
- Ball PW (1968) *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (eds.) *Flora Europaea*, vol.2, *Rosaceae* to *Umbelliferae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 129–136.
- Bennett S.J, Maxted N (1997) An ecogeographic analysis of the *Vicia narbonensis* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44: 411-428
- Caputo P, Frediani M, Venora G, Ravalli C, Ambrosio M, Cremonini R (2006) Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in subgenus *Vicia*: III. The heterogeneous section *Hypechusa*. *Protoplasma* (2006), 228: 167–177
- Chung JW, Kim TS, Suresh S, Lee SY, Cho GT (2013) Development of 65 novel polymorphic cDNA-SSR markers in common vetch (*Vicia sativa* subsp *sativa*). *Molecules*, 18(7): 8376–8392.

- Davis PH, Plitmann U (1970) *Vicia* L. In: Davis PH. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands. University Press, Edinburgh, pp. 274–321.
- Diklik N (1972b) *Vicia* L. – Pp. 315 – 355 in: Josifovi6 M. (ed.), Flore SR Srbije 4. – Beograd: Srpska Akad. Nauka i Umetnosti
- El Bakatoushi R, Ashour FM (2009) Genetic diversity among some *Vicia narbonensis* L. varieties as revealed by karyotype and protein analysis. *Egypt. J. Genet. Cytol.* 38: 85-97
- Emberger L (1955) Une classification biogéographique des climats. *Rev. Trav. Lab. G,ol. Bot. et Zool., Fac. Sc. Montpellier* 7 : 1-43.
- Endo Y, Ohashi H (1996) The infrageneric position of East Asian species of *Vicia* (Leguminosae). *J. Jpn. Bot.*, 71: 254–262.
- Enneking D (1995) The toxicity of *Vicia* species and their utilization as grain legumes. Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (CLIMA) Occasional Publication 6. Nedlands: CLIMA.
- Fedchenko B.A (1948) *Vicia* L. In: Shishkin BK, Bobrov EG. (eds.) Flora of the USSR 13. Moscow, pp. 406–475.
- Frediani M, Caputo P, Venora G, Ravalli C, Ambrosio M, Cremonini R (2005) Nuclear DNA contents, rDNAs and karyotype evolution in subgenus *Vicia*: II. Section *Peregrinae*. *Protoplasma* 226: 181–190
- Gunn C.R (1970) A key and diagrams for the seeds of one hundred species of *Vicia* (Leguminosae). *Proceedings of the International Seed Testing Association*, 35: 773–790.
- Gunn C.R (1979) Genus *Vicia* with notes about tribe *Vicieae* (Fabaceae) in Mexico and Central America. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin No. 1601. 41 pp.
- Hanelt P, Mettin D (1989) Biosystematics of the genus *Vicia* L. (Leguminosae). *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 20: 199–223.
- Jaaska V (1997) Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae). *Genet. Res. Crop Evol.*, 44: 557–574
- Jaaska V, Leht M (2007) Phylogenetic relationships between and within sections *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Peregrinae* of genus *Vicia* (Fabaceae) based on evidence from isozymes and morphology. *CEJB*, 2(1): 137–155
- Kupicha F.K (1976) The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 34: 287–326.
- Le Houerou H.N (1969) La végétation de la Tunisie steppique. *Ann. Inst. Nat. Rech. Agro. Tunis.*, 42 (5), 624 p
- Leht M (2009) Phylogenetics of *Vicia* (Fabaceae) based on morphological data. *Feddes Repertorium*, 120:7–8, 379–393
- Leht M, Jaaska V (2002) Cladistic and phenetic analysis of relationships in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) by morphology and isozymes. *Pl. Syst. Evol.*, 232: 237–260.
- Mantel N (1967) Adaptation of Karber's method for estimating the exponential parameter from quantal data, and its relationship to birth, death, and branching processes. *Biometrics*, 23: 739–746.
- Maxted N (1993a) A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Vicieae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 111: 155–182.
- Maxted N (1994) A phenetic investigation of *Vicia* section *Peregrinae* Kupicha (Leguminosae, Papilionoideae, Vicieae). *Edinb. J. Bot.*, 51: 75–97.
- Maxted N, Douglas C (1997) A phenetic investigation of *Vicia* section *Hyperchusa* (Alef.) Aschers and Graebner (Leguminosae, Papilionoideae, Vicieae). *Lagascalia*, 19: 345–370.
- Maxted N, Callimassia M.A, Bennett M.D (1991b) Cytotaxonomic studies of eastern Mediterranean *Vicia* species (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution*, 177, 221.

- Maxted N, Ford-Lloyd B.V, Hawkes, J.G (1996) Complementary conservation strategies. In N. Maxted, B.V. Ford-Lloyd and J.G. Hawkes (Eds.), *Plant genetic conservation: the in situ approach*, Chapman and Hall, London and New York, pp. 20–57.
- Maxted N (1990) IBPGR Final Report- An herbarium based ecogeographic study of *Vicia* subgenus *Vicia*. IBPGR, Rome, Italy.
- Nikiforova O.D (1988) Wild vetches of Siberia. Nauka, Novosibirsk (in Russian)
- Nouzova M, Neumann P, Navratilova A, Galbraight D.W, Macas J (2000) “Microarray-based survey of repetitive genomic sequences in *Vicia* spp”, *Plant Mol.Biol.*, 45: 229–244.
- Pavlova N.S (1989) *Vicia* L. In: *Plantae vasculares orientis extremi Sovietici*, Vol. 4, 1989, Nauka, Leningrad, pp. 293-309 (in Russian).
- Potokina E, Tomooka N, Vaughan D.A, Alexandrova T, Xu R.Q (1999) Phylogeny of *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Genet Res. Crop Evol.*, 46: 149–161
- Potokina E, Blattner R.F, Alexandrova T, Bachmann K (2002) AFLP diversity in the common vetch (*Vicia sativa* L.) on the world scale. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 58-67
- Quézel P, Santa S (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales. Tome 1. Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris, pp. 524- 531
- Radzhi A.D (1970) Conspectus systematis specierum Caucasicarum Generis *Vicia* L. Pp. 228–240 in: Tzvelev, N. N. (ed.), *Novit. Syst. Plant. Vascul.*, vol. 7. Nauka, Leningrad. [In Russian.]
- Rasulova M.R, Kamirova V.V (1978) *Vicia*: 568–588 – In: Ovtshinikov PN. (ed.), *Flora of Tadjik SSR*, vol. 5. – Nauka, Leningrad (in Russ.).
- Rouy M.G (1899) « Hieraciotheca Gallica Et Hispanica » (auctoribus C. Arvet-Touvet et G. Gautier), *Bulletin de la Société Botanique de France*, 46 :3, 193-203,
- Seltzer P (1946) *Le climat de l'Algérie*. Alger, Carbonel, 219 p.
- Shiran B, Kiani S, Sehgal D, Hafizi A, Hassan T, Chaudhary M, Raina SN (2014) Internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA resolving complex taxonomic history in the genus *Vicia* L. *Genet Resour Crop Evol.*, 61:909–925
- Stewart P (1969) Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord* 65 : 1-2
- Tamayunova A.P (1961) *Vicia* L. in: Pavlov N.V. (ed.), *Flora of Kazhak*. Kazhak Academy of Sciences, Alma-Ata., 5 :453-469 (In Russian)
- Tardi'o Pato F.J, Garcia Gonzalo P, Ortiz Marcide J.M (1998) Observaciones cariologicas en *Vicia amphicarpa* sensu lato. *Anales Jard.Bot.* Madrid, 56: 261–268.
- Tzvelev N (1980) Systema specierum generis *Vicia* L. in parte Europaea URSS. *Novitates Systematicae Plantarum Vascularium*, 17: 200–208 (in Russian).
- Tzvelev N (1989) *Vicia* L. In: Fedorov AA, ed. *Flora Partis Europaeae USSR*, vol. 6. Leningrad: Nauka, 127–147. (in Russian).
- Van De Wouw M, Maxted N, Chabane K, Ford-Lloyd B.V (2001) Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on Amplified Fragment Length Polymorphisms. – *Plant System. Evol.*, 229: 95–105.
- Van de Wouw M, Maxted N, Bria Fordlioyd B.V (2003) Agromorphological characterisation of common Vetch and its close relatives. *Euphytica*, 130(2): 281-292.
- Weber L.H, Schifino-Wittmann M.T (1999) The *Vicia sativa* L. aggregate (Fabaceae) in Southern Brazil. *Genet Res Crop Ev*, 46(3): 207-211
- Zelditch M.L, Swiderski D.L, Fink W.L (2000) Discovery of phylogenetic characters in morphometric data. In: Wiens J. J. (ed.) *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 37–83
- Zohary M (1972) *Vicia* L. In: *Flora Palestina*, Part 2. Jerusalem: Israel. Academy of Science, 194–209

**Deuxième chapitre**  
**Diversité génétique associée aux protéines**  
**de réserve de la graine et aux paramètres**  
**écogéographiques**



## Prologue

En plus des caractères morphologiques, les analyses électrophorétiques des protéines de réserve du grain peuvent être utilisées dans les investigations de la diversité génétique et l'évaluation des associations taxonomiques et génétiques dans le genre *Vicia*, sur les plans générique, spécifique et intraspécifique. Une comparaison des profils électrophorétiques des protéines du grain serait utile pour clarifier les relations parmi les espèces du genre *Vicia*

Les objectifs du présent chapitre sont :

- L'investigation des variations intra et interspécifiques des populations en réalisant une extraction séquentielle des protéines de réserve du grain représentées par les fractions albumines, globulines et prolamines, suivie d'une SDS-PAGE, afin de tester la validité de cette technique pour l'identification des taxa et l'évaluation de leur diversité. La lecture des gels a débouché sur une classification hiérarchique en clusters
- Une caractérisation écogéographique des stations de collecte a été réalisée. Une corrélation des résultats des profils protéiques avec les données climatologiques a été également entreprise.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une troisième publication scientifique : Ecogeographic variability and genetic diversity associated with seed albumins, globulins and prolamins patterns in *Vicia* taxa from Algeria, publiée dans « Botanical Studies ».

ORIGINAL ARTICLE

Open Access



# Ecogeographic variability and genetic diversity associated with seed albumins, globulins and prolamins patterns in *Vicia* taxa from Algeria

Sakina Bechkri\*, Imane Medoukali and Douadi Khelifi

## Abstract

Genetic variability was studied in 78 populations of locally collected *Vicia* L. taxa for seed albumins, globulins and prolamins patterns by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) along with an ecogeographic characterization of sites investigated. 131, 119 and 98 bands were respectively used for albumin, globulin and prolamin cluster analysis. Dendrograms based on the Jaccard index and the UPGMA method were generated and the degree of genetic diversity between and within taxa was evaluated. Five clusters were generated from albumins, six from globulins and four from prolamins patterns. The results reflect the great diversity of storage proteins and a high correlation was obtained between the three studied fractions. Several accessions present specific bands which could be used as a discriminatory marker both on intra and interspecific levels. No clear relationships were seen between the groups according to their geographical origin. Data obtained from ecogeographic investigation can be used for future collecting missions.

**Keywords:** *Vicia* L., Ecogeography, Electrophoresis, Albumins, Globulins, Prolamins

## Background

The genus *Vicia* belongs to the Legumes, family Leguminosae which is considered one of the largest families of flowering plants and represents tremendous morphological, ecological and genetic diversity. *Vicia* L. comprises about 210 species widely distributed along Europe, Asia and the American regions (Hanelt and Mettin 1989). In Algeria, there are 26 species belonging to three series (Quézel and Santa 1962). The genus *Vicia* has the capacity to fix atmospheric nitrogen (Nemecek et al. 2008). Vetch seeds contain more than 20% crude protein and relatively high amount of lysine, leucine, arginine, phenylalanine and tyrosine (Darre et al. 1998). Maxted (1993) pointed out that there had been 20 major classifications of the group since Linnaeus. Kupicha (1976) has subdivided

the genus into two subgenera (*Vicilla*, *Vicia*) which have been further subdivided into 17 and 5 sections, respectively. The subgenus *Vicia* sensu Maxted (1993) contains 9 sections including sections *Vicia*, *Hypechusa* and *Narbonensis*. Section *Cracca* sensu Kupicha (1976) belongs to subgenus *Vicilla*. Morphological approach is rather difficult to estimate the all genetic diversity in the genus (Haider and El-Shanshoury 2000). Seed proteins are physiologically stable and easy to manipulate (Ladizinsky and Hymowitz 1979). Considerable insight has been drained as to their structure and synthesis during seed development and to their role as storage proteins (Higgins 1984). Electrophoretic analysis of seed storage proteins was used in testing genetic associations in *Vicia* at generic, specific and intraspecific levels, along with morphological characterization (Ladizinsky and Hymowitz 1979; Mirali et al. 2007; Hameed et al. 2009; Emre et al. 2010). The use of gel electrophoresis of seed protein in phylogeny is supported by the fact that mature seeds possess the same protein components unchanged with age

\*Correspondence: s.bechkri@gmail.com  
Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales,  
Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Frères MENTOURI,  
25000 Constantine, Algeria

or environmental stress, and thus provide valid evidence for genetic relatedness (Crawford 1990). Potokina et al. (2003) and Mirali et al. (2007) suggested that comparison of electrophoregrams of seed proteins is useful to assess relationships among *Vicia* taxa.

The objective of the present study was to investigate intra and interspecific variations in 11 taxa belonging to sections *Vicia*, *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Cracca* by SDS-PAGE of seed albumins, globulins and prolamins to test the technique for vetches identification and to clarify the genetic diversity among *Vicia* taxa collected from different regions of the country along with an eco-geographic characterization of sites investigated as no studies have previously been reported on electrophoretic separation of the storage proteins of the given 11 *Vicia* taxa from Algeria.

**Methods**

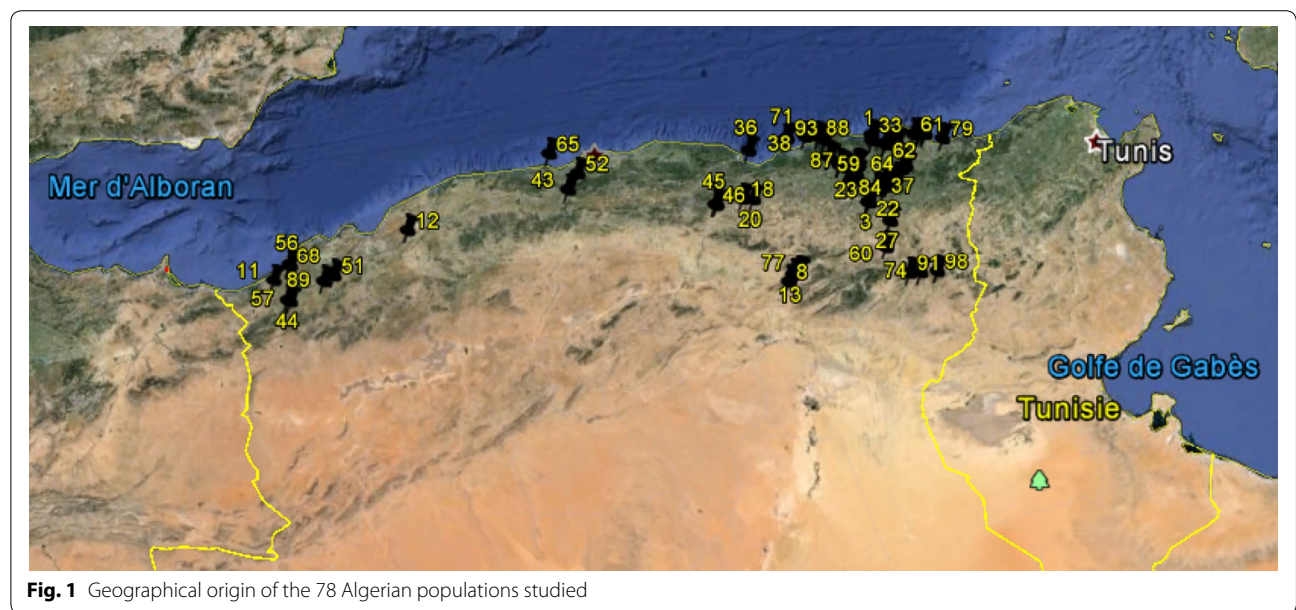
**Plant material and taxa identification**

Object of the study were 78 accessions representing 4 taxa of Sect. *Vicia*, 2 taxa of Sect. *Hypechusa*, 1 taxon of Sect. *Narbonensis* and 4 taxa of Sect. *Cracca*. Pods were randomly collected from various bioclimatic conditions of Algeria (Fig. 1). The dry seeds were stored into separate sealed paper bags at room temperature until their utilization. Informations of the investigated accessions are given in Table 1. Taxonomic identification of accessions was verified by the morphology of plants grown from seeds in a greenhouse of the laboratory of genetics, biochemistry and plants biotechnologies of Faculty of

Biology in Constantine University (eastern Algeria). Taxa identification was undertaken using the key of Quézel and Santa (1962).

**Protein sequential extraction based on solubility**

The sequential extraction was undertaken according to Freitas et al. (2000) and Riberio et al. (2004) modified. Seeds were grinded to fine powder after seed coats were removed. 10 mg of the resulting flour was defatted with n-hexane (340 µl/10 mg) for 1/4 h with agitation, decanted and dried in stove (37 °C). Albumins were extracted with water (adjusted to pH 8.0) containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM MgCl<sub>2</sub> (340 µl/10 mg) for ½ h. One mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) was added to the extraction buffer. The content was centrifuged for 20 min. at 14,000 rpm (4 °C). The supernatant was recovered and the albumins were precipitated by acetone (561 g/l). Globulins were extracted by 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 7.5–8, containing 10% (w/v) NaCl, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 10 mM ethyleneglycol bis (b-aminoethyl ether)-N, N, N0, N0-tetraacetic acid (EGTA) (340 µl/10 mg of flour) for ½ h. 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) was used to extraction buffer. The solution was centrifuged for 20 min. at 14,000 rpm (4 °C). Globulins were precipitated by acetone (561 g/l). Prolamins were extracted by 75% ethanol (50 µl/10 mg) for 20 min. with agitation at 4 °C. The prolamin-containing solution was centrifuged for 15 min. at 14,000 rpm (4 °C) and the prolamin were precipitated by acetone (500 µl).



**Fig. 1** Geographical origin of the 78 Algerian populations studied

**Table 1 Location and taxonomic identification of accessions investigated**

Species/subspecies	Code	Date of collection	Province/locality/origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)	
<i>V. sativa</i> subsp. <i>consobrina</i> (Pomel) Maire	5	28.5.14	Guelma	N36°26.187'	E007°17.772'	339	
	14	1.6.14	Annaba El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28	
	36	23.5.14	Béjaia Affalou	N36°40.381'	E005°08.903'	1	
	59	30.5.14	Jijel	N36°35.082'	E006°16.728'	141	
	64	1.6.14	Skikda Azzaba	N36°43.532'	E007°04.706'	111	
	86	13.6.14	Constantine Djbel El Ouehch	N36°23.690'	E006°39.011'	880	
	65a	9.6.14	Tipaza El Beldj Chenoua mountain	N36°37.667'	E002°21.150'	345	
	52	4.6.14	Blida National parc of Chréa	N36°24.538'	E002°45.519'	249	
	53	30.5.14	Jijel	–	–	–	
	85	1.6.14	Skikda Ain Charchar	N36°44.366'	E007°14.176'	52	
	93	30.5.14	Jijel	N36°48.699'	E005°41.679'	25	
	<i>V. sativa</i> subsp. <i>obovata</i> Gaudin	6	22.5.14	Constantine Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563
		7	30.5.14	Mila Messaoud Boudjriou	N36°29.743'	E006°25.527'	325
10		27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°28.409'	E006°38.239'	468	
17		22.5.14	Constantine Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563	
20		3.6.14	Sétif Ain arnat	N36°07.394'	E005°12.172'	866	
22		2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822	
28		30.5.14	Jijel	N36°35.094'	E006°16.732'	168	
51		6.6.14	Sidi Bel Abbes	N35°10.824'	W000°36.026'	490	
32		22.5.14	Constantine Chaab Ersas	N36°20.634'	E006°37.486'	562	
57		6.6.14	Tlemcen Ain fezza	N34°52.732'	W001°13.726'	867	
61		1.6.14	Annaba Berrahal	N36°49.826'	E007°29.000'	38	
68		6.6.14	Ain Temouchent	N35°16.464'	W001°13.836'	281	
72		28.5.14	Constantine Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847	
80		28.5.14	Constantine Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847	
<i>V. sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i> (L.) Gaudin		70	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757
	83	26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683	
	<i>V. sativa</i> subsp. <i>cordata</i> (Will) Batt.	19	18.5.14	Constantine Chaab Ersas	N36°20.634'	E006°37.486'	562
		8	26.5.14	Biskra El Kantra	N35°11.517'	E005°40.673'	467
		11	6.6.14	Tlemcen	N35°05.699'	W001°26.612'	90
		13	26.5.14	Biskra El Kantra Ain Skhoun	N35°16.087'	E005°44.174'	584
		15	1.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24
		33	29.5.14	Skikda El hadaik	N36°49.894'	E006°53.079'	26
		35	1.6.14	Annaba El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
		37	28.5.14	Guelma	N36°28.361'	E007°21.280'	223
38		10.5.14	Jijel	N36°49.348'	E005°56.706'	14	
42		28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847	
47	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604		
71	30.5.14	Jijel	N36°47.625'	E005°39.746'	17		
<i>V. lutea</i> L. <i>V. lutea</i> subsp. <i>vestita</i> (Boiss.) Rouy.	1	28.5.14	Skikda Ramdane Djamel	N36°45.977'	E006°53.432'	42	
	4	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604	
	58	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.025'	E006°40.058'	448	

**Table 1 continued**

Species/subspecies	Code	Date of collection	Province/locality/origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)	
<i>V. lutea</i> subsp. <i>eu-lutea</i> Maire	62	1.6.14	Skikda Azzaba	N36°43.531'	E007°04.708'	110	
	63	1.6.14	Skikda Ain Cherchar	N36°44.366'	E007°14.176'	52	
	79	1.6.14	El Tarf Ben M'hidi	N36°46.402'	E007°53.600'	11	
	87	30.5.14	Jijel El Milia	N36°46.668'	E006°13.551'	28	
	90	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24	
	88	30.5.14	Jijel El Ansar	N36°48.661'	E006°08.016'	30	
	3	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822	
	12	5.6.14	Relizane	N35°43.689'	E000°24.265'	105	
	26	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757	
	27	2.6.14	Oum El Bouaghi	N35°51.459'	E007°06.377'	887	
	40	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711	
	44	6.6.14	Tlemcen	N34°52.088'	W001°11.698'	843	
	<i>V. monantha</i> Retz						
	<i>V. monantha</i> subsp. <i>calcarata</i> (Desf.) Maire	45	3.6.14	Bordj Bou Areridj	N36°04.070'	E004°41.899'	923
49		28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847	
60		2.6.14	Khenchla	N35°33.685'	E007°02.177'	860	
74		14.6.14	Tébessa	N35°15.936'	E007°30.306'	1078	
77		26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683	
78		20.5.14	Constantine Coudiat	N36°21.787'	E006°36.418'	633	
84		10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586	
29		2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822	
18		3.6.14	Bordj Bou Areridj Ain taghrout	N36°07.741'	E005°03.364'	934	
98		14.6.14	Tébessa Chria	N35°16.328'	E007°44.359'	1087	
102			Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604	
43		4.6.14	Médéa Oued Harbil	N36°13.633'	E002°37.643'	464	
<i>V. monantha</i> ssp. <i>cinerea</i> (M.B.) Maire	46	3.6.14	Bordj Bou Areridj El Achir	N36°04.017'	E004°40.525'	944	
	91	14.6.14	Khenchla	N35°15.704'	E007°20.957'	1222	
<i>V. narbonensis</i> L.							
–	23	30.5.14	Constantine Hama Bouziane (Chaabet El Medhbouh)	N36°26.391'	E006°33.282'	425	
	30	30.5.14	Mila Messaoud Boudjriou	N36°29.748'	E006°25.530'	325	
	34	27.4.14	Constantine Didouche Mourad	N36°29.216'	E006°38.731'	434	
	41	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711	
	55	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.023'	E006°40.051'	443	
	66	28.5.14	Guelma	N36°19.930	E007°12.447'	698	
	81	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604	
<i>V. tenuifolia</i> Roth.							
–	56	6.6.14	Ain Temouchent	N35°16.476'	W001°13.800'	276	
	89	6.6.14	Sidi Bel Abbes Sidi Khaled	N35°06.59'	W000°44.238'	543	
<i>V. leucantha</i> Biv.							
–	100	10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586	

**Electrophoresis**

Non-reducing SDS-PAGE was undertaken according to Laemmli (1970). Bromophenol blue was added

to the extraction buffer to follow proteins movement in the gel. 15, 8 and 70 µl of respectively albumins, globulins and prolamins supernatants were placed on biphasic

**Table 2 Climatic characteristics of reference stations (2004–2014)**

Reference station	Latitude	Longitude	Alt. (m)	P (mm)	m (°C)	M (°C)
Jijel (airport)	36°48N	05°53E	8	1066.1	6.8	31.5
Skikda	36°53N	06°54E	2	829	8.8	29
Annaba	36°50N	07°48E	3	684.4	6.7	31.5
Béjaia	36°43N	05°04E	2	833	7.4	30.7
Constantine	36°17N	06°37E	693	486.6	2.2	35.2
Mila <sup>a</sup>	36°27N	06°16E	437	742	4.4	31.5
Sétif (Ain Arnat)	36°10N	05°19E	1007	401.8	−2	34.8
Oum El Bouaghi	35°52N	07°07E	889	410.4	1.1	35
Tlemcen (zenata)	35°01N	01°28W	246	359.8	6.2	33.9
Ain Temouchent <sup>a</sup>	35°17N	01°08W	235	485	6.8	30.2
Biskra	34°48N	05°44E	82	143	6.9	41.3
Guelma	36°28N	07°28E	227	622.3	4.5	36.4
Sidi Bel Abbès	35°12N	00°37W	475	375.1	2.8	36
Tipaza El Beldj <sup>a</sup>	36°38N	02°21E	22	631	8.4	30.8
Blida <sup>a</sup>	36°27N	02°44	1458	916	−0.9	28.5
Relizane	35°44N	00°32E	95	352.5	5.3	38.6
Bordj Bou Areridj	36°04N	04°46E	928	392.9	1.7	36.4
Khenchla	35°28N	07°05E	983	520.8	1.8	34.9
Tébessa	35°25N	08°07E	821	382.6	1.7	35.6
Batna	35°45N	06°19E	822	346.8	0.1	36.4
Mila <sup>a</sup>	36°27N	06°16E	437	742	4.4	31.5
Ain Temouchent <sup>a</sup>	35°17N	01°08W	235	485	6.8	30.2
El Tarf Ben M'hidi <sup>a</sup>	36°46N	07°54E	6	707	7.1	31.2
Médéa	36°17N	02°44E	1030	780	3.5	32.5

Alt altitude, P annual rainfall, M and m are the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively

<sup>a</sup> Data from "<http://climate-data.org>"

polyacrylamide gels (12%). 10 µl of a protein molecular weight marker (BIO-RAD Precision Plus Protein Standards) containing ten proteins (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 and 250 kDa) was used as standard. Tris–glycine (pH 8.3) was used as electrode buffer. Runs were carried out at a voltage of 60 V and 500 mA overnight. Gels were stained by Coomassie Brilliant Blue R, then images were scanned using ImageScannerIII.

#### Ecogeographic parameters of investigated sites

The five ecological factors of Mediterranean climate (annual rainfall, average of the maximum temperature of the hottest month, average of a minimum temperature of the coldest month, Emberger coefficient and altitude) were used to characterize sampling stations. A global positioning systems (GPS GARMIN eTrex<sup>®</sup> model 30) was used to collect coordinates of sites investigated. Data recorded to ONM (National Office of Meteorology, Algeria) were used to characterize the climate of sites investigated (Table 2). Data recorded to CLIMATE-DATA.ORG

(<http://fr.climate-data.org/>) were used for five stations (Mila, Ain Temouchent, Tipaza, El Tarf and Blida).

#### Climatic data correction

Correction of precipitations and temperatures data based on extrapolations for different altitudinal points were undertaken (Table 3), according to the works of Seltzer (1946) as explained by Bechkri and Khelifi (2016).

#### Calculation of the bioclimatic coefficient of Emberger (1955) and definition of the bioclimate

The pluviothermic Emberger quotient (Q2) is determined by three major climate factors. Stewart's formula (1969) was used in the present study. Details of calculations were reported by Bechkri and Khelifi (2016).

#### Data analysis

The mobility and the frontal report of each band were calculated. The size marker standard curve was traced. The graphical equation and the coefficient of determination

**Table 3 Corrected climatic data and Emberger quotient calculation of sampling sites of accessions studied**

Station code	Alt. (m)	K	P (mm)	m (°C)	M (°C)	Q2	Bioclimate
5	339	1.0719	667.04	4.05	35.71	72.25	SH-temperate winter
14	28	1.0292	704.38	6.6	31.32	97.71	SH-mild winter
36	1	0.9990	832.16	7.40	30.70	122.48	SH-warm winter
59	141	1.0998	1172.49	6.26	30.56	165.49	LH-mild winter
64	111	1.1051	916.12	8.36	28.93	152.73	LH-warm winter
86	880	1.1537	561.39	1.45	33.89	59.35	HSA-cool winter
65a	345	1.4095	889.39	7.10	28.53	142.34	LH-warm winter
52	249	0.4720	432.35	3.93	36.96	44.90	MSA-temperate winter
93	25	1.0127	1079.63	6.73	31.38	150.23	LH-mild winter
6	563	1.1068	538.56	2.72	36.11	55.32	HSA-ool winter
7	325	0.9396	697.18	4.84	32.28	87.16	SH-mild winter
10	468	0.8150	396.57	3.1	36.77	40.39	MSA-temperate winter
17	563	1.1068	538.56	2.72	36.11	55.32	HSA-cool winter
20	866	0.8596	345.38	1.43	35.78	34.48	LSA-cool winter
22	822	0.9346	383.55	1.36	33.40	39.38	MSA-cool winter
28	168	1.1200	1194.03	6.16	30.38	169.09	LH-mild winter
32	562	1.1076	538.95	2.72	36.11	55.35	HSA-cool winter
51	490	1.0159	381.06	2.74	35.89	39.42	MSA-cool winter
57	867	1.6903	608.16	3.71	29.55	80.73	SH-temperate winter
61	38	1.0409	712.39	6.56	31.25	98.94	SH-cool winter
68	281	1.0379	503.38	6.61	29.87	74.22	SH-mild winter
72	782	1.0731	522.17	1.84	34.57	54.71	HSA-cool winter
80	782	1.0731	522.17	1.84	34.57	54.71	HSA-cool winter
70	757	1.3406	834.25	0.79	32.79	89.42	SH cold winter
83	683	0.8396	291.17	0.65	37.37	27.20	HA-cold winter
19	562	1.1076	538.95	2.72	36.11	55.35	HSA-cool winter
8	467	2.0769	296.99	5.36	38.60	30.64	HA-mild winter
11	90	0.8265	297.37	6.82	34.99	36.21	HA-mild winter
13	584	2.4041	343.78	4.89	37.78	35.84	HA-mild winter
15	24	1.0245	701.16	6.61	31.35	97.22	SH-mild winter
33	26	1.0231	848.14	8.70	29.53	139.67	SH-warm winter
35	28	1.0292	704.38	6.6	31.32	97.71	SH-mild winter
37	223	1.0025	611.62	4.51	36.52	65.53	SA-mild winter
38	14	1.0045	1070.9	6.77	31.45	148.82	LH-mild winter
42	847	1.1265	548.15	1.58	34.12	57.78	HSA-cool winter
47	604	0.9268	450.98	2.55	35.82	46.49	HSA-cool winter
71	17	1.0067	1108.4	6.76	31.43	154.13	LH-mild winter
85	52	1.0482	868.95	8.6	28.65	148.65	LH-warm winter
1	42	1.0386	860.99	8.64	28.72	147.07	LH-warm winter
4	604	0.9268	450.98	2.55	35.82	46.49	HSA-cool winter
58	448	0.7986	388.59	3.18	36.91	39.52	MSA-temperate winter
62	110	1.1042	701.16	8.36	28.24	120.97	SH-warm winter
63	52	1.0482	868.95	8.6	28.65	148.65	LH-warm winter
79	11	1.0056	710.93	7.08	31.16	101.27	SH-warm winter
87	28	1.0150	1082.09	6.72	31.36	150.63	LH-mild winter
90	24	1.0245	701.16	6.61	31.35	97.21	SH-mild winter
88	30	1.0165	1083.69	6.71	31.34	150.91	LH-mild winter
3	822	0.9346	383.56	1.36	35.46	38.58	MSA-cool winter
12	105	1.0113	356.48	5.26	38.53	36.75	LSA-mild winter

**Table 3 continued**

Station code	Alt. (m)	K	P (mm)	m (°C)	M (°C)	Q2	Bioclimate
26	755	1.3393	833.44	2.38	32.80	93.97	SH-cool winter
27	887	0.9980	409.57	1.108	35.014	41.43	MSA-cool winter
40	711	1.3111	815.89	2.56	32.80	92.54	SH-cool winter
44	843	2.3274	837.39	3.81	29.72	110.85	LH-temperate winter
45	923	0.9949	390.89	1.72	36.43	38.63	MSA-cool winter
49	847	1.1265	548.15	1.58	34.12	57.78	HSA-cool winter
60	860	0.9055	471.58	2.29	35.76	48.33	HSA-cool winter
74	1078	1.2686	485.36	0.67	33.80	50.25	HSA-cold winter
77	683	0.8396	291.17	0.65	37.37	27.20	HA-cold winter
78	633	0.9506	462.56	2.44	35.62	47.82	HSA-cool winter
84	586	0.9120	466.85	2.62	35.94	48.06	HSA-cool winter
98	1087	1.2780	488.96	0.63	33.73	50.67	HSA-cold winter
102	604	0.9268	450.98	2.55	35.82	46.49	HSA-cool winter
43	464	0.7097	553.56	5.76	36.46	77.08	SH-mild winter
29	822	0.9346	383.56	1.36	35.46	38.58	MSA-cool winter
18	934	1.0061	395.29	1.67	36.35	39.10	MSA-cool winter
46	944	1.0162	399.26	1.63	36.28	39.52	MSA-cool winter
91	1222	1.1835	616.36	0.84	33.22	65.29	SH-cold winter
23	425	0.7796	379.35	2.62	35.94	39.05	MSA-cool winter
30	325	0.9396	697.18	4.84	32.28	87.15	SH-mild winter
34	434	0.7870	382.95	3.23	37.01	38.88	MSA-temperate winter
41	711	1.3111	815.89	2.56	33.12	91.58	SH-cool winter
55	443	0.7944	386.55	3.2	36.95	39.28	MSA-temperate winter
66	698	1.4	871.22	2.61	33.20	97.68	SH-cool winter
81	604	0.9268	450.98	2.55	35.82	46.49	HSA-cool winter
56	276	1.0338	501.38	6.63	29.91	73.87	SH-mild winter
89	543	1.0725	402.29	2.52	35.52	41.81	MSA-cool winter
100	586	0.912	466.85	2.62	35.94	48.06	HSA-cool winter

K correction factor, Alt altitude, P annual rainfall, M and m the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively, Q2 Emberger coefficient, SH subhumid, LH less humid, HSA higher semiarid, HA higher arid, MSA means semiarid, LSA less semiarid, SA semiarid

allowed the calculation of the molecular weight of each band. In this method, “absence” contributed equally to “presence” in the calculation of dissimilarity. Present bands were scored 1 and absent bands were scored 0. For each fraction, a binary matrix was constructed. A dendrogram was produced by the UPGMA based on Jaccard index (J) between protein patterns. Analyses were carried out using XLSTAT (Pearson edition, version 2014.5.03). For ecogeographic parameters, Euclidean distances (Romesburg 1990) were used in the estimation of the genetic resemblance. Matrix including the five ecological parameters of each accession was used to elaborate a dendrogram using UPGMA. Analyses were carried out with STATISTICA (version 6.1 program). The possible correlation between albumins, globulins and prolamins patterns, was evaluated by a Mantel test (Mantel 1967) based on Pearson’s correlation (XLSTAT Pearson edition, version 2014.5.03). The same test was used to test

geographical matrix with seed albumins, globulins and prolamins matrices.

## Results

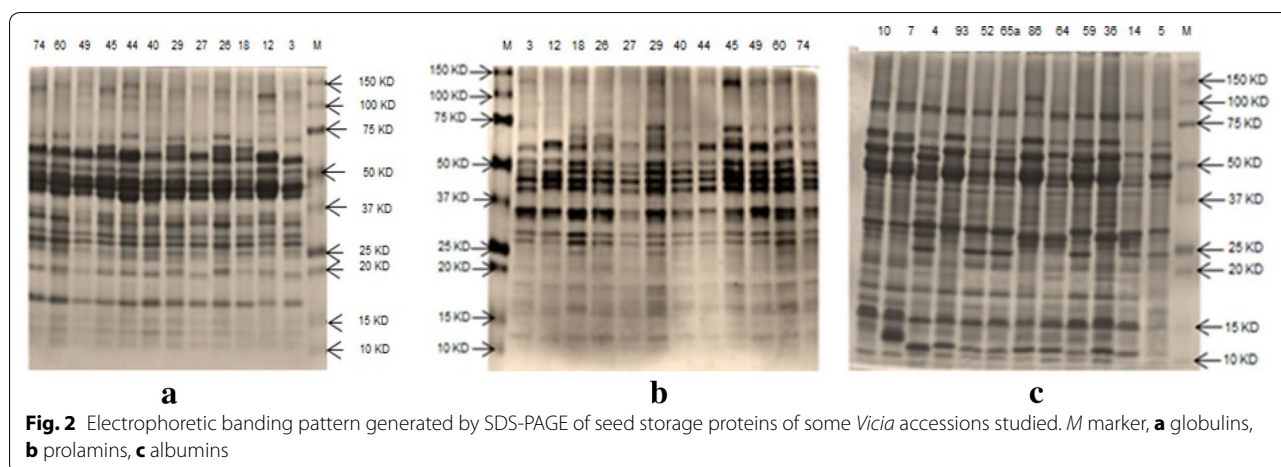
### Seed proteins variability

The three fractions electrophoregrams are represented by some accessions illustrated in Fig. 2. Figure 3 presents dendrograms generated using UPGMA and Jaccard’s index.

### Albumins patterns

A total of 131 bands were detected with molecular weights ranged from 3.23 to 148.17 kDa. Each profile presents between 11 and 26 bands. All samples had more than one seed protein pattern. Intra-accessional diversity was also investigated by examining populations of the same taxa. The largest number of bands (25) is obtained in *V. monantha* subsp. *calcarata*, *V. tenuifolia*



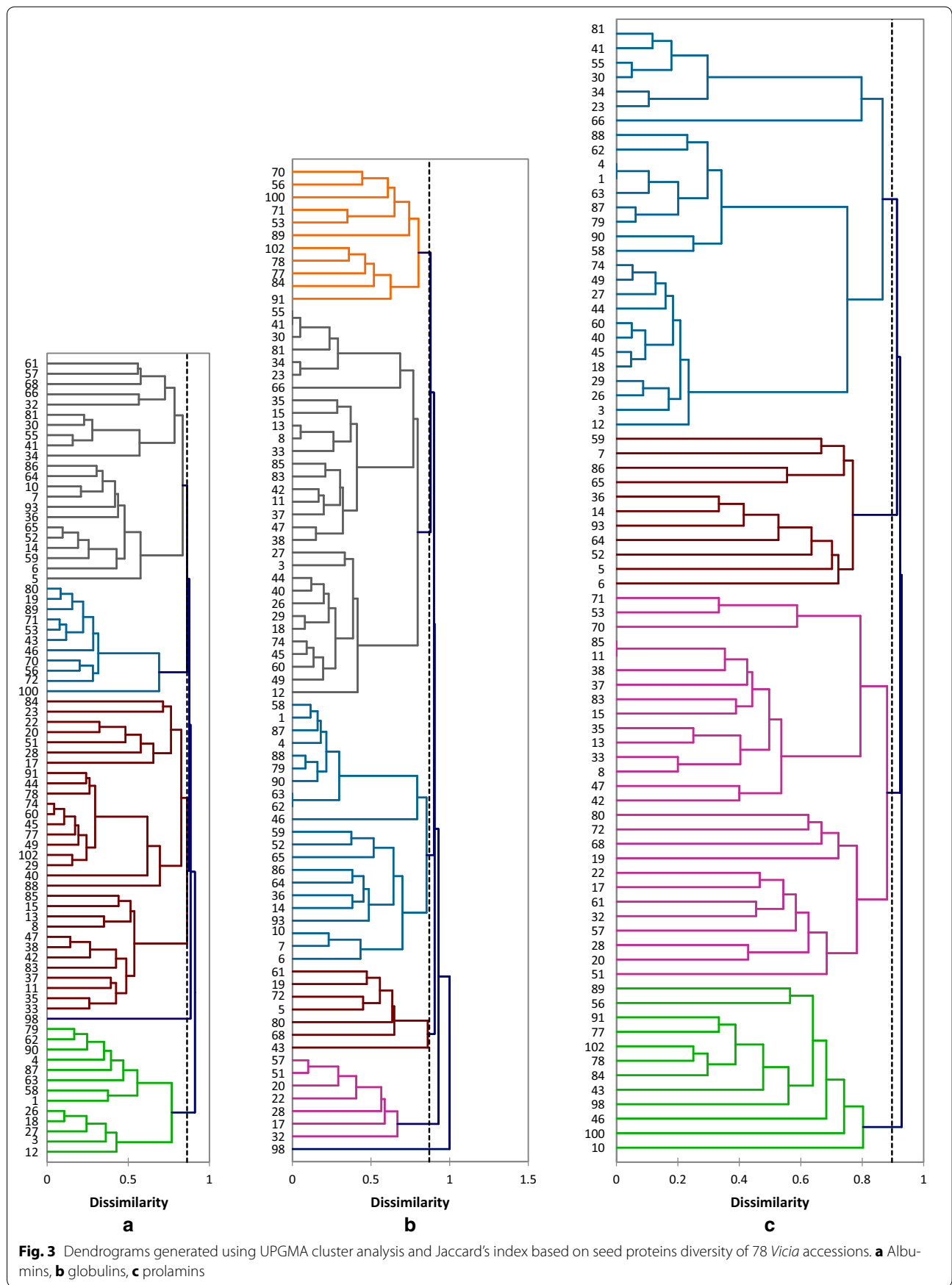


and *V. sativa* subsp. *obovata*. The lowest number (11) is obtained in *V. lutea* subsp. *vestita*. The band 37.73 kDa is the most common as it appears in 48 profiles followed by the band 9.19 kDa appeared in 43 profiles and the band 24.22 kDa observed in 40 profiles. In parallel, bands 3.23, 9.46, 15.81, 19.80, 24.87, 25.97, 46.86, 63.69, 66.34, 76.29, 99.86, 113.50 and 125.98 kDa are the least common as they are specific for one accession and appear each in 1 profile, followed by bands 8.85, 14.93, 16.72, 42.84, 75.43, 77.31, 82.63 and 88.47 kDa appeared each in two profiles. The cluster analysis indicated the discrimination into five groups at 0.86 Jaccard distance (Fig. 3). The first cluster can be divided into two groups, the first one includes accessions 12, 3, 27, 18, 26. The second one regroups samples 1, 58, 63, 87, 4, 90, 62 and 79. The cluster II is divided into 2 sub-clusters. The first one contains samples 5, 6, 59, 14, 52, 65, 36, 93, 7, 10, 64 and 86. The second one can further be divided into two groups: II2a contains accessions 34, 41, 55, 30 and 81. II2b is composed of samples 32, 66, 68, 57, 61. The cluster III regroups two sub-clusters. The first one contains accessions 33, 35, 11, 37, 83, 42, 38. The second one is further divided into two groups: III2a comprises sample 88 linked to 40, 29, 102, 49, 77, 45, 60, 74, 78, 44 and 91. III2b contains accessions 17, 28, 51, 20, 22, 23 and 84. The cluster IV comprises the sample 100 one side and accessions 72, 56, 70, 46, 43, 53, 71, 89, 19 and 80 another side. Finally, the cluster V contains the sample 98 ( $J = 0.88$ ). The proximity matrix using Jaccard index shows that the higher distance ( $J = 1$ ) is observed between the following couples: 17-4, 1-30, 1-32, 1-37, 1-41, 1-81, 4-28, 4-32, 4-84, 6-63, 6-87, 7-87, 63-10, 87-10, 14-63, 14-87, 17-63, 28-63, 30-58, 32-58, 62-32, 79-32, 32-90, 37-90, 58-37, 37-62, 41-58, 41-1, 52-87, 55-1, 55-58, 58-81, 66-58, 58-41, 58-30, 58-32, 59-63, 87-59, 63-93, 63-84, 63-7, 63-23, 63-52, 63-64, 63-65, 64-87, 65-87, 1-66, 79-32, 87-93, 87-65. The lower distance ( $J = 0.10$ ) is obtained between 18 and 26. A

distance of 0.16 is observed between 43 and 19. Between 89 and 19, a distance of  $J = 0.15$  is observed. A distance of 0.17 is obtained between 90 and 62.

#### Globulin patterns

A total of 119 bands were obtained with molecular weights ranged from 2.77 to 131.88 kDa. Each profile presents between 6 and 27 bands. Two accessions (41 and 55) showed a unique protein pattern; the remaining accessions had more than one protein pattern. The largest number of bands (27) is observed for accessions 43 (*V. monantha* subsp. *calcarta*) and 87 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*). The lowest number (6) is obtained for samples 17 and 32 belonging to *V. sativa* subsp. *obovata*. The band 35.53 kDa is the most common as it appears in 52 profiles, followed by the band 49.45 kDa observed in 45 profiles and the band 33.44 kDa found in 37 profiles. In another side, bands 5.10, 5.46, 51.74, 67.97, 78.27, 85.47, 95.33, 100.77, 103.66, 104.69, 115.04, 119.96, 130.35 kDa are the less common as they appear each in one profile, followed by bands 16.86, 18.39, 19.11, 28.98, 37.69, 47, 38.87, 68.53, 86.70 and 131.88 kDa found in two profiles. Six major clusters were obtained at the distance of 0.87 (Fig. 3b). The cluster I is further divided into two sub-clusters (I1, I2). I1 includes the accession 46 linked to 62, 63, 90, 79, 88, 4, 87, 1 and 58. I2 can be divided into two groups. The first one (I2a) includes 59, 52, 65, 86, 64, 36, 14 and 93. The second one (I2b) contains samples 6, 7 and 10. The cluster II is divided into two subclusters (II1, II2). II1 comprises two groups. II1a contains accessions 55, 41, 30, 81, 34, 23. II1b is composed of 35, 15, 13, 8, 33, 85, 83, 42, 11, 37, 47, 38. II2 comprises sample 12 linked to 49, 60, 45, 74, 18, 29, 26, 40, 44, 3 and 27. Cluster III contains sample 43 linked to accessions 68, 80, 5, 72, 19 and 61. The cluster IV ( $J = 0.92$ ) comprises samples 32, 17, 28, 22, 20, 51 and 57. The cluster V ( $J = 0.87$ ) is divided into two sub-clusters. V1 includes 70, 56, 100,



71, 53 and 89. V2 contains samples 102, 78, 77, 84 and 91. The accession 98, being itself the cluster VI at  $J = 1$ . The dissimilarity matrix shows that a distance of 0.00 is observed between couples: 62-63, 55-41. A low distance of 0.11 is observed between samples 1 and 58. Between accessions 1 and 4, a distance of 0.14 is observed. Samples 58 and 4 are distant by  $J = 0.18$ . A distance of 0.14 is obtained between 1 and 87. Samples 4 and 88 have a distance of 0.15. The higher distance ( $J = 1$ ) is observed between 98 and all other accessions. The same distance is observed for the following couples: 5-66, 5-34, 5-22, 5-23, 10-20, 10-22, 72-17, 68-17, 46-17, 43-17, 19-17, 81-19, 84-19, 66-19, 65-19, 55-19, 57-19, 51-19, 41-19, 32-19, 34-19, 23-19, 20-52, 22-80, 22-72, 22-68, 22-62, 22-63, 22-52, 22-46, 22-28, 22-19, 19-30, 32-43, 32-46, 32-68, 32-71, 46-51, 46-57, 51-68, 51-72, 57-72, 93-61, 100-65, 93-80, 98-100 and 98-102.

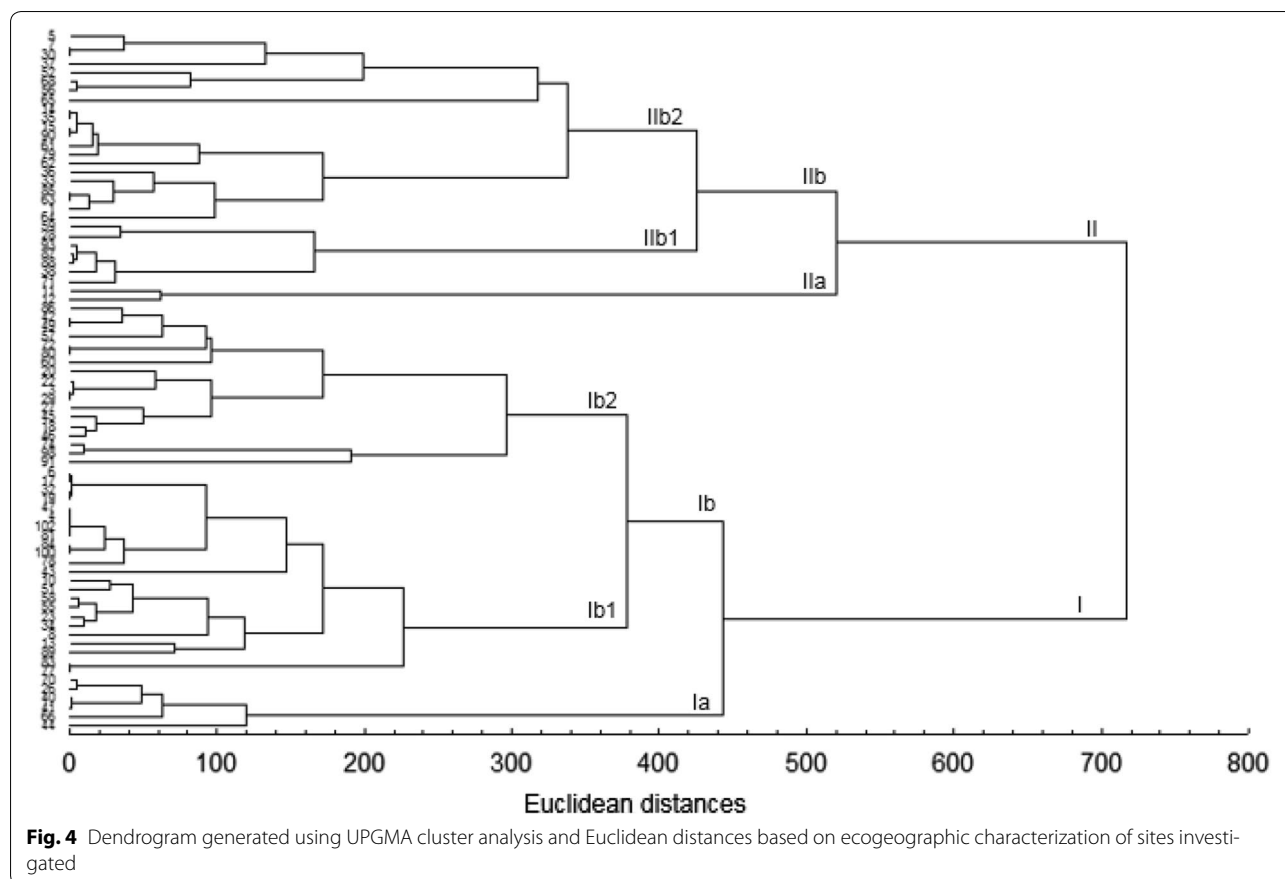
#### Prolamin patterns

A total of 98 bands were obtained with molecular weights ranged from 11.36 to 137.638 kDa. Each profile presents between 6 and 24 bands. Two accessions (1 and 4) showed a single protein pattern; the remaining accessions had more than one seed protein pattern. The largest number of bands (24) is observed in patterns 58 (*V. lutea* subsp. *vestita*) and 62 (*V. lutea* subsp. *eulutea*). The lowest number (6) is obtained for samples 19 (*V. sativa* subsp. *angustifolia*), 7 and 51 both belonging to *V. sativa* subsp. *obovata*. The band 17.65 kDa is the most common as it appears in 46 profiles followed by the band 41.49 kDa appeared in 39 profiles and the band 35.53 kDa observed in 29 profiles. Bands 12.44, 51.51, 53, 56.62, 78.57, 83.92, 89.03, 94.53, 104.51, 105.45, 115.08, 118.17 and 137.63 kDa are the less common as they appear in one profile each, followed by bands 29.49, 66.63, 68.33, 81.77, 85.10, 106.71, 109.03 and 127.97 kDa obtained each in two profiles. The UPGMA generated four major clusters at the distance of  $J = 0.89$ . The first cluster (I) is divided into two sub-clusters (I1, I2). I1 includes samples 81, 41, 55, 30, 34, 23 and 66. I2 can further be divided into two groups (I2a, I2b). I2a contains accessions 88, 62, 4, 1, 63, 87, 79, 90 and 58. I2b is composed of 74, 49, 27, 44, 60, 40, 45, 18, 29, 26, 3 and 12. The cluster II comprises two sub-clusters (II1, II2). II1 contains accessions 59, 7, 86, 65. II2 includes 36, 14, 93, 64, 52, 5 and 6. The cluster III ( $J = 0.92$ ) comprises two sub-clusters (III1, III2). III1 is composed of accessions 71, 53 and 70 in the group III1a and accessions 85, 11, 38, 37, 83, 15, 35, 13, 33, 8, 47 and 42 in the group III1b. The sub-cluster III2 includes two groups. III2a contains accessions 80, 72, 68 and 19. III2b is composed of 22, 17, 61, 32, 57,

28, 20 and 51. The cluster IV includes samples 89, 56, 91, 77, 102, 78, 84, 43, 98, 46, 100 and 10. The proximity matrix using Jaccard's index shows that a distance of  $J = 0$  is observed between samples 1 and 4. The same distance is obtained between accessions 11 and 85. Between accessions 40 and 60, a distance of 0.05 can be observed. A distance of 0.08 is obtained between samples 26 and 29. A low distance of 0.10 can be observed for the couples: 1-63, 4-63, 23-34, 55-81, 60-74. Between samples 3 and 29, 63 and 87, a distance of  $J = 0.16$  is observed. Samples 41 and 81, 63 and 79 are distant by 0.11. A distance of 0.17 is obtained for: 3-26, 26-18, 49-29. Samples 49 and 12 are distant by  $J = 0.19$ . A distance of 0.18 is observed between accessions 12 and 26 and accessions 26 and 49. Accessions 26-27, 26-74 and 45-49 are distant by  $J = 0.14$ . A distance of 0.15 is observed for accessions 27-49 and 30-81. Couples 29-60 and 29-45 have a distance of 0.13. The higher distance ( $J = 1$ ) is obtained for a large number of couples as for: 1-84, 1-100, 3-65, 3-59, 3-32, 3-28, 3-20, 4-84, 4-100, 5-100, 5-80, 5-72, 5-68, 5-61, 5-57, 5-51, 5-43, 5-34, 5-32, 5-28, 5-23, 5-19, 5-20, 5-22, 5-17, 6-43, 6-102, 7-102, 7-100, 7-91, 7-84, 7-77, 7-78, 7-66, 7-61, 7-46, 7-51, 7-43, 7-32, 7-33, 7-28, 7-20, 7-22, 7-17, 7-13, 7-8, 8-19, 8-43, 8-46, 8-56, 8-59, 8-65, 8-77, 8-78, 8-84, 8-86, 8-91, 8-98, 8-100, 8-102, 10-61, 10-57, 10-32, 10-28, 10-20, 11-19, 11-43, 11-46, 11-56, 11-59, 11-65, 11-77, 11-78, 11-84, 11-86, 11-91, 11-98, 11-100, 11-102, 12-65, 12-61, 12-59, 12-51, 12-32, 12-28, 12-19, 12-20, 13-19, 13-46, 13-56, 13-59, 13-65, 13-77, 13-98, 13-100, 13-72, 13-68, 13-61, 13-46, 13-51, 13-43, 13-32, 13-28, 13-20, 13-22, 13-17, 15-59, 15-65, 15-86, 17-86, 17-64, 17-65, 17-59, 17-52, 17-36, 18-20, 18-28, 18-32, 18-51, 18-59, 18-61.

#### Mantel test

A Mantel test based on Pearson's correlation was used to highlight correlations between the matrices of albumins (matrix A), globulins (matrix B) and prolamins (matrix C). The  $p$  value was calculated from the distribution of  $r(AB)$  using 10,000 permutations with the value of  $r(AB.C) = 0.3099$ . This test showed significant correlation between the three fractions studied since the calculated  $p$ -value ( $<0.0001$ ) is below the significance level of  $\alpha (0.05 = 5\%)$ . Concerning the correlation between ecogeography and seed proteins,  $r$  values were  $-0.0012$ ,  $-0.0039$  and  $0.0166$  respectively for albumins, globulins and prolamins.  $p$ -values are 0.8233, 0.9319 and 0.3689 respectively for the three fractions. Thus, Mantel test showed no significant correlation between ecogeography and protein patterns since the calculated  $p$ -values are below the significance level of  $\alpha$ .



**Cluster analysis based on ecogeographic data**

The dendrogram illustrated in Fig. 4 shows the relationships between these taxa, based on the variation in the five ecogeographic parameters studied. At the Euclidean distance of 716.43, the dendrogram can be divided into two major clusters (I and II). The first one is further divided into two sub-clusters (Ia and Ib). Ia ( $d = 119.65$ ) comprises samples 44, 66, 41, 40, 26 and 70 belonging to 2 bioclimates (LH–SH). Ib can be divided into Ib1 ( $d = 226.96$ ) and Ib2 (295.93). Ib1 contains the sample 77 (HA) linked to accessions 83, 89, 13, 8, 34, 23, 55, 58, 51, 10, 43, 78, 100, 84, 81, 102, 4, 47, 19, 32, 17 and 6 from 4 bioclimates (HA–MSA–SH–HSA). Ib2 ( $d = 295.93$ ) is composed of samples 91, 98, 74 belonging to 2 bioclimates (SH–HSA) linked to 46, 18, 45, 27, 29, 3 (MSA) then 22, 20, 60, 80, 72, 57, 49, 42 and 86. (MSA–LSA–HSA–SH). The second cluster comprises subclusters IIa which contains samples 12 (LSA) and 11 (HA) and IIb. The latter comprises groups IIb1 ( $d = 165.56$ ) composed of accessions 71, 38, 88, 87, 93, 28 and 59 belonging to 1 bioclimate (LH) and IIb2 which can further be divided into two groups: At a distance

of  $d = 172.22$ , the first group contains accessions 64, 1, 63, 85, 33, 36, 62, 79, 61, 90, 15, 35 and 14 collected from two bioclimates (LH–SH). The second group ( $d = 317.53$ ) comprises sample 65 (LH) linked to accessions 56, 68, 52, 37, 30, 7 and 5 (SH–MSA–SA). The higher distance ( $d = 1286$ ) is observed between 91 (*V. monantha* subsp. *cinerea*, SH) and 93 (*V. sativa* subsp. *consobrina*, LH). A distance of  $d = 1284$  is obtained between 87 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*, LH) and 91. The distance of  $d = 0$  is obtained between the following couples: 35-14, 6-17, 32-19, 80-72, 15-90, 42-49, 47-4, 47-102, 47-81, 85-63, 4-102, 77-83, 102-81, 3-29, 30-7, 100-84 and 4-81. Low distances of  $d = 1$  are observed between 6 and 19, 17 and 19, 41 and 40.

**Discussion**

The discrimination in the genus *Vicia* into subgenera, sections and subsections was undertaken by several studies, based on morphological and cytological analyses (Hanelt and Mettin 1989; Kupicha 1976; Leht 2009). In the present work, seed storage proteins and ecogeographic parameters were used.

### Seed proteins variability

The differences among accessions were observed and all eleven taxa can be recognized by their protein profiles. Samples within each taxon showed a different number of bands with different molecular weights. Thus, intraspecific heterogeneity is obtained. A positive correlation was exhibited between seed globulin, seed albumin and seed prolamin contents (highly significant). Our results partially confirmed classification of *Vicia* by Kupicha (1976), Hanelt and Mettin (1989) and Leht (2009) at subgeneric and sectional levels. According to Osborne (1924), proteins are classified into albumins, globulins, prolamins and glutelins based on their solubility which is a convenient method to initiate the discrimination of the seed storage proteins from a species that has not been studied in detail (Ribeiro et al. 2004). The differences in the three fractions profiles of individual seeds was expected since Mudzana et al. (1995) and Goodrich et al. (1985) found that there was variability in the total seed storage protein profiles of individual seeds within a subspecies. This was probably due the cross fertilization nature of the genus.

### Albumins patterns

Albumins cluster analysis revealed five major clusters, differing only in the relative position of some accessions in subgroups. Populations of *V. monantha* subsp. *calcarata* belonging to section Cracca of the subgenus *Vicilla* (sensu Kupicha) are linked to samples of *V. lutea* (Sect. *Hypechusa*) which indicates a close relationship between the two subspecies of *V. lutea* when it is difficult to determine distinct groups which could be individually identified as *eu-lutea* or as *vestita*. There are bands which are specific of some accessions and can be used as markers to discriminate samples at interspecific level. Discrimination at intraspecific level is also obtained by albumins patterns. The use of albumins proved to be helpful in revealing interspecific variability and intraspecific diversity in the studied taxa. Some bands are specific constant markers for each taxon and can be discriminated by their electrophoregrams. Other bands are common of several taxa. Albumins present the highest bands number which indicates major role of albumin heterogeneity in discriminating the *Vicia* samples (Mustafa 2007).

### Globulins patterns

Cluster analysis of globulins patterns revealed six basic groups. A low distance can be observed between samples of *V. lutea* subsp. *vestita* or by samples of *V. lutea* subsp. *eu-lutea* and *V. lutea* subsp. *vestita*. *V. narbonensis* (sect. *Narbonensis*) and *V. lutea* subsp. *vestita* (sect. *Hypechusa*) present close globulin profiles. These results concord with those of Jaaska (1997), Jaaska and Leht (2007) and Shiran and Raina (2014), which showed

the species of sections *Hypechusa* as sister to the clade of section *Narbonensis*. High distances are observed between *V. narbonensis* (sect. *Narbonensis*) and *V. sativa* (sect. *Vicia*) and between species of *V. sativa* or between *V. lutea* subsp. *eu-lutea* (sect. *Hypechusa*) and *V. sativa*. Globulins are the major storage proteins present in seeds of legumes (Freitas et al. 2000) and differences both at intraspecific and interspecific levels can be obtained by globulins patterns. A good example in this case is the one of sample 43 (*V. monantha* subsp. *calcarata*) characterized by 3 specific bands (51.74, 78.27 and 115.04 kDa). The unique population of *V. leucantha* also has a specific band (119.96 kDa). Samples of *V. monantha* subsp. *calcarata* are a good example for intraspecific heterogeneity as shown by accessions 102 and 43, characterized by one specific band each.

### Prolamins patterns

Cluster analysis of prolamins patterns revealed four basic groups. Few studies have been reported concerning the utilization of prolamins patterns to discriminate *Vicia* taxa in comparison with albumins and globulins. The classification obtained using the UPGMA showed that samples belonging to the same taxon close together in the clusters. A common profile was observed for samples 1 and 4 belonging to *V. lutea* subsp. *vestita*, but this taxon also showed other patterns. It is may be due to the fact that native wild populations are composed of a mixture of genotypes which provide survival advantages in varied environmental conditions. Outcrossing could also be an explanation of diversity in the accessions studied, as indicated for several types of vetch (Hanelt and Mettin 1989; Mirali et al. 2007). The sample 10 (*V. sativa* subsp. *obovata*) showed differences in its electrophoregram compared to the other taxon members, and might be considered an “off type” as proposed by De la Rosa and Gonzalez (2010). Prolamins patterns are a good discriminatory marker in *Vicia* taxa at both intraspecific and interspecific levels especially for *V. sativa* samples as the subspecies belonging to this species can be characterized by specific bands as in the case of samples 6, 10, 57, 82 and 95 of *V. sativa* subsp. *obovata* or samples 48, 77 and 42 belonging to *V. sativa* subsp. *cordata*. *V. leucantha*, *V. tenuifolia* and *V. narbonensis* are also characterized by specific bands which could be considered as markers at interspecific level.

### Interspecific and intraspecific variation

#### *V. sativa* s.l. (Sect. *Vicia*)

*Vicia sativa* is the most polymorphic species of the genus *Vicia* and the debate about its taxonomic classification is extensive. In the present work, the all studied taxa of *V. sativa* s.l (section *Vicia*) are found in the same group on

the basis of albumins homology and can be found in three clusters which indicates a close relationship between subspecies of *V. sativa* when it is difficult to observe separate groups which could be identified as *obovata*, *consobrina*, *cordata* or *angustifolia*. In our previous paper using plant morphology (Bechkri and Khelifi 2016), our results have demonstrated that in the *V. sativa* using morphological traits alone do not provide a stable grouping. A close relationship between samples can be seen. The picture generated between the phylogenetic trees may be due to the possible phylogenetic instability of these taxa as indicated by Leht (2009).

#### ***V. narbonensis* (Sect. *Narbonensis*) and *V. lutea* (Sect. *Hypechusa*)**

On the basis of albumins patterns, all populations of *V. narbonensis* belong to the same subcluster except for the accession 23 which is linked to accessions of *V. sativa*. Globulins patterns linked all accessions of *V. narbonensis* together. Accessions of *V. narbonensis* clustered together using prolamins profiles. Albumins, globulins and prolamins patterns joined all samples of *V. lutea* in the same subcluster with no discrimination between subsp. *eu-lutea* and subsp. *vetsita*. These observations show that there is an overlap between accessions of these two subspecies. The utilization of seed storage proteins shows a close relationship between the taxa when it is difficult to distinguish groups which could be identified as *eu-lutea* or as *vestita*. Albumins and globulins profiles not link accessions of *V. lutea* and *V. narbonensis*. Prolamins patterns of the present study concord with those of Jaaska (1997) and Jaaska and Leht (2007) and Shiran and Raina (2014) which showed the species of sections *Hypechusa* as sister to the clade of section *Narbonensis*. Our data revealed that subgenus *Vicia* is a well-separated subgenus and agreed with the results based on morphology reported by Diklic (1972) and with results on phylogenetic relationships (Potokina et al. 1999; Leht 2009). Seed albumins, globulins and prolamins patterns showed *V. lutea* samples to form an homogenous group. The same findings were reported by Przybylska and Zimniak-Przybylska (1997).

#### ***V. monantha*, *V. tenuifolia* and *V. leucantha* (Section *Cracca*)**

Samples of *V. monantha* clustered together in two different groups on the basis of albumins patterns with no distinction between the two subspecies *calcarata* and *cinerea*. An exception is observed for two samples (43 and 46) which clustered with accessions of *V. sativa*, *V. tenuifolia* and *V. leucantha*. Globulins patterns joined the majority of samples of *V. monantha* subsp. *calcarata* all together with an exception for the sample 98 which forms a separate cluster. Profiles of *V. monantha* subsp. *cinerea*

do not have provided clear groupings. Prolamins patterns gave stable groups where samples of subsp. *monantha* are linked together. Six samples clustered together in another subcluster which contains samples of subsp. *cinerea*. Samples of these species clustered together on the basis of albumins, globulins and prolamins patterns. They are also linked to samples of *V. monantha*. Thus, species of section *Cracca* sensu Kupicha belong to one group. Populations of *V. tenuifolia*, *V. leucantha* and *V. monantha* clustered together showing also an overlap between these taxa. These species are classified by Kupicha (1976) in the sub-genus *Vicilla*, section *Cracca*. Thus, the three species attributed to the section *Cracca* are joined in a separate group in the present work. *V. tenuifolia* and *V. leucantha*, are grouped in one subcluster of closely related taxa that provided strong homologous variation with shared characters. As a consequence, the treatment of *V. tenuifolia*, *V. monantha* and *V. leucantha* in the section *Cracca* is supported. In the present analysis, *V. leucantha*, the species transferred by Ball (1968) to his section *Ervum*, is in the same clade with the remaining *Cracca* species. In spite of this, our analysis of seed proteins supports Kupicha's placement of *V. leucantha* in section *Cracca* as was also done by Davis and Plitmann (1970).

#### **Ecogeographic characterization**

As the first step towards more efficient conservation is to undertake an ecogeographic study (Maxted et al. 1996), the aim of the present work was to collect ecogeographic informations from investigated stations of *Vicia* L. Analysis of the passport data will elucidate each taxon's geographic and ecological location. The distribution maps will be used in the planning of future collecting missions. The wide geographic ranges may explain the high degree of protein seed storage variation among accessions and should be considered in conservation programs of this *Vicia* taxa (El Bakatoushi and Ashour 2009). The obtained intraspecific diversity within the taxa reflects a wide geographical and ecological distribution of this species as reported by Ehrman and Maxted (1990) and Maxted (1995). Studying the species from different geographic regions and altitudes, indicates that the species may be still evolving in different pathways as reported by Ashour et al. (2005). According to Hannelt and Mettin (1989), *Vicia* taxa do not tolerate extreme environmental conditions. Whereas, Francis et al. (2000) report that *V. sativa* has good adaption to adverse environmental conditions. Cluster analysis shows that samples having differences in electropherograms and belonging to different taxa can belong to an identical bioclimate and altitudes as in the case of accessions 19 and 32 which were collected from the same locality. In parallel, there are samples with high protein homology level which are collected from

stations belonging to the same bioclimate. Accessions 72 and 80 are a good example in this case. The dendrogram obtained with ecogeographic parameters did not indicate clear discrimination among accessions based on their geographical locations. The Mantel test between proteins patterns and ecogeography indicated that the correlation between proteins profiles resemblance and geographical origin is less significant. The same findings were reported by Chung et al. (2013), Potokina et al. (2003), Mirali et al. (2007) and De la Rosa and Gonzalez (2010). Considering all stations of the current paper, the studied samples of *Vicia* L. occur from 1 to 1222 m. Stations belong to seven different bioclimates (SH, LH, HSA, MSA, LSA, HA) and are characterized by cool, wild, warm or temperate winters. Considering all stations of the current work, *V. sativa* L. occurs from sea level to 880 m which is consistent with the findings of Maxted (1995). Samples of *V. narbonensis* were collected from sites receiving between 382.95 and 697.18 mm of precipitations and belonging to bioclimates characterized by cool or mild winter. Bennett and Maxted (1997) reported that the *V. narbonensis* occur over a wide range of altitudes, from sea level to 3200 m when Abd El Moneim (1992) reported that *V. narbonensis* adapts in areas receiving 250–300 mm annual precipitations and are characterized by low winter temperatures. Accessions of *V. lutea* were collected from sites belonging to four bioclimates (LH, HSA, MSA, SH) and altitudes ranged between 11 and 604 m with a minimum temperatures ranged from 2.55 to 8.64 °C. Accessions 74, 77, 91 and 98 belonging to *V. monanatha* occur until 1222 m and at these altitudes, they require some frost tolerance as the temperatures can drop to 0.63 °C as in the case of the accession 98. *V. leucantha* was collected from a site characterized by HSA bioclimate with a minimum temperature of 2.62 °C (cool winter) and an altitude of 586 m. The two samples of *V. tenuifolia* occurred in SH and MSA bioclimates with mild or cool winters and at altitudes of 276 and 543 m. These patterns are not necessarily a real picture of the preferred altitude of these two taxa. A larger number of accessions from each geographical location should be tested to confirm patterns.

## Conclusion

The electrophoregrams obtained can be exploited as passport data for the genetic diversity of the studied taxa. Seed protein electrophoresis is a valid tool for taxa discrimination. The variability observed indicates that improvement by simple selection for these traits is possible. No significant correlation is obtained between seed proteins and ecogeography. The use of more samples from different origins is necessary to include most of the genetic determinants of these traits.

## Authors' contributions

All authors of the manuscript have read and agreed to its content and are accountable for all aspects of the accuracy and integrity of the manuscript in accordance with ICMJE criteria. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

Plant material is available in "laboratoire de génétique biochimie et biotechnologies végétales". Université Frères MENTOURI Constantine Algeria.

## Consent for publication

Authors agree to the terms of the Springer Open Copyright and License Agreement.

## Ethics approval and consent to participate

Authors agree to the terms of ethics approval and consent to participate.

## Funding

This research did not receive any specific Grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 21 February 2017 Accepted: 12 May 2017

Published online: 21 June 2017

## References

- Abd El Moneim AM (1992) Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L.): a potential feed legume crop for dry areas in West Asia. *J Agron Crop Sci* 169(5):347–353
- Ashour FM, El-Sadek LM, El-Badan GE (2005) Karyotypic relatedness among *Vicia* species. *Egypt J Genet Cytol* 34:345–353
- Ball PW (1968) *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds) *Flora Europaea*, vol 2. *Rosaceae* to *Umbelliferae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 129–136
- Bechkri S, Khelifi D (2016) Variation in *Vicia sativa* s.l. from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters. *Genet Resour Crop Evol*. doi:10.1007/s10722-016-0404-1
- Bennett SJ, Maxted N (1997) An ecogeographic analysis of the *Vicia narbonensis* complex. *Genet Resour Crop Evol* 44:411–428
- Chung JW, Kim TS, Suresh S, Lee SY, Cho GT (2013) Development of 65 novel polymorphic cDNA-SSR markers in common vetch (*Vicia sativa* subsp *sativa*). *Molecules* 18(7):8376–8392
- Crawford DJ (1990) *Plant molecular systematics*. Wiley, New York
- Darre MJ, Minior DN, Tataka JG, Ressler C (1998) Nutritional evaluation of detoxified and raw common vetch seed using diets of broilers. *J Agric Food Chem* 46:4675–4679
- Davis PH, Plitmann U (1970) *Vicia* L. In: Davis PH (ed) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, pp 274–321
- De la Rosa L, Gonzalez JM (2010) The genetic diversity associated with seed proteins in a collection of Spanish underground vetches (*Vicia sativa* L. subsp. *amphicarpa* (Dorthe) Asch. et Graebn.). *Genet Resour Crop Evol* 57:565–573
- Diklic N (1972) *Vicia* L. In: Josifovic M (ed) *Flora SR Srbije*. Beograd, Sanu, pp 315–355
- Ehrman TA, Maxted N (1990) Ecogeographic survey and collection of Syrian *Vicieae* and *Cicereae* (Leguminosae). *Plant Genet Res Newsl* 77:1–8

- El Bakatoushi R, Ashour FM (2009) Genetic diversity among some *Vicia narbonensis* L. varieties as revealed by karyotype and protein analysis. *Egypt J Genet Cytol* 38:85–97
- Emberger L (1955) Une classification biogéographique des climats. *Rec Trav Lab Bot Géol Fac Sci* 7:1–43
- Emre I, Turgut-Balik D, Genç H, Sahin A (2010) Total seed storage protein patterns of some *Lathyrus* species growing in Turkey using SDS-PAGE. *Pak J Bot* 42(5):3157–3163
- Francis GM, Enneking D, Abd El Moneim AM (2000) When and where will vetches have an impact as grain legumes? In: Knight R (ed) *Linih'ng research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*. Proceedings of the Third International Food Legume Research Conference, Adelaide 1997. Current plant science and biotechnology in agriculture. Kluwer, London, p 375–384
- Freitas RL, Ferreira RB, Teixeira AR (2000) Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyse structural comparisons within the major classes of globulins. *Int J Food Sci Nutr* 51:341–352
- Goodrich W, Cooke J, Morgan AG (1985) The application of electrophoresis to the characterization of cultivars of *Vicia faba* L. *FABIS Newsl* 13:8–11
- Haider AS, El-Shanshoury AR (2000) Variability of storage proteins and esterase isozymes in *Vicia sativa* subsp. *Biol Plant* 43:205–209
- Hameed A, Shah TM, Atta BM, Iqbal N, Haq MA, Ali H (2009) Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes. *Pak J Bot* 41(2):703–710
- Hanelt P, Mettin D (1989) Biosystematics of the genus *Vicia* L. (*Leguminosae*). *Annu Rev Ecol Syst* 20:199–223
- Higgins TJV (1984) Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Ann Rev Plant Physiol* 35:191–221
- Jaaska V (1997) Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae). *Genet Resour Crop Evol* 44:557–574
- Jaaska V, Leht M (2007) Phylogenetic relationships between and within sections *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Peregrinae* of genus *Vicia* (Fabaceae) based on evidence from isozymes and morphology. *CEJB* 2(1):137–155
- Kupicha FK (1976) The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes R Bot Gard Edinb* 34:287–326
- Ladizinsky G, Hymowitz T (1979) Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies: review. *Theor Appl Genet* 54:145–151
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Leht M (2009) Phylogenetics of *Vicia* (Fabaceae) based on morphological data. *Feddes Repert* 120(7–8):379–393
- Mantel N (1967) Adaptation of Karber's method for estimating the exponential parameter from quantal data, and its relationship to birth, death, and branching processes. *Biometrics* 23:739–746
- Maxted N (1993) A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Viciaeae). *Bot J Linn Soc* 111:155–182
- Maxted N (1995) An ecogeographical study of *Vicia* subgenus *Vicia*. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 8. International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG (1996) Complementary conservation strategies. In: Maxted N, Ford-Lloyd BV, Hawkes JG (eds) *Plant genetic conservation: the in situ approach*. Chapman and Hall, London, pp 20–57
- Mirali N, El-Khoury S, Rizq F (2007) Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS–PAGE of seed proteins. *Biol Plant* 51(4):660–666
- Mudzana G, Pickett AA, Jarman RJ, Cooke RT, Keefe PD (1995) Variety discrimination in faba beans (*Vicia faba* L.) an integrated approach. *Plant Var Seeds* 8:135–145
- Mustafa AEZ (2007) Genetic variation among Egyptian cultivars of *Vicia faba* L. *Pak J Biol Sci* 10(23):4204–4210
- Nemecek T, Von Richtshofen JS, Dubois G, Casta P, Charles R, Pahl H (2008) Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *Eur J Agron* 28:380–393
- Osborne TB (1924) *The vegetable proteins*. London, Longmans-Green
- Potokina E, Tomooka N, Vaughan DA, Alexandrova T, Xu RQ (1999) Phylogeny of *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Genet Res Crop Evol* 46:149–161
- Potokina E, Endo Y, Eggi E, Ohashi H (2003) Electrophoretic patterns of seed proteins in the East Asian *Vicia* species (Leguminosae) and their systematic utility. *J Japanese Bot* 78(1):29–37
- Przybylska J, Zimniak-Przybylska Z (1997) Electrophoretic seed albumin patterns in *Vicia* species of sect. *Hypechusa* and *Peregrinae* (Fabaceae). *Plant Syst Evol* 208:239–248
- Quézel P, Santa S (1962) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales*. Tome 1. Editions du centre national de la recherche scientifique, Paris, pp 524–531
- Ribeiro AC, Teixeira AR, Ferreira RB (2004) Characterization of globulins from common vetch (*Vicia sativa* L.). *J Agric Food Chem* 52:4913–4920
- Romesburg HC (1990) *Cluster analysis for researchers*. Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar
- Seltzer P (1946) *Le climat de l'Algérie*. Alger, Carbonel, p 219
- Shiran B, Raina SN (2014) Evidence of rapid evolution and incipient speciation in *Vicia sativa* species complex based on nuclear and organellar RFLPs and PCR analysis. *Genet Resour Crop Evol* 48:519–532
- Stewart P (1969) Un nouveau climatogramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Bull Soc Hist Nat Afr Nord* 65:1–2

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)



**Troisième chapitre**  
**Diversité génétique associée aux systèmes**  
**enzymatiques de la plante et aux propriétés**  
**physiques du grain**

#### Prologue

Le polymorphisme des isozymes est utile pour l'évaluation de la diversité génétique chez les espèces du genre *Vicia*. Ce sont de bons caractères taxonomiques pour le regroupement des espèces de vesce en sections monophylétiques et fournissent également des caractères de diagnostic supplémentaire pour la distinction entre les espèces. Les données de la littérature sur les isozymes au sein du genre montrent que certains systèmes enzymatiques permettent une caractérisation des espèces ou des groupes d'espèces, la détermination des relations entre espèces ainsi que la détection des hybrides et l'évaluation du degré de la recombinaison génétique. D'autre part, les propriétés physiques du grain doivent être connues pour la conception et l'amélioration des machines et les installations pour la manutention, le stockage, la récolte et le traitement des grains.

Dans cette optique, la présente partie décrit la variation de trois isozymes et de douze propriétés physiques du grain chez 11 taxa du genre *Vicia* appartenant à quatre sections traditionnelles du genre. Elle a pour principaux objectifs une analyse comparative des profils d'isozymes en même temps qu'une caractérisation des propriétés physiques du grain afin d'étudier la diversité intra et interspécifique et d'évaluer l'utilité de ces deux marqueurs comme caractères de diagnostic pour la discrimination des espèces et des sections de vesce. Pour ce faire, une extraction des isozymes à partir de jeunes feuilles a été réalisée. La révélation s'est faite par une PAGE. La lecture des zymogrammes a débouché sur une classification hiérarchique en clusters. En parallèle, trois dimensions linéaires de la graine ont été mesurées et ont servi aux calculs de huit propriétés physiques du grain. Le poids des mille grains a été également établi. Les résultats de ces mesures ont été exploités sous forme de dendrogramme. Les propriétés qui contribuent le plus à la discrimination des taxa ont été identifiées. Les résultats ont été corrélés avec ceux obtenus dans les zymogrammes.

Les résultats obtenus dans ce volet, rédigés sous forme d'une quatrième publication scientifique, intitulée : Phylogenetic relationships between and within 11 taxa of genus *Vicia* from Algeria based on evidence from isozymes and physical seed properties sont publiés dans « European Scientific Journal ».

# Phylogenetic Relationships Between and Within 11 Taxa of Genus *Vicia* from Algeria Based on Evidence from Isozymes and Physical Seed Properties

*Sakina Bechkri,  
Imane Medoukali,  
Douadi Khelifi,*

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université des Frères MENTOURI 25000 Constantine, Algérie

doi: 10.19044/esj.2017.v13n9p168

URL:<http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n9p168>

---

## Abstract

Isozyme patterns for aspartate amino transferase, alcohol dehydrogenase and superoxide dismutase were evaluated in 60 accessions of eleven *Vicia* taxa occurring in Algeria. The three enzymatic systems revealed 25 morphs of different frequency encoded by 7 loci. Similarity between species and accessions was estimated by Euclidean distances based on presence or absence of bands. The UPGMA method was utilized for the groupings and dendrogram construction. The dendrogram presented 2 major groups, each one corresponding to a taxonomic level where accessions of the same species grouped together. Taxa-specific bands were identified. In parallel, 12 physical seed properties namely: length, width, thickness, arithmetic diameter, geometric diameter, sphericity, surface area, volume, square mean diameter, equivalent diameter, seed aspect ratio and 1000 seed weight were calculated. By cluster analyses based upon them, the material has been classified into 2 major groups with no correspondence with the current taxonomy. A Principal Component Analysis was undertaken to distinguish physical properties which contribute the most to accessions distinction. Mantel test was used to assess correlation between the three enzymatic systems studied one side and between enzymes polymorphism and physical seed properties another side.

---

**Keywords:** Algeria; isozymes; seed properties; *Vicia*

## Introduction

*Vicia* L. (Fabaceae) is a medium-sized genus comprising about 150 (Kupicha 1976) to 210 (Hanelt and Mettin 1989) species indicating problems

with species circumscription and ranking. 26 species occur in Algeria, according to the flora described by Quézel and Santa (1962). The infrageneric taxonomy also poses numerous continuously disputed problems, with several competing taxonomic treatments existing. A thorough evaluation of the genetic variability present within the genus is required if *Vicia* material is to be utilized efficiently in plant breeding programmes. Germplasm characterization, that can be performed by several approaches such as morphology, cytogenetics, biochemistry and geographical distribution, is an essential tool for plant breeding (Gonzalez and Shiffino-Wittman 1996). Allozyme polymorphism, is useful to examine genetic processes at every stage of the life cycle and to ascertain genetic diversity in plant species. Isozymes are good taxonomic characters for grouping vetch species into monophyletic sections and also provide additional diagnostic characters for distinguishing between species (Leht and Jaaska 2002). Literature data on isozymes for the genus show that some enzymatic systems allow species or species group characterization (Yamamoto and Plitmann 1980; Suso and Moreno 1986), determination of species relationships (Wolff 1980; Yamamoto 1986) as well as detection of hybrids and assessment of the degree of genetic recombination (Yamamoto 1979; Gates and Boulter 1980). The isozyme data described by Jaaska (1997) regarding monophyletic groups and their relationships are in close agreement with those based on the study of RAPDs and cpDNA RFLP by Potokina et al. (1999). Species groups revealed by isozymes by Leht and Jaaska (2002) were in a general agreement with traditionally recognized sections, contributing to the debated sectional placement of some species. Yamamoto and Plitmann (1980) studied isozymes in *Vicia* species without making any phylogenetic inferences. In another side, *Vicia* taxonomists have traditionally concentrated on floral and leaf morphology, paying little attention to seed characters. Iannelli (1964) discussed the need for accurate identification of seed lots due to the increasing agricultural use of vetches and he found that species could be recognized using certain seed characters. Moreover, physical properties of vetches seeds are to be known for design and improve of relevant machines and facilities for handling, storing, harvesting and processing. The size and shape are important in designing of separating, sizing and grading machines (Taser et al. 2005). Various types of cleaning, grading and separation equipment are designed on the basis of the physical properties of grains or seeds. Wu et al. (1999) reported the importance of difference in size and density during separation of particles by segregating on gravity tables. Size, shape and density are important in the separation of seed from undesirable materials on oscillating chafers (Zewdu 2004; Scherer and Kutzbach 1978; Hauhouot-O'Hara et al. 2000). Review of literatures showed that there is not much information relating to physical properties of vetch grain from Algeria.

Our recent studies of phylogenetic relationships in the the genus *Vicia* by morphology and seed storage proteins gave conflicting results especially concerning *V. staiva* s.l. (Bechkri and Khelifi 2016). The present paper describes variation of three isozymes and twelve physical seed properties in a set of eleven Algerian taxa belonging to four traditional sections of the genus *Vicia* in order to study the intra and interspecific diversity, to improve the resolution of phylogenetic relationships and evaluate the usefulness of the two markers as diagnostic characters to discriminate vetch species and sections.

## Material and methods

### Plant material and taxa identification

Sixty accessions belonging to 11 *Vicia* L. taxa collected from their natural habitats in various bioclimatic conditions of Algeria are used in the current study (Figure 1). A Global Positioning Systems (GPS GARMIN eTrex® model 30) was used to collect latitude, longitude and altitude of sites investigated. The data on the vetch species and accessions investigated are given in Table 1. Individual plants were randomly collected in each sampling site.

**Figure 1.** Geographical origin of the 60 Algerian populations studied



Pods were then shelled and the dry seeds poured in to separate sealed paper bags at room temperature until their utilization. Taxonomic identification of accessions was verified by the morphology of plants grown from seeds in the greenhouse of the laboratory of “Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales” (N 36°20.602' E006°37.480' Alt. 569m) of Faculty of Biology in Constantine University (eastern Algeria), using the key provided by Quézel and Santa (1962). Taxonomic nomenclature at subgeneric and sectional levels follows Kupicha (1976) and Maxted (1993).

**Table 1.** Passport information and taxonomic identification of accessions investigated

Species/Subspecies	Code	Date of collection	Province /Locality/Origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<i>V. sativa</i> subsp. <i>consobrina</i> (Pomel) Maire	5	28.5.14	Guelma	N36°26.187'	E007°17.772'	339
	14	1st.6.14	Annaba El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
	36	23.5.14	Béjaia Affalou	N36°40.381'	E005°08.903'	1
	59	30.5.14	Jijel	N36°35.082'	E006°16.728'	141
	64	1st.6.14	Skikda Azzaba	N36°43.532'	E007°04.706'	111
	65a	9.6.14	Tipaza El Beldj Chenoua mountain	N36°37.667'	E002°21.150'	345
	85	1st.6.14	Skikda Ain Charchar	N36°44.366'	E007°14.176'	52
	93	30.5.14	Jijel	N36°48.699'	E005°41.679'	25
<i>V. sativa</i> subsp. <i>obovata</i> Gaudin	6	22.5.14	Constantine Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563
	7	30.5.14	Mila Messaoud Boudjriou	N36°29.743'	E006°25.527'	325
	10	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°28.409'	E006°38.239'	468
	17	22.5.14	Constantine Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563
	20	3.6.14	Sétif Ain amat	N36°07.394'	E005°12.172'	866
	22	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
	51	6.6.14	Sidi Bel Abbes	N35°10.824'	W000°36.026'	490
	32	22.5.14	Constantine Chaab Ersas	N36°20.634'	E006°37.486'	562
	57	6.6.14	Tlemcen Ain fezza	N34°52.732'	W001°13.726'	867
	72	28.5.14	Constantine Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	80	28.5.14	Constantine Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	70	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757
	83	26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683
	<i>V. sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i> (L.) Gaudin	19	18.5.14	Constantine Chaab Ersas	N36°20.634'	E006°37.486'
	8	26.5.14	Biskra El Kantra	N35°11.517'	E005°40.673'	467
	11	6.6.14	Tlemcen	N35°05.699'	W001°26.612'	90
<i>V. sativa</i> subsp. <i>cordata</i> (Will) Batt.	13	26.5.14	Biskra El Kantra Ain Skhoun	N35°16.087'	E005°44.174'	584
	15	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24
	33	29.5.14	Skikda El hadaik	N36°49.894'	E006°53.079'	26

		<b>35</b>	1st.6.14	Annaba El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
		<b>37</b>	28.5.14	Guelma	N36°28.361'	E007°21.280'	223
		<b>38</b>	10.5.14	Jijel	N36°49.348'	E005°56.706'	14
		<b>42</b>	28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
		<b>47</b>	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
		<b>71</b>	30.5.14	Jijel	N36°47.625'	E005°39.746'	17
<b>V. lutea L.</b>	<b>V. lutea subsp. vestita (Boiss.) Rouy.</b>	<b>1</b>	28.5.14	Skikda Ramdane Djamel	N36°45.977'	E006°53.432'	42
	<b>V. lutea subsp. eu-lutea Maire</b>	<b>63</b>	1st.6.14	Skikda Ain Cherchar	N36°44.366'	E007°14.176'	52
		<b>79</b>	1st.6.14	El Tarf Ben M'hidi	N36°46.402'	E007°53.600'	11
		<b>87</b>	30.5.14	Jijel El Milia	N36°46.668'	E006°13.551'	28
		<b>90</b>	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24
<b>V. monantha Retz</b>	<b>V. monantha subsp. calcarata (Desf.) Maire</b>	<b>3</b>	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
		<b>26</b>	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757
		<b>27</b>	2.6.14	Oum El Bouaghi	N35°51.459'	E007°06.377'	887
		<b>40</b>	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711
		<b>45</b>	3.6.14	Bordj Bou Areridj	N36°04.070'	E004°41.899'	923
		<b>49</b>	28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
		<b>74</b>	14.6.14	Tébessa	N35°15.936'	E007°30.306'	1078
		<b>77</b>	26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683
		<b>29</b>	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
		<b>18</b>	3.6.14	Bordj Bou Areridj Ain taghrout	N36°07.741'	E005°03.364'	934
		<b>102</b>		Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
		<b>43</b>	4.6.14	Médéa Oued Harbil	N36°13.633'	E002°37.643'	464
		<b>46</b>	3.6.14	Bordj Bou Areridj El Achir	N36°04.017'	E004°40.525'	944

	(M.B.) Maire						
		<b>91</b>	14.6.14	Khenchla	N35°15.704'	E007°20.95 7'	1222
<i>V. narbonensis</i> L.	-	<b>23</b>	30.5.14	Constantine Hamma Bouziane (Chaabet El Medhbouh)	N36°26.391'	E006°33.28 2'	425
		<b>34</b>	27.4.14	Constantine Didouche Mourad	N36°29.216'	E006°38.73 1'	434
		<b>41</b>	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.75 1'	711
		<b>55</b>	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.023'	E006°40.05 1'	443
		<b>81</b>	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.17 7'	604
		<b>56</b>	6.6.14	Ain Temouchent	N35°16.476'	W001°13.80 0'	276
<i>V. tenuifolia</i> Roth.	-	<b>89</b>	6.6.14	Sidi Bel Abbes Sidi Khaled	N35°06.59'	W000°44.23 8'	543
<i>V. leucantha</i> Biv.	-	<b>100</b>	10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.62 6'	586

### Seed germination

Seed were germinated on Wattman paper in Petri dishes at 28°C, after mechanical scarification. Seedlings were transplanted to pots with garden soil, sand and compost in the greenhouse, where the plants were grown.

### Enzymes polymorphism

Preliminary tests were made with eight enzymatic systems: aspartate amino transferase (AAT), alcohol dehydrogenase (ADH), esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH), malic enzyme (ME), amylase (AMY), peroxidase (PRX) and superoxide dismutase (SOD). AAT (E.C 2.6.1.1), SOD (E.C 1.15.1.1) and ADH (E.C 1.1.1.1) were selected for further analysis due to good resolution, polymorphism and repeatability of results.

### Enzymes extraction

Extractions were made from 10 mg of newly-opened, healthy, freshly-harvested leaflets, crushed, on ice, in 600 µL of extracting solution (Jaaska 2005). The front line was monitored with bromophenol blue.

### Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) and staining

Electrophoresis was undertaken in vertical polyacrylamide gel slabs in the anodal direction in an ice-refrigerated plexiglass apparatus by applying a pulsed current of 40 mA and 1200V per gel for about 2±3 h until the marker dye, bromophenol blue, reached the gel end. After electrophoresis,



the gels were stained for isoenzymes by applying standard histochemical methods (Wendel and Weeden 1989).

### Physical seeds properties

Notation	
<b>D<sub>a</sub></b> : arithmetic mean diameter	<b>D<sub>ge</sub></b> : geometric mean diameter
<b>D<sub>sq</sub></b> : square mean diameter	<b>D<sub>e</sub></b> : equivalent diameter
<b>L</b> : length of seed, mm	<b>m<sub>1000</sub></b> : thousand seed mass, g
<b>S</b> : surface area, mm <sup>2</sup>	<b>T</b> : thickness of seed, mm
<b>V</b> : unit volume, mm <sup>3</sup>	<b>W</b> : width of seed, mm
<b>ϕ</b> : sphericity of seed	<b>R<sub>as</sub></b> : seed aspect ratio

Seeds were cleaned manually. Immature and broken seeds were removed. The one thousand seed mass was determined by means of an electronic balance (Denver instrument company AA-250) reading to 0.0001 g. To determine the average size of the seed, 10 seeds were randomly picked and their three linear dimensions namely, length L, width W and thickness T were measured using a digital caliper 0-150mm (6'') reading to 0.01 mm. The average diameter of grain was calculated using the arithmetic mean and geometric mean of the three axial dimensions by the following relationships (Mohsenin 1970):

$$Da = (L + W + T)/3$$

$$Dg = (LWT)^{1/3}$$

The sphericity of seeds was calculated by using the following relationship (Mohsenin, 1970):

$$\phi = \frac{(LWT)^{1/3}}{L}$$

The surface area of seeds was found by analogy with a sphere of same geometric mean diameter using the following expression cited by Olajide and Ade-Omowaye (1999):

$$S = \pi.Dg^2$$

The seed volume was calculated according to Subukola and Onwuka (2011) as follow:

$$V = (\pi.LWT)/6$$

The square mean and equivalent diameters were determined using the formulae of Asoegwu et al. (2006):

$$Dsq = ((LW+WT+LT)/3)^{1/2}$$

$$De = (Da+Dg+Dsq)/3$$

Finally, the seed aspect ratio was determined by the equation used by Seifi and Alimardani (2010):

$$Ras = W/L$$

## Data analyses

The gels were scanned using imagescannIII. Bands were designated by capital letters followed by numbers, indicating the electrophoretic mobility in a scale 0-100. The isoenzyme data matrix was made using allozymes as binary absence/presence characters. Euclidean distances and UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) clustering method were used to estimate isoenzymatic variation among the taxa and accessions. The relationships among the studied taxa were demonstrated as a dendrogram provided by statistical programs (STATISTICA version 6.1 program). The same method was used to construct the dendrogram of physical seed properties. To clarify relationships between the twelve physical seed properties studied and to identify which properties contribute the most in accessions separation, a Principal Component Analysis (PCA) was carried out. To display a possible correlation between the three enzymatic systems one side and between the enzymatic data and seed properties results another side, a Mantel test (Mantel 1967) based on Pearson's correlation was used (XLSTAT Pearson edition, version 2014.5.03).

## Results

Data on the isoenzyme variation among the *Vicia* species are compiled in Table 2 where electromorphs are given in the order of their decreasing occurrence among the accessions analysed. In total, the three enzymatic systems revealed 25 morphs of different frequency encoded by 7 loci and showed variability within and between species.

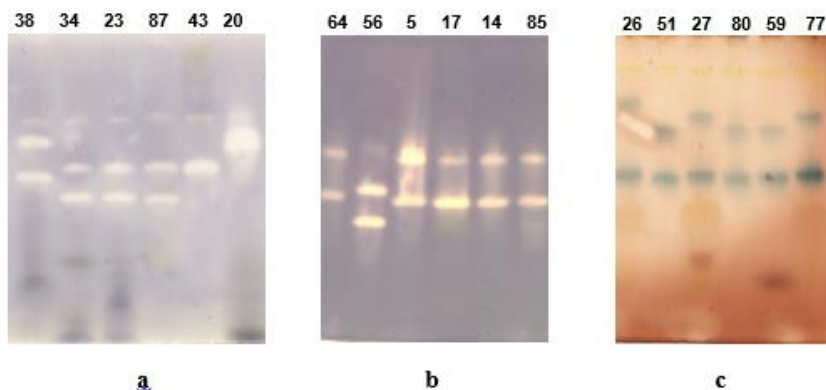
**Table 2.** Polymorphism of Aspartate AminoTransferase (AAT), SuperOxide Dismutase (SOD) and Alcohol DeHydrogenase (ADH) resolved from the leaflets of the *Vicia* taxa studied

Taxon	N	AAT-B	AAT-A	SOD-C	SOD-B	SOD-A	ADH B	ADH A
<i>V. sativa</i> subsp. <i>obovata</i>	13	33.8	43.6	34.5-37.5-39.5-41	46.5	-	25.8-29.6-	31.6-39.2
<i>V. sativa</i> subsp. <i>cordata</i>	11	33.8	43.6-45.2	34.5-37.5	46.5	-	25.8-29.6-	39.2
<i>V. sativa</i> subsp. <i>consobrina</i>	8	33.8	43.6	34.5-37.5	46.5	-	25.8-29.6-	39.2
<i>V. sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i>	1	33.8	43.6	34.5-37.5	46.5	-	25.8-29.6-	39.2
<i>V. lutea</i> subsp. <i>eu-lutea</i>	4	33.8	43.6	41	44.6	52.3	25.8-	37.2-44.2
<i>V. lutea</i> subsp. <i>vestita</i>	1	33.8	45.2	41	44.6	52.3	25.8-	37.2-44.2
<i>V. monantha</i> subsp. <i>calcarata</i>	12	27.6-31-	43.6	34.5-41	44.6	-	25.8-	37.2
<i>V. monantha</i> subsp. <i>cinerea</i>	2	27.6-33.8-38.2r	43.6	41-41.6r	44.6	52.3-58r	25.8	33.5r-37.2-44.2
<i>V. narbonensis</i>	5	33.8	43.6	37.5	44.6	50.3	25.8-	37.2-44.2

<i>V. tenuifolia</i>	2	31	45.2	34.5	44.6	52.3	25.8-	37.2-44.2
<i>V. leucantha</i>	1	27.6	43.6	37.5	44.6	49.2r	25.8-	37.2-43r

N: number of accessions analysed

r: rare morph



**Figure 2.** Electrophoretic banding pattern generated by PAGE of the enzymatic systems studied of some *Vicia* accessions (a) ADH (b) SOD (c) AAT

### Superoxide dismutase (SOD EC. 1.15.1.1)

SOD zymograms of some samples are shown in Figure 2b. In the present results, 11 morphs were obtained with 4 morphs for SOD-A, 2 for SOD-B and 5 for SOD-C. Each pattern contains from 2 to 3 bands. The band S34.5 is the most common as it appears in 42 profiles, followed by the band S37.5 observed in 35 profiles and bands S44.6, S46.5 observed each in 27 patterns. Three rare morphs are observed: S41.6 and S58 are specific of sample 46, when the band S49.2 is specific of sample 100. The band S50.3 is specific of 5 samples (23, 34, 41, 55, 81). The band S39.5 is found in 6 patterns (7, 10, 20, 22, 51, 57). Accessions 5, 14, 36, 59, 64, 65, 85, 6, 17, 32, 72, 80, 70 83 19 8 11, 15, 33, 35, 37, 38, 42, 47, 71 are characterized by a unique profile which contains the three following bands: S34.5, S37.5, S46.5. The following samples are also characterized by a unique pattern: 36-93, 7-10, 20-22-51-57, 1-63-79-87-90-102, 3-26-27-40-45-49-74-77-29-18-43, 23-34-41-55-81, 56-89. Samples 46 and 100 have a unique profile each.

### Alcohol dehydrogenase (ADH E.C 1.1.1.1)

ADH zymograms are shown in Figure 2a. 8 morphs were obtained for this enzymatic system. Each pattern contains from 2 to 3 bands. The band AD25.8 is the most common as it appears in 47 profiles, followed by the band AD29.6 observed in 31 profiles, band AD37.2 observed in 27 patterns and the band 39.2 observed in 25 profiles. Two rare morphs are observed: AD33.5 is specific of sample 46, when the band AD43 is specific of sample 100. The band S50.3 is specific of 5 samples (23, 34, 41, 55, 81). The band AD31.6 is found in 4 patterns (20, 22, 51, 57). Accessions 6, 8, 11, 13, 14, 17, 36, 64, 85, 93 are characterized by a unique profile which contains the

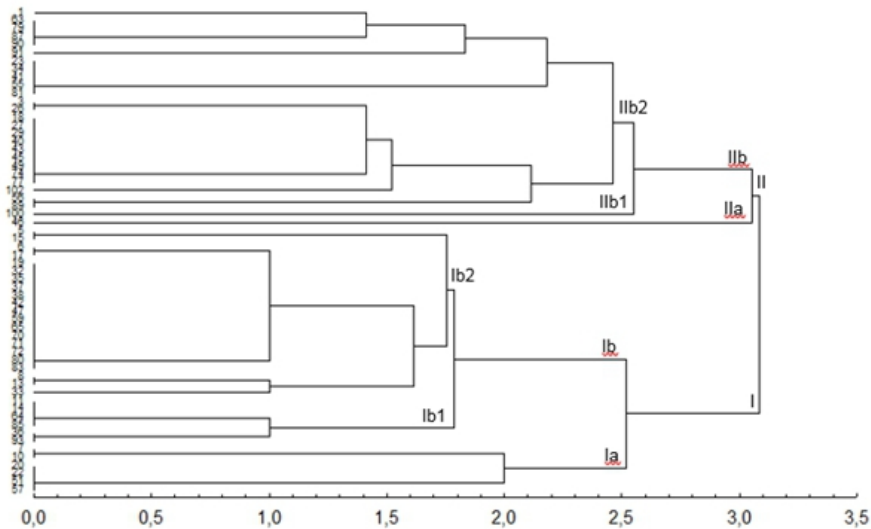
two following bands: AD29.6 and AD39.2. The following samples are also characterized by a unique pattern: 1-63-79-87-90, 7-10, 19-32-33-35-37-38-42-47-59-65-70-71-72-80-83, 20-22-51-57, 3-18-26-27-29-40-43-45-49-74-77-91-102, 23-34-41-55-56-81-89. The sample 46 with bands AD33.5, AD37.2, AD44.2 and the sample 100 with bands AD25.8, AD37.2, AD43 have a unique profile each.

### **Aspartate Amino Transferase (AAT E.C 2.6.1.1).**

The figure 2c shows AAT zymograms of some samples. In the present results, 6 morphs were obtained with 2 morphs for AAT-A and 4 morphs for AAT-B. Each pattern contains 2 bands except for samples 11, 14, 36, 64, 85 and 93 where no bands have been observed for the AAT system. The band A43.6 is the most common as it appears in 47 profiles, followed by the band A33.8 observed in 38 profiles. One rare morph (A38.2) is specific of sample 46. The band A27.6 is observed in 4 samples (3, 26, 91, 100). The band A45.2 is specific of 6 samples (1, 8, 13, 33, 56, 89). Accessions 5-59-65-6-7-10-17-19-20-22-32-51-57-72-80-70-83-35-37-38-42-47-71-79-81-87-90-23-34-55-63-15-41 are characterized by a unique profile which contains the two following bands: A33.8 and A43.6. The following samples are also characterized by a unique pattern: 1-8-13-33, 3-26-91-100, 18-27-29-40-43-45-49-74-77-102, 56-89. Sample 46 have a unique profile.

### **Cluster analysis based on isozym data**

Dendrogram generated from the three enzymatic systems is shown in figure 3. At the distance of 3.08, the dendrogram shows two major clusters. The first one is divided into two subclusters. Ia (d=2.00) comprises samples 57, 51, 22, 20, 10 and 7. Ib comprises two groups. The first one (Ib1) contains samples 93, 36, 85, 64, 14 and 11. The second one (Ib2) is composed of samples 33, 13 and 8 linked to accessions 83, 80, 72, 71, 70, 65, 59, 47, 42, 38, 37, 35, 32, 19, 17 and 6 also connected to samples 5 and 15. The cluster II (d=3.05) is divided into two subclusters. The accession 46 beign it self the first subcluster (IIa). IIb can further be divided into two groups where sample 100 forms the first group (IIb1). IIb2 comprises a first group in which samples 56 and 89 are linked to accession 102 one side and samples 77, 74, 49, 45, 43 40, 29, 27, 18 and acecions 26 and 3 another side. A second group is composed of samples 81, 55, 41, 34 and 23 linked to the sample 91 and clustered to accessions 90, 87, 79, 63 one side and sample 1 another side. The higher distance (d=3.74) is observed between the sample 46 and the following accessions: 19, 20, 22, 32, 33, 35, 37, 38, 47, 51, 57, 59, 65, 70, 71, 72, 80 and 83.



**Figure 3.** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis and Euclidean distances based on three enzymatic systems diversity of 60 *Vicia* accessions

### Correlation between enzymes patterns of the three enzymatic systems studied

Correlation between enzymatic systems taken two by two was carried out with Mantel test based on Pearson’s correlation. The p-value was calculated from the distribution of  $r(AB)$  using 10000 permutations. Correlation between SOD (matrix B) and ADH (matrix C) gives a value of  $r(AB) = 0.7075$ , between SOD and AAT (matrix A),  $r = 0.1867$  and between ADH and AAT,  $r = 0.2354$ . This test shows a strong correlation between each couple of enzymatic systems, since the calculated p-values ( $< 0,0001$ ) are below the significance level of alpha ( $0.05 = 5\%$ ). The correlation between the three systems gives a value of  $r(AB.C) = 0.6950$  showing also a strong correlation between the three systems studied since the calculated p-value ( $< 0,0001$ ) is below the significance level of alpha ( $0.05 = 5\%$ ).

### Physical seed properties

The physical properties of vetch, along with means and standard deviations are presented in Table 3.

**Table 3.** Means and standard deviations of physical seed properties of accessions studied

Sample	L (mm)	W (mm)	T (mm)	Da	Dg	$\phi$ (%)	S (mm <sup>2</sup> )	V (mm <sup>3</sup> )	Dsq	De	Ras	m <sub>1000</sub> (g)
1	5,41	5,59	3,89	4,96	4,88	90,25	75,63	62,83	4,93	4,92	1,03	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	0,24	0,91	0,66	0,50	0,52	8,723	16,68	21,52	0,51	0,51	0,15	90,33
	94	73	94	98	04	6	30	46	36	42	58	±
												7,03

3	5,49 ± 0,25 97	4,53 ± 0,55 44	4,44 ± 0,20 10	4,82 ± 0,33 84	4,79 ± 0,21 05	87,33 ± 3,931 9	72,11 ± 6,388 1	57,73 ± 7,727 0	4,80 ± 0,20 87	4,80 ± 0,20 86	0,83 ± 0,11 17	78,75 ± 2,443 2
5	4,37 ± 0,55 81	3,84 ± 0,47 55	4,08 ± 0,48 16	4,07 ± 0,37 72	3,99 ± 0,38 48	92,02 ± 7,990 3	50,55 ± 9,595 0	34,20 ± 9,624 8	4,03 ± 0,37 97	4,03 ± 0,38 03	1,08 ± 0,09 01	25,46 ± 4,084 2
6	6,23 ± 0,32 73	5,49 ± 0,49 63	4,30 ± 0,45 80	5,34 ± 0,17 03	5,26 ± 0,16 94	84,63 ± 4,458 6	87,11 ± 5,607 3	76,55 ± 7,393 4	5,30 ± 0,16 72	5,30 ± 0,16 71	0,88 ± 0,07 67	104,8 2± 4,247 7
7	4,08 ± 0,23 45	4,17 ± 0,27 21	3,35 ± 0,23 01	3,87 ± 0,18 53	3,84 ± 0,18 53	94,36 ± 4,484 7	46,52 ± 4,403 0	29,93 ± 4,169 0	3,86 ± 0,18 52	3,86 ± 0,18 52	1,29 ± 0,07 04	41,06 ± 1,260 2
8	3,55 ± 0,25 07	3,44 ± 0,22 92	3,07 ± 0,26 52	3,35 ± 0,21 01	3,34 ± 0,21 33	94,38 ± 3,289 8	35,23 ± 4,474 6	19,77 ± 3,754 2	3,35 ± 0,21 15	3,35 ± 0,21 16	0,97 ± 0,06 25	24,96 ± 1,563 1
10	4,70 ± 0,25 05	5,31 ± 0,48 96	3,94 ± 0,26 37	4,65 ± 0,23 75	4,61 ± 0,23 51	98,13 ± 2,768 3	66,86 ± 6,735 0	11,14 ± 1,122 5	4,63 ± 0,23 60	4,63 ± 0,23 60	1,13 ± 0,10 75	67,27 ± 4,213 4
11	3,71 ± 0,42 85	3,70 ± 0,49 68	3,46 ± 0,50 02	3,62 ± 0,36 28	3,61 ± 0,36 75	97,52 ± 5,532 7	41,22 ± 8,103 1	6,87± 1,350 5	3,61 ± 0,36 49	3,61 ± 0,36 50	1,00 ± 0,08 76	33,84 ± 2,322 6
13	3,60 ± 0,13 23	3,58 ± 0,14 64	3,15 ± 0,12 30	3,44 ± 0,11 13	3,44 ± 0,11 08	95,40 ± 2,148 0	37,11 ± 2,418 4	21,32 ± 2,103 9	3,44 ± 0,11 10	3,44 ± 0,11 10	0,99 ± 0,03 39	28,41 ± 1,560 6
14	3,25 ± 0,21 14	3,19 ± 0,28 04	3,09 ± 0,11 04	3,18 ± 0,14 96	3,17 ± 0,14 74	97,71 ± 3,696 1	31,70 ± 2,906 7	16,83 ± 2,283 3	3,18 ± 0,14 85	3,18 ± 0,14 85	0,98 ± 0,07 58	25,75 ± 1,469 5
15	3,44 ± 0,18 60	3,28 ± 0,21 85	2,94 ± 0,21 75	3,22 ± 0,16 39	3,21 ± 0,16 43	93,44 ± 3,407 5	32,39 ± 3,348 5	5,40± 0,558 1	3,21 ± 0,16 41	3,21 ± 0,16 40	0,95 ± 0,05 50	21,63 ± 1,239 5
17	5,18 ± 0,24 87	5,08 ± 0,26 87	3,90 ± 0,15 56	4,72 ± 0,12 39	4,68 ± 0,11 91	90,44 ± 2,928 3	68,77 ± 3,497 9	53,67 ± 4,091 2	4,70 ± 0,12 16	4,70 ± 0,12 14	0,98 ± 0,07 48	79,36 ± 2,025 4
18	5,04 ± 0,46 82	4,73 ± 0,56 16	3,77 ± 0,60 29	4,51 ± 0,48 24	4,47 ± 0,50 00	88,67 ± 5,186 9	63,40 ± 13,65 31	48,23 ± 15,05 84	4,49 ± 0,49 05	4,49 ± 0,49 09	0,94 ± 0,08 17	58,03 ± 5,841 7
19	2,11 ±	2,15 ±	2,00 ±	2,09 ±	2,08 ±	98,83 ±	13,90 ±	5,02± 2,225	2,08 ±	2,08 ±	1,02 ±	7,06± 0,427

	0,36 30	0,36 28	0,27 86	0,31 80	0,31 67	4,234 7	4,180 0	8	0,31 73	0,31 73	0,08 84	9
20	4,59 ± 0,48 65	4,84 ± 0,82 15	3,64 ± 0,31 66	4,35 ± 0,40 73	4,31 ± 0,38 52	94,15 ± 7,058 6	58,65 ± 10,80 78	42,70 ± 12,15 85	4,33 ± 0,39 64	4,33 ± 0,39 61	1,06 ± 0,16 82	49,56 ± 1,910 6
22	5,06 ± 0,65 63	5,17 ± 0,48 30	4,06 ± 0,40 22	4,76 ± 0,38 17	4,72 ± 0,37 52	93,97 ± 5,434 8	70,50 ± 11,04 45	56,12 ± 13,01 91	4,74 ± 0,37 83	4,74 ± 0,37 83	1,03 ± 0,13 94	60,33 ± 5,040 7
23	7,14 ± 0,25 16	6,12 ± 0,64 31	6,57 ± 0,31 42	6,61 ± 0,33 08	6,59 ± 0,33 70	92,21 ± 2,342 2	136,7 0± 14,06 86	150,8 2± 23,41 44	6,60 ± 0,33 38	6,60 ± 0,33 39	0,86 ± 0,07 24	189,2 6± 9,698 9
26	4,78 ± 0,21 09	4,57 ± 0,25 33	3,98 ± 0,22 93	4,44 ± 0,16 12	4,42 ± 0,16 27	92,66 ± 1,399 9	61,58 ± 4,500 3	45,52 ± 4,962 0	4,43 ± 0,16 18	4,43 ± 0,16 19	0,96 ± 0,05 81	60,71 ± 1,758 1
27	5,23 ± 0,17 63	4,84 ± 0,44 90	4,26 ± 0,36 81	4,78 ± 0,21 89	4,75 ± 0,22 50	90,79 ± 2,852 2	70,95 ± 6,778 2	56,54 ± 8,136 6	4,77 ± 0,22 16	4,76 ± 0,22 17	0,92 ± 0,07 62	68,19 ± 5,353 1
29	5,42 ± 0,26 29	4,72 ± 0,41 19	4,11 ± 0,57 32	4,75 ± 0,20 13	4,70 ± 0,21 55	86,78 ± 3,700 3	69,58 ± 6,337 1	54,73 ± 7,434 3	4,73 ± 0,20 67	4,73 ± 0,20 73	0,87 ± 0,06 60	72,20 ± 5,451 5
32	4,39 ± 0,16 50	4,88 ± 0,27 04	3,80 ± 0,29 30	4,36 ± 0,19 26	4,33 ± 0,19 71	98,56 ± 2,601 3	59,03 ± 5,389 0	42,76 ± 5,871 4	4,34 ± 0,19 45	4,34 ± 0,19 47	1,11 ± 0,05 80	63,21 ± 2,478 1
33	3,90 ± 0,18 47	3,87 ± 0,19 28	3,46 ± 0,21 37	3,74 ± 0,17 64	3,74 ± 0,17 79	95,88 ± 2,016 6	43,98 ± 4,147 5	27,51 ± 3,854 6	3,74 ± 0,17 71	3,74 ± 0,17 71	0,99 ± 0,04 41	36,32 ± 2,089 6
34	6,67 ± 0,65 47	5,85 ± 0,63 70	6,05 ± 0,61 69	6,19 ± 0,39 15	6,16 ± 0,37 70	92,76 ± 4,842 6	119,5 7± 14,26 90	123,5 4± 21,54 67	6,17 ± 0,38 45	6,17 ± 0,38 42	0,89 ± 0,13 52	177,4 0± 10,29 07
35	2,91 ± 0,17 59	2,92 ± 0,34 99	2,45 ± 0,31 12	2,76 ± 0,19 77	2,74 ± 0,20 03	94,44 ± 5,529 0	23,75 ± 3,551 7	10,96 ± 2,524 1	2,75 ± 0,19 80	2,75 ± 0,19 85	1,00 ± 0,10 22	19,21 ± 2,306 1
36	3,05 ± 0,14 97	3,12 ± 0,15 97	3,01 ± 0,15 13	3,06 ± 0,11 08	3,07 ± 0,10 88	100,5 3± 3,536 5	19,27 ± 0,683 5	15,04 ± 1,632 6	3,06 ± 0,11 11	3,06 ± 0,10 96	1,02 ± 0,07 51	22,06 ± 0,639 8
37	3,56 ± 0,21 96	3,54 ± 0,29 57	3,42 ± 0,32 61	3,51 ± 0,20 33	3,50 ± 0,20 84	98,53 ± 4,858 1	38,65 ± 4,618 7	22,70 ± 4,080 3	3,51 ± 0,20 57	3,51 ± 0,20 58	1,00 ± 0,07 49	26,73 ± 1,147 3

38	2,95 ± 0,22 33	2,85 ± 0,35 70	2,66 ± 0,35 03	2,82 ± 0,29 42	2,82 ± 0,29 94	95,38 ± 5,073 7	25,15 ± 5,076 8	12,03 ± 3,468 0	2,82 ± 0,29 70	2,82 ± 0,29 69	0,97 ± 0,07 93	16,94 ± 1,217 4
40	4,76 ± 0,48 55	4,48 ± 0,55 01	4,20 ± 0,39 70	4,48 ± 0,22 55	4,45 ± 0,22 18	94,37 ± 9,674 9	62,39 ± 6,353 1	46,50 ± 7,256 0	4,46 ± 0,22 37	4,46 ± 0,22 36	0,95 ± 0,17 13	61,13 ± 6,027 2
41	5,46 ± 0,57 25	5,46 ± 0,44 61	5,09 ± 0,49 06	5,33 ± 0,40 78	5,32 ± 0,40 80	97,88 ± 5,163 3	89,50 ± 13,20 35	80,22 ± 17,16 24	5,33 ± 0,40 79	5,33 ± 0,40 79	1,00 ± 0,06 89	113,1 0± 1,581 1
42	4,26 ± 0,27 31	4,28 ± 0,31 37	3,74 ± 0,12 03	4,09 ± 0,17 63	4,08 ± 0,16 85	96,02 ± 3,668 4	52,39 ± 4,316 4	35,74 ± 4,405 4	4,09 ± 0,17 24	4,09 ± 0,17 24	1,01 ± 0,06 91	48,97 ± 0,945 2
43	6,27 ± 0,46 60	5,93 ± 0,75 36	5,06 ± 0,59 03	5,75 ± 0,53 02	5,72 ± 0,53 31	91,20 ± 3,334 2	103,6 8± 18,24 47	100,3 4± 25,02 39	5,74 ± 0,53 17	5,74 ± 0,53 17	0,94 ± 0,07 16	132,4 4± 8,532 4
45	3,81 ± 0,30 11	3,70 ± 0,28 68	3,42 ± 0,28 45	3,64 ± 0,27 10	3,64 ± 0,27 20	95,60 ± 1,987 5	41,78 ± 6,217 3	25,58 ± 5,680 8	3,64 ± 0,27 15	3,64 ± 0,27 15	0,97 ± 0,03 96	36,15 ± 1,787 7
46	5,27 ± 0,41 87	5,80 ± 0,43 15	3,57 ± 0,23 29	4,88 ± 0,33 22	4,78 ± 0,31 85	90,74 ± 3,416 9	71,95 ± 9,152 6	57,68 ± 10,49 79	4,83 ± 0,32 59	4,83 ± 0,32 54	1,10 ± 0,05 18	60,82 ± <b>1,158</b> <b>3</b>
47	3,88 ± 0,20 83	3,70 ± 0,17 67	3,38 ± 0,22 62	3,65 ± 0,18 34	3,65 ± 0,18 41	93,98 ± 1,612 0	41,85 ± 4,225 1	25,54 ± 3,865 0	3,65 ± 0,18 37	3,65 ± 0,18 37	0,95 ± 0,03 12	31,04 ± 3,140 0
49	4,71 ± 0,36 72	4,13 ± 0,39 42	3,84 ± 0,26 58	4,23 ± 0,23 07	4,20 ± 0,23 19	89,41 ± 4,867 5	55,65 ± 6,099 6	39,20 ± 6,394 0	4,21 ± 2,28 97	4,21 ± 0,23 11	0,88 ± 0,10 88	55,97 ± 3,568 1
51	3,92 ± 0,17 94	3,99 ± 0,33 20	2,56 ± 0,15 33	3,49 ± 0,11 40	3,42 ± 0,10 02	87,34 ± 4,135 4	36,68 ± 2,169 1	20,91 ± 1,869 1	3,46 ± 0,10 74	3,46 ± 0,08 00	1,02 ± 0,09 26	25,28 ± 0,421 2
55	5,89 ± 0,50 13	5,38 ± 0,96 55	5,25 ± 0,36 86	5,50 ± 0,42 48	5,48 ± 0,42 17	93,19 ± 4,543 8	94,68 ± 14,70 06	87,33 ± 20,51 39	5,49 ± 0,42 28	5,49 ± 0,42 30	0,91 ± 0,14 53	111,5 5± 6,623 5
56	4,46 ± 0,55 43	5,19 ± 0,61 30	3,58 ± 0,35 39	4,41 ± 0,31 50	4,34 ± 0,31 33	98,28 ± 9,170 2	59,56 ± 8,326 9	43,51 ± 8,855 0	4,38 ± 0,31 37	4,38 ± 0,31 38	1,18 ± 0,20 27	61,94 ± 2,490 8
57	4,93	5,29	4,10	4,78	4,74	96,43	70,84	56,33	4,76	4,76	1,08	80,67



	± 0,39 23	± 0,43 64	± 0,33 04	± 0,27 91	± 0,27 72	± 5,269 3	± 8,390 5	± 10,14 28	± 0,27 79	± 0,27 79	± 0,11 20	± 5,025 1
59	3,78 ± 0,19 21	3,74 ± 0,23 30	3,31 ± 0,31 58	3,61 ± 0,22 94	3,60 ± 0,23 38	95,22 ± 2,332 0	40,91 ± 5,226 7	24,74 ± 4,661 9	3,61 ± 0,23 15	3,61 ± 0,23 15	0,99 ± 0,01 49	36,78 ± 2,057 8
63	5,33 ± 0,55 18	5,26 ± 0,42 11	4,18 ± 0,17 52	4,92 ± 0,34 62	4,89 ± 0,32 36	92,11 ± 3,512 0	75,37 ± 10,24 70	61,91 ± 12,94 99	4,91 ± 0,33 58	4,91 ± 0,33 52	0,99 ± 0,03 39	82,05 ± 3,971 8
64	3,32 ± 0,24 18	3,36 ± 0,35 45	3,18 ± 0,20 13	3,29 ± 0,24 22	3,28 ± 0,23 89	98,94 ± 2,020 2	34,02 ± 5,160 4	18,80 ± 4,463 8	3,28 ± 0,24 05	3,28 ± 0,24 05	1,01 ± 0,06 33	25,62 ± 0,776 2
65	3,29 ± 0,25 17	3,20 ± 0,25 41	2,76 ± 0,42 29	3,08 ± 0,21 73	3,06 ± 0,22 98	93,12 ± 4,480 1	29,63 ± 4,466 7	15,28 ± 3,467 5	3,07 ± 0,22 26	3,07 ± 0,22 30	0,97 ± 0,09 01	22,94 ± 0,482 8
70	4,84 ± 0,35 78	4,77 ± 0,47 10	4,10 ± 0,24 56	4,57 ± 0,23 46	4,55 ± 0,22 28	94,17 ± 3,139 7	65,13 ± 6,425 1	49,58 ± 7,385 7	4,56 ± 0,22 87	4,56 ± 0,22 86	0,99 ± 0,08 82	68,26 ± 1,832 1
71	3,41 ± 0,23 97	3,34 ± 0,27 33	3,21 ± 0,24 60	3,32 ± 0,24 40	3,32 ± 0,24 44	97,19 ± 1,365 3	34,70 ± 5,051 0	19,36 ± 4,172 4	3,32 ± 0,24 42	3,32 ± 0,24 42	0,98 ± 0,04 01	26,83 ± 1,925 6
72	4,41 ± 0,36 88	4,42 ± 0,38 54	3,71 ± 0,35 95	4,18 ± 0,34 56	4,16 ± 0,34 56	94,47 ± 1,873 8	54,71 ± 8,863 0	38,40 ± 9,120 9	4,17 ± 0,34 55	4,17 ± 0,34 56	1,00 ± 0,02 88	51,01 ± 1,938 7
74	4,65 ± 0,47 26	4,53 ± 0,41 75	3,94 ± 0,33 03	4,37 ± 0,35 56	4,36 ± 0,35 13	93,98 ± 2,740 3	27,38 ± 2,207 0	44,06 ± 9,548 3	4,37 ± 0,35 35	4,37 ± 0,35 34	0,98 ± 0,07 12	54,47 ± 10,15 58
77	4,63 ± 0,32 61	4,68 ± 0,42 05	3,92 ± 0,43 20	4,41 ± 0,32 88	4,39 ± 0,33 21	94,87 ± 3,655 6	60,86 ± 8,564 2	44,96 ± 8,853 3	4,40 ± 0,33 02	4,40 ± 0,33 03	1,01 ± 0,05 79	59,82 ± 1,654 7
79	5,55 ± 0,41 21	5,86 ± 0,59 29	4,32 ± 0,33 15	5,24 ± 0,35 88	5,19 ± 0,34 79	93,63 ± 4,279 3	85,05 ± 11,52 70	74,20 ± 15,26 17	5,22 ± 0,35 31	5,22 ± 0,35 31	1,06 ± 0,09 36	108,7 8± 5,484 9
80	5,49 ± 0,25 95	5,37 ± 0,38 16	4,43 ± 0,28 32	5,10 ± 0,12 03	5,06 ± 0,12 03	92,41 ± 4,000 5	80,62 ± 3,806 1	68,12 ± 4,793 2	5,08 ± 0,12 01	5,08 ± 0,12 01	0,98 ± 0,09 87	86,05 ± 6,181 4
83	3,99 ±	4,17 ±	3,54 ±	3,90 ±	3,88 ±	97,25 ±	47,54 ±	30,98 ±	3,89 ±	3,89 ±	1,04 ±	42,10 ±

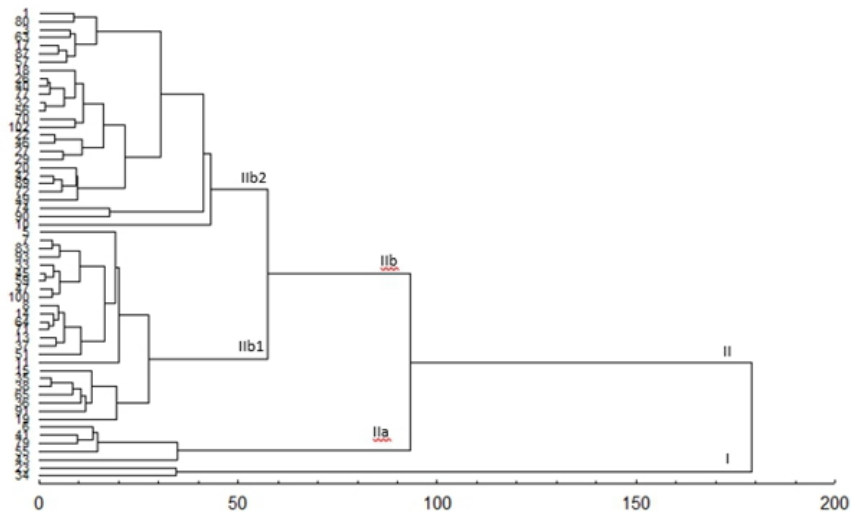
	0,17 37	0,51 18	0,31 44	0,25 09	0,24 42	4,967 0	5,870 4	5,641 9	0,24 66	0,24 71	0,12 53	2,393 3
87	5,13 ± 0,38 18	5,03 ± 0,30 96	3,97 ± 0,43 52	4,71 ± 0,34 60	4,67 ± 0,35 51	91,15 ± 1,812 6	69,00 ± 10,65 34	54,32 ± 12,77 33	4,07 ± 0,27 54	4,48 ± 0,32 51	0,98 ± 0,04 70	84,12 ± 3,886 2
89	4,29 ± 0,31 21	4,48 ± 0,37 54	3,36 ± 0,19 38	4,04 ± 0,24 53	4,01 ± 0,23 67	93,59 ± 3,031 0	50,56 ± 5,954 4	33,97 ± 5,973 1	4,02 ± 0,24 13	4,02 ± 0,24 10	1,05 ± 0,06 71	48,07 ± 2,789 0
90	5,20 ± 0,46 92	5,21 ± 0,40 18	3,53 ± 0,59 64	4,65 ± 0,46 10	4,57 ± 0,49 30	87,69 ± 3,829 7	28,69 ± 3,097 5	51,33 ± 14,81 40	4,61 ± 0,47 38	4,61 ± 0,47 58	1,00 ± 0,04 72	69,05 ±
91	2,63 ± 0,36 06	2,44 ± 0,31 41	2,13 ± 0,36 31	2,40 ± 0,33 70	2,39 ± 0,33 88	90,68 ± 2,436 5	18,25 ± 4,946 2	7,51± 2,914 7	2,39 ± 0,33 78	2,39 ± 0,33 79	0,93 ± 0,02 48	16,21 ± 0,212 0
93	3,79 ± 0,17 84	4,15 ± 0,17 14	3,50 ± 0,24 11	3,81 ± 0,17 83	3,80 ± 0,18 08	100,2 4± 2,368 5	45,47 ± 4,341 9	28,92 ± 4,154 9	3,35 ± 0,14 51	3,65 ± 0,16 79	1,09 ± 0,04 30	42,17 ± 1,375 1
100	3,74 ± 0,17 08	3,81 ± 0,18 76	3,28 ± 0,16 75	3,61 ± 0,14 09	3,60 ± 0,14 16	96,30 ± 1,837 5	40,69 ± 3,179 1	24,46 ± 2,842 4	3,60 ± 0,14 13	3,60 ± 0,14 13	1,02 ± 0,05 63	32,97 ± 2,611 2
102	5,26 ± 0,39 99	4,34 ± 0,36 35	4,00 ± 0,44 90	4,53 ± 0,28 03	4,49 ± 0,27 56	85,55 ± 2,633 1	63,69 ± 7,837 7	48,03 ± 8,894 7	4,51 ± 0,27 75	4,51 ± 0,27 77	0,83 ± 0,07 63	66,63 ± 3,733 9

L: length, W: width, T: thickness, D<sub>a</sub>: arithmetic diameter, D<sub>g</sub>: geometric diameter,  $\phi$ : sphericity, S: surface area, V: volume, D<sub>sq</sub>: square mean diameter, D<sub>e</sub>: equivalent diameter, R<sub>as</sub>: seed aspect ratio, m<sub>1000</sub>: 1000 seed weight.

### Cluster analysis based on physical seed properties

The dendrogram generated by physical seed properties is shown in figure 4. The dendrogram is composed of 2 major clusters at a distance of 189.16. Samples 23 and 34 being the first cluster. The second cluster is divided into two sub-clusters. IIa (d=34.72) is composed of accession 43 linked to accessions 55, 79, 41 and 6. IIb is further divided into 2 groups (IIb1, IIb2). IIb1 (d=27.49) is composed of samples 19, 91, 36, 65, 38, 35 and 15 one side clustered with samples 11, 51, 37, 13, 71, 64, 14, 8, 100, 47, 59, 45, 33, 93, 83, 7 and 5 another side. IIb2 (d=43.14) comprises sample 10 linked with two groups: the first one contains samples 90 and 74. The second one is composed of two clades. The first calde (d=21.43) is composed of accessions 49, 72, 89, 42, 20, 29, 27, 46, 22, 102, 70, 56, 32, 77, 40, 26 and 18. The second clade (d=14.47) comprises samples 57, 87, 17, 63, 3, 80 and

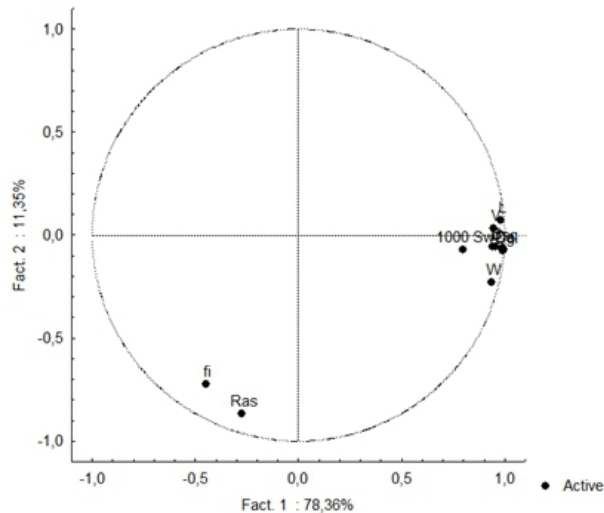
1. The higher distance of  $d= 264$  is observed between samples 23 and 19. High distances are also observed between sample 23 and all other accessions and between sample 34 and other accessions. In parallel, the lower distance ( $d=1$ ) is observed between accessions 45 and 59. A distance of  $d=2$  is obtained for the following couples: 56-32, 26-40, 64-71.



**Figure 4.** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis and Euclidean distances based on physical seed properties of accessions investigated

### Principal Component Analysis (PCA) of physical seed properties

The results of PCA are shown in figure 5. The results revealed that the first three axes accounted for 94.95% of the total variation with 78.56% for PC1, 11.33% for PC2 and 5.05% for PC3. Two-dimensional (2D) plot was obtained using the first two PCs. The seed properties which strongly contributed to the formation of PC1 are  $D_e$ ,  $D_a$ ,  $D_g$  and  $D_{sq}$  and those which most contribute to the formation of PC2 are  $R_{as}$  and  $\phi$ . In the other side, characters which have a low loading in accessions distinction are  $R_{as}$  and  $\phi$  for PC1 and  $V$  and  $T$  for PC2. The strongest positive correlation was found between  $D_g-D_a$ ,  $D_e-D_a$ ,  $D_e-D_g$  with  $r=0.999$  followed by  $D_a-D_{sq}$  and  $D_{sq}-D_e$  with  $r=0.993$ . The strongest negative one was obtained between  $L-\phi$  ( $r=-0.532$ ),  $D_{sq}-\phi$  ( $r=0.401$ ) and  $D_a-\phi$  ( $r=0.400$ ).



**Figure 5.** Principal Component Analysis based on 12 physical seed properties

### **Correlation between enzymes patterns and physical seed properties**

Correlation between enzymatic systems data and physical seed properties was carried out with Mantel test based on Pearson's correlation. The p-value was calculated from the distribution of  $r(AB)$  using 10000 permutations. The test gives a value of  $r(AB.C) = 0.172$  showing a strong correlation between isozymes and seed properties since the p-value ( $< 0.0001$ ) is below the significance level (5%).

## **Discussion**

### **Enzymes polymorphism**

The electrophoretic mobility values in Table 2 may differ from those previously reported by other studies because of differences in the electrophoresis gel composition used, as reported by Jaaska (2008). The age of seedlings proved to be not important as it does not influence electrophoretic mobility. A strong correlation was obtained between data of the three studied systems one side and between the systems taken two by two one side which led utilization of one of them in taxa identification. Our data show that SOD is the most interspecific variable system, which could be related to its role in periferic metabolism. Accessions lacked the chloroplastic SOD-A even on the zymograms of leaflets, presumably because of the presence of an inhibitory substance as reported by Jaaska (2005). Our results concord with those reported by Gonzalez and Shiffino-Wittman (1996) where eleven different SOD bands were found, ranged from 2 to 3 per sample, no one being common to all of them. Gels stained for Alcohol DeHydrogenase displayed three zones of activity. ADH is a dimeric protein encoded by two loci (ADH-A and ADH-B) according to the work of

Li and Gao (1998). ADH isozymes should appear as dark bands on gels stained for ADH activity. SOD may appear as an artifact on gels stained with solutions containing MTT/PMS and it has been known to appear on gels stained for ADH after prolonged incubation. ADH and SOD data would be the same. Perhaps this contributed to the rather high correlation observed between the ADH and SOD data matrices. Aspartate Amino Transferase produced two monomorphic zones of activity with different intensities (Figure 2c). Each zone is specified by one gene: AAT-A and AAT-B that determined AAT isozymes. On the zymograms of green leaflets the AAT-A band, dominated in intensity, indicating possible plastidic nature. The following bands can be used as diagnostic characters for taxa discrimination by isozyme analyses: A38.2, AD33.5, S58, S41.6 for *V. monantha* subsp. *cinerea*, A27.6 for samples of sect. Cracca as in the cases of accessions 3, 26, 91 and 100, AD43, S49.2 for *V. leucantha*, AD31.6 and S39.5 for *V. sativa* subsp. *obovata*, S50.3 for *V. narbonensis*.

### Cluster analysis based on isozymes polymorphism

There is a general agreement between the phenogram and taxonomic classification, with some exceptions. Cluster analysis of the three enzymatic systems revealed two basic monophyletic groups: I) populations of *V. sativa* s.l (section *Vicia*) in one cluster II) all accessions of *V. monantha* (section Cracca) in one subcluster linked with samples of *V. lutea* (section *Hypechusa*) in a second subcluster which is connected to samples of *V. narbonensis*. Thus, species of sect. *Narbonensis*, (subgenus *Vicia*), sect. *Hypechusa* (subgenus *Vicia*) and sect. Cracca (subgenus *Vicilla* sensu Kupicha) clustered together.

### Cluster I

Variability in all taxa of *V. sativa* is overlapping and many of the subdivisions are known to interbreed with each other (Bozkurt et al. 2013). In the present work, the all studied taxa of *V. sativa* (section *Vicia*) cluster together on the basis of isozymes polymorphism which indicates a close relationship between subspecies of *V. sativa* when it is difficult to determine distinct groups which could be individually identified as *obovata*, *consobrina*, *cordata* or *angustifolia*. According to Jaaska (2008), the subspecies of *V. sativa* have common orthozymes, differing mostly by the presence of additional allozymes of some heterozymes and in their relative occurrence. Our results are congruent with the AFLP data of Potokina et al. (2002) and Jaaska (2015) that showed all taxa of the *V. sativa* L. aggregate in a separate cluster. The same findings were reported in our previous work on the same taxa using plant morphology (Bechkri and Khelifi 2016) and seed storage proteins polymorphism (not published). Concerning accession 17

which was found to present lot of different morphological characters compared with the other accessions belonging to the same subspecies (*V. sativa* subsp. *obovata*) with the white standard (Bechkri and Khelifi 2016), it is connected to samples of the same taxa using isozymes data. Accessions of *V. sativa* which we attributed to subsp. *cordata* on the morphological ground could not be distinguished from other taxa of *V. sativa* by any specific morphs. The isozymes studied here can be used to discriminate taxa belonging to *V. sativa* at interpecific level but not at intraspecific one. Some accessions of *V. sativa* subsp. *obovata* were distinguished by having common SOD pattern with morphs S37.5, S39.5 for samples 7 and 10 and morphs S34.5-S39.5-S41 for samples 20, 22, 51, 57.

## Cluster II

In the same group, samples of *V. lutea* (sect. *Hypechusa*) clustered all together as well as samples of *V. narbonensis* (sect. *Narbonensis*). The taxa of *V. narbonensis* showed the same three morphs (S37.5, S44.6, S50.3). Our results concord with those of Jaaska and Leht (2007) which showed the species of sections *Hypechusa* as sister to the clade of section *Narbonensis*. A closer relationship between the NSC and section *Hypechusa* has been deduced based on isozyme studies by Jaaska (1997) where the *Narbonensis* section appears as a clade on both cladistic and phenetic trees which is linked to species of the section *Hypechusa*. Jaaska (2005) reported that species of the section *Cracca* form a subgroup of closely related species that revealed extensive homologous polymorphism with shared allozymes without any differentiation by species-specific orthozymes. *Vicia monantha* appears basally sister to the remaining species of the section on the phylogenetic tree. Also, in our results, the cluster II contains samples of *V. monantha* subsp. *calcarata* (sect. *Cracca*) all together joined with the two samples of *V. tenuifolia* and the unique sample of *V. leucantha*. In spite of this, our analysis of enzymes data supports Kupicha's placement of *V. leucantha* in section *Cracca* as was also done by Davis and Plitmann (1970). The same findings were reported in our previous work using plant morphology (not published). The species *V. monantha*, *V. tenuifolia* and *V. leucantha*, classified by Kupicha (1976) in section *Cracca* appear in a well-supported monophyletic group in the present work. *V. tenuifolia* and *V. leucantha*, form a subgroup of closely related species that revealed extensive homologous polymorphism with shared characters. The sample 46 belonging to *V. monantha* subsp. *cinerea* forms a separate subcluster as it has a unique pattern for each of the three studied systems. It is not linked to accession 91 of the same taxa which is clustered with accessions of *V. lutea*. This rare variante may be ignored in aphylogenetic analysis as proposed by Stevens (1991). The unexpected linkage of the sample 91 with samples of *V. lutea* in the cladistic isozyme

tree may be caused by electrophoretic homoplasy of some shared orthozymes as reported by Jaaska (2015). The three systems studied seem to be more suitable for studies of interspecific genetic diversity than of intraspecific affinities.

### **Physical seed properties**

The variability of physical seeds properties of natural populations of *Vicia* in Algeria has not previously been characterized. In many cases, morphological characteristics such as seed dimensions can be used to distinguish species and subspecies (Bewley and Black, 1994; Hammet et al., 1996). The relationship between seed size and seed number may be an important mechanism underlying the abundance and dynamics of plant species (Jakobsson and Eriksson, 2000). Our UPGMA cluster method gave no clear grouping. The general picture showed that accessions of the same species preferred to cluster with themselves rather than have a wide distribution in different groups. The accessions of species traditionally considered to have a high degree of variation (Ball 1968), for example *V. sativa*, were present in more than one cluster group. The same observations were done by Perrino et al. (1984). Physical seed properties which separate the most the samples are equivalent diameter, arithmetic diameter, geometric diameter and square diameter. At the same time, strong correlation was found between these four properties showing the potential use of one of them to distinguish taxa. Our results show that both the arithmetic mean and the geometric mean method can be used to determine the average diameter of vetch seeds. A similar result was found by Kaleemullah and Gunasekar (2002) for arecanut kernels. Results show that the longer, wider and thicker seed can be the less spherical as in the case of sample 6 (*V. sativa* subsp. *obovata*). Values of seeds surface area and volume follow those of size dimensions. Samples 19 and 23 are a good example in this case. Concerning variability between samples belonging to the same taxa, the explanation for this phenomenon lies in the genetic and environmental characteristics of seed polymorphism (Bewley and Black, 1994). In species producing two or more seed types, there is a tendency for seed functions to diverge, each type being adapted to an aspect of the environment to which it is predisposed, whilst being buffered by the other seed type (Mandak, 1997). Moreover, it has been proven that seeds which vary in appearance also vary in chemical composition (Aniszewski et al. 2001). This suggests that if we are to manipulate the chemical constituents of seeds in general, it is very important to classify seeds according to types and physical properties. According to Westoby et al. (1992), selection pressures acting on the seeds during the course of an experiment can influence their size, number and weight. Several studies on seed characteristics (Getinet and Rakow 1997; Takashi 1997;

Kehinde et al. 1997; Asiedu and Powell, 1998) support the fact that seed polymorphism has a genetic basis. suggested that morphological characteristics of seeds such as seed shape can be used to distinguish taxa. In the case of *Vicia sativa*, the average seed dimensions decreased from *V. sativa* subsp. *obovata* to *V. sativa* subsp. *angustifolia* passing by *V. sativa* subsp. *cordata* and *V. sativa* subsp. *consobrina*. These results are more detailed than those given in the flora of Algeria (Quézel and Santa 1962) in which, the authors used seed dimension to discriminate subspecies of *V. sativa*. Indeed, they give a range of 3-5 mm for subsp. *obovata* and 2-3 mm for subsp. *cordata*, *consobrina* and *angustifolia* with any distinction between these three subspecies by seed dimensions. Species which produce two or more seed dimensions represent groups in which divergent strategies, usually present in different taxa, are combined in one individual (Mandak, 1997). Our results confirm the fact that *V. sativa* contains different sub-species often mentioned by taxonomists. For *V. monantha*, our results show that the two subspecies (*calcarata* and *cinerea*) have close values regarding physical properties studied and join Quézel and Santa (1962) who did not use seed dimensions to discriminate between the tow subspecies. The same conclusion can be given for *V. lutea* subsp. *eu-lutea* and *V. lutea* subsp. *vestita* which are not distinguish by seed dimensions but by the flower colour. Seed dimensions were not considered in the flora to distinguish *V. tenuifolia* and *V. leucantha*.

## Conclusion

The species groupings using AAT, SOD and ADH patterns are consistent with traditional taxonomic species delimitation. Therefore, isozyme patterns are useful and reliable biochemical markers for the taxonomic delimitation and characterization of *Vicia* germplasm. Evidently, additional data as evidence from the DNA characters are needed for more sound phylogenetic and taxonomic conclusions. In another side, due to the fact that classification of seeds is of major technical and economical importance in the agricultural industry, discriminant analysis was used to classify the seeds but shows no correspondence with systematics. In order to design equipment and facilities for the handling, conveying, separation, drying, aeration, storing and processing of vetch seed, future studies should be conducted to determine the 12 physical properties studied as a function of moisture content.

**Financial disclosure:** This work is not supported by any financial assistance.  
**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.



## References:

1. Aniszewski T, Kuparihm, Leinonen AJ. 2001. Seed Number, Seed Size and Seed Diversity in Washington Lupin (*Lupinus polyphyllus* Lindl.). *Annals of Botany*. 87: 77-82
2. Asiedu EA, Powell AA. 1998. Comparisons of the storage potential of cultivars on cowpea (*Vigna unguiculata*) differing in seed coat pigmentation. *Seed Science and Technology*. 26: 211-221.
3. Asoegwu SN, Ohanyere SO, Kanu OP, Iwueke CN. 2006. Physical properties of African Oil Bean Seed (*Pentaclethra macrophylla*). *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. Vol. VII.
4. Ball PW. 1968. *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (eds.) *Flora Europaea*, vol.2, *Rosaceae* to *Umbelliferae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 129-136
5. Bechkri S, Khelifi D. 2016. Variation in *Vicia sativa* s.l. from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution* DOI 10.1007/s10722-016-0404-1
6. Bewley JD, Black M. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*. New York, London: Plenum Press.
7. Bozkurt M, Ertugrul K, Uysal T. 2013. The determination of genetic relationships among some *Vicia* L. (Vetch) taxa by using ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation*. 6/3: 135-139
8. Davis PH, Plitmann U. 1970. *Vicia* L. In: Davis PH. (ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, pp. 274-321
9. Gates P, Boulter D. 1980. The use of pollen isoenzymes as an aid to the breeding of field beans (*Vicia faba* L.). *New phytologist*. 84(3): 501–504
10. Getinet A, Rakow G. 1997. Repression of seed coat pigmentation in Ethiopian mustard. *Canadian Journal of Plant Science*. 77: 501-505.
11. Gonzalez AC, Shiffino-Wittman MT. 1996. Isoenzymatic characterization of some *Lathyrus* L. and *Vicia* L. speices (Leguminosae) occurring in Rio Grande do Sul (Southern Brazil). *Brazilian Journal of Genetics*. 19(2): 283-288
12. Hammett KRW, Murray BG, Markham KR, Hallett IC, Osterloh I. 1996. New interspecific hybrids in *Lathyrus* (Leguminosae): *Lathyrus annuus* x *L. hierosolymitanus*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 122: 89-101.
13. Hanelt P, Mettin D. 1989. Biosystematics of the genus *Vicia* L. (*Leguminosae*) *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20: 199-223

14. Hauhouot-O'Hara M, Criner BR, Brusewitz GH, Solie JB. 2000. "Selected Physical Characteristics and Aerodynamic Properties of Cheat Seed for the Separation from Wheat". Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development. Vol. II.
15. Iannelli P. 1964. Variety testing of vetches. -Proc. Internatl. Seed Test. Assoc. 29: 887-907
16. Jaaska V. 2008. Isozyme evidence on the specific distinctness and phylogenetic position of *Vicia incisa* (Fabaceae). *Centr. Eur. J. Biol.* 3: 169-176.
17. Jaaska V. 2015. Phylogenetic relationships among sections *Vicia*, *Sepium* and *Lathyroides* of *Vicia* subgenus *Vicia*: isozyme evidence. *Biochemical Systematics and Ecology.* 62: 186-193
18. Jaaska V. 1997. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae). *Genet. Res. Crop Evol.* 44: 557–574
19. Jaaska V, Leht M. 2007. Phylogenetic relationships between and within sections *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Peregrinae* of genus *Vicia* (Fabaceae) based on evidence from isozymes and morphology. *CEJB* 2(1): 137–155
20. Jaaska V. 2001. Isoenzyme diversity and phylogenetic relationships among the American beans of the genus *Vigna* Savi (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology.* 29: 545–554.
21. Jaaska V. 2005. Isozyme Variation and Phylogenetic Relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (Fabaceae). *Annals of Botany.* 96: 1085–1096
22. Jakobsson A, Eriksson O. 2000. A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos.* 88: 494-502.
23. Kaleemullah S, Gunasekar JJ. 2002. Moisture-dependent physical properties of arecanut trues. *Biosys. Eng.* 82: 331-338
24. Kehinde OB, Myers GO, Fawole I. 1997. Analysis of genetic linkage in the cowpea *Vigna unguiculata*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science.* 20: 75-82.
25. Kupicha FK. 1976. The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh.* 34: 287-326
26. Leht M, Jaaska V. 2002. Cladistic and phenetic analysis of relationships in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) by morphology and isozymes. *Plant Systematics and Evolution.* 232: 237–260.
27. Li R, Gao Y. 1998. Biochemical Genetic Studies on Wild Populations of the *Vicia amoena* Complex (Tribe Vicieae: Fabaceae). *Biochemical Genetics.* 36 (5/6): 213-217

28. Mandak B. 1997. Seed heteromorphism and the life cycle of plants: a literature review. *Preslia-Prague*. 69: 129-159.
29. Mantel N. 1967. Adaptation of Karber's method for estimating the exponential parameter from quantal data, and its relationship to birth, death, and branching processes. *Biometrics*. 23: 739-746
30. Maxted N. 1993a. A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Viciaeae). *Bot. J. Linn. Soc.* 111: 155–182.
31. Mohsenin NN. 1970. Physical properties of plant and animal materials. Gordon and Breach Sci. Publishers, New York
32. Olajide JD, Ade-Omowaye BIO. 1999. Some physical properties of locust bean seed. *J. Agric. Eng. Res.* 74: 213-215
33. Perrino P, Yarwood M, Hanelt P, Polignano GB. 1984. Variation of seed characters in selected *Vicia* species. *Kulturpflanze*. 32: 103–122.
34. Potokina E, Tomooka N, Vaughan DA, Alexandrova T, Xu RQ. 1999. Phylogeny of *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Genet Res. Crop Evol.* 46: 149–161
35. Potokina E, Blattner R.F, Alexandrova T, Bachmann K. 2002. AFLP diversity in the common vetch (*Vicia sativa* L.) on the world scale. *Theor. Appl. Genet.* 105 : 58-67
36. Quézel P, Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales. Tome 1. Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris, pp. 524- 531
37. Scherer R, Kutzbach HD. 1978. Mechanische Eigenschaften von Koerner-fruechten [Mechanical properties of grains]. *Grundlage der Landtechnik*. 28(1): 6-12.
38. Seifi MR, Alimardani R. 2010. The moisture content effect of some physical and mechanical properties of corn. *Journal of Agric. Science, Canadian Centre of Science and Education*. 2(4):125-134
39. Stevens PF. 1991. Character states, morphological variation and phylogenetic analysis: a review. *Syst. Bot.* 16: 553-583
40. Subukola OP, Onwuka VI. 2011. Effects of moisture content on some physical properties of locust bean seed (*Parkiafillicoidea*). *Journal of Food Process Engineering*. 34: 1947-1961.
41. Suso MJ, Moreno MT. 1986. Isoenzymatic polymorphism of superoxide dismutase (SOD) in *Vicia faba* and its systematic implication. *FABIS Newslett.* 16: 3-11
42. Takashi R. 1997. Association of soybean genes I and T with low-temperature induced seed coat deterioration. *CropScience*. 37:1755-1759.
43. Taser OF, Altuntas E, Ozgog. 2005. Physical properties of Hungarian and common vetch seeds. *J. Applied Sci.* 5: 323-326

44. Wendel JF, Weeden NF. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In* S o l t i s D E. Soltis PS. *Isozymes in plant biology*, p. 5–44. Portland, Oregon: Dioscorides Press.
45. Westoby M, Jurado E, Leishman M. 1992. Comparative evolutionary ecology of seed size. *Trends in Ecology and Evolution*. 7: 368-372.
46. Wolff G. 1980. Investigations on the relations within the family Papilionaceae on the basis of electrophoretic banding patterns. *Theor. Appl. Genet.* 57: 225-232
47. Wu S, Sokhansanj S, Fang R, Opoku A. 1999. Influence of physical properties and operating conditions on particle segregation on gravity table. *Appl. Eng. Agric.* 15(5): 495-499.
48. Yamamoto K. 1979. Estimation of genetic homogeneity by isoenzymes from interspecific hybrids progenies between *Vicia amphicarpa*, true and *V. macrocarpa*. *Japan. J. Breed.* 29: 59-65
49. Yamamoto K. 1986. Interspecific hybridization among *Vicia narbonensis* and its related species. *Biol? Zentralbl. Leipziig.*
50. Yamamoto K, Plitmann U. 1980. Isozyme polymorphism in species of the genus *Vicia (Leguminosae)* *Japanese Journal of Genetics.* 55: 151–164
51. Zewdu AD. 2004. Untersuchungen zur Leistungssteigerung der Reinigungsanlage eines Maehdreschers durch zusätzlicher Querschwingungen (Investigations into performance improvement of combine cleaning shoe through additional lateral oscillations). [PhD Thesis]. Dresden, Germany: Technical University of Dresden. 125 p.

**Quatrième chapitre**  
**Diversité génétique associée**  
**à la morphologie de la plante**  
**et aux marqueurs moléculaires de type**  
**ISSR**

Quatrième chapitre : Diversité génétique associée à la morphologie de la plante  
et aux marqueurs moléculaires de type ISSR

## Prologue

Il est bien établi que les marqueurs moléculaires (marqueurs non morphologiques) offrent plusieurs avantages par rapport aux marqueurs morphologiques (marqueurs phénotypiques conventionnels), car ils fournissent des données qui peuvent être analysés objectivement. Les marqueurs ISSR se sont révélés très polymorphes pour étudier la diversité génétique entre les taxa du genre *Vicia*. Ils ont aussi facilité la distinction entre les accessions génétiquement très proches. Cette technique ne nécessite pas de connaissance particulière des séquences d'ADN du fait que les cibles des amorces sont très abondantes dans le génome. En effet, le nombre croissant des travaux réalisés à l'aide des marqueurs ISSR laisse penser qu'ils seraient un moyen adapté à l'étude de polymorphisme des accessions de vesce.

Le présent travail est réalisé dans ce cadre. Il a pour principaux objectifs d'évaluer l'utilisation possible des marqueurs ISSR dans l'estimation du polymorphisme d'ADN au sein des taxa de vesce sur les plans sectionnel et sub-générique en parallèle à une caractérisation morphologique des différentes parties de la plante. Dans ce contexte, une extraction de l'ADN génomique et une ISSR-PCR ont été réalisées. La lecture des gels a débouché sur une analyse en clusters.

Ce volet a fait l'objet d'une cinquième publication scientifique : The determination of sectional and sub-generic relationships among *Vicia* taxa from Algeria using plant morphology and ISSR markers, en révision dans « Annales Botanici Fennici »

# **The determination of sectional and sub-generic relationships among *Vicia taxa* (Fabaceae) from Algeria using plant morphology and ISSR markers**

Sakina BECHKRI, Asma MEDOURI, Mohammed CHEKARA-BOUZIANI,

Douadi KHELIFI\*

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Frères MENTOURI 25000 Constantine. Algérie  
s.bechkri@gmail.com; dkhelifi@yahoo.fr\* (\*corresponding author)

## **Abstract**

The paper discusses the genetic diversity and phylogenetic relationships within and between 46 germplasms of *Vicia* from Algeria. These relations are put in evidence by morphological and molecular markers. For this purpose, 78 plant morphological traits and 4 ISSR markers were used. Diversity of plant morphology has been exploited by UPGMA cluster analysis and principal coordinate analysis, when diversity of ISSR profiles was assessed by cluster analysis using two indices (Dice and Jaccard). Mantel test was used to discuss the correlations between the two. Cluster analysis based on plant morphology revealed two major groups. The results of principal coordinate analysis supported UPGMA clustering. Concerning molecular data, one hundred and thirteen bands were detected, among these bands, 100% were polymorphic. Dice and Jaccard indices showed more or less close patterns in the dendrograms. Mantel test gave a strong correlation between the two indices. Groups generated by plant morphology correspond to the traditional delimitation of the genus. Classification at sectional level also join traditional placement. These findings support suggestions that *V. sativa* is an assemblage of taxa presenting an overlap in morphological traits. For the other taxa, the separation is sufficient to warrant distinct sectional status for the taxa studied. The primers used could be considered suitable for further variability studies in *Vicia* genus. However, they have some disadvantages which make their usefulness questionable.

**Key words:** Algeria; genetic diversity; ISSR; morphology; *Vicia*

## **Introduction**

Vetches are herbaceous species known as food and forage legumes and belong to the genus *Vicia* and to one of the largest families of flowering plants (Leguminosae). It comprises a large and certainly not a definite number of species, presently estimated at more than 200 (ILDIS

2005). Taxonomic treatments of the genus have been based on the traditional morphotypological taxonomy, with subgenera and sections delimited variously by differently selected diagnostic characters (Jaaska 2005). Kupicha (1976) divided the genus into two subgenera, *Vicia* and *Vicilla* (Schur) Rouy, instead of three or four as used by earlier authors (Fedtschenko 1948; Ball 1968; Davis and Plitmann 1970; Radzhi, 1970). Several researchers have mostly studied the taxonomy of regional species, mainly on the sectional level, on the basis of morphology (Tzvelev 1980; Nikiforova 1985, 1988; Roti-Michelotti and Serrato-Valentini 1989; Endo and Ohashi 1996). A thorough overview of the taxonomic history of the genus is presented by Maxted (1993a). Linnaeus (1737) comments that he examined the flowers of hundreds of plants of *Vicia* species and could not find any characters that differed significantly enough to warrant generic separation. This position seems as justified today as it did two and a half centuries ago (Maxted 1993). In another side, molecular markers are not prone to environmental influence. Therefore, they are considered as very powerful tools for genotype characterization and genetic diversity estimation. Of the different molecular markers, inter-simple sequence repeat (ISSR) have been widely used to assess species genetic diversity and relationships because of their cost effectiveness, simple operation without requiring sequencing information (Williams et al. 1990), and requirement of very little starting DNA template (Zietkiewicz et al. 1994). ISSRs proved to be stable and reproducible (Bornet and Branchard 2001). By using ISSR markers, some molecular studies including genetic diversity in vetches were reported in recent years (Han et Wang 2010; Bozkurt et al. 2013; Liu et al. 2013; Rajkovic et al. 2015). There are about 26 *Vicia* species in the Algerian flora (Quézel and Santa 1962). However, there is no report on the application of ISSR markers in genetic diversity assessment of *Vicia* taxa from Algeria. To determine the further genetic affinities between *Vicia* species at the DNA level, the present work used ISSR markers to investigate their possible use in eleven *Vicia* taxa belonging to four classical sections of the genus. We also search to compare the use of Dice and Jaccard indices to estimate the genetic diversity of taxa. In parallel, 78 morphological plant characters were used to assess the diversity between samples at sectional and sub-generic levels. The aim of this study was also to check the concluded molecular findings how much would be compatible with flora of the country.

## **Materials and methods**

### **Plant material and taxa identification**

Forty-six populations of *Vicia* L. from various bioclimatic and ecological conditions are used in the current study (Table 1). Plants were collected from different stations of North Algeria as shown in Figure 1. In each sampling site, individual plants were randomly collected. Pods were

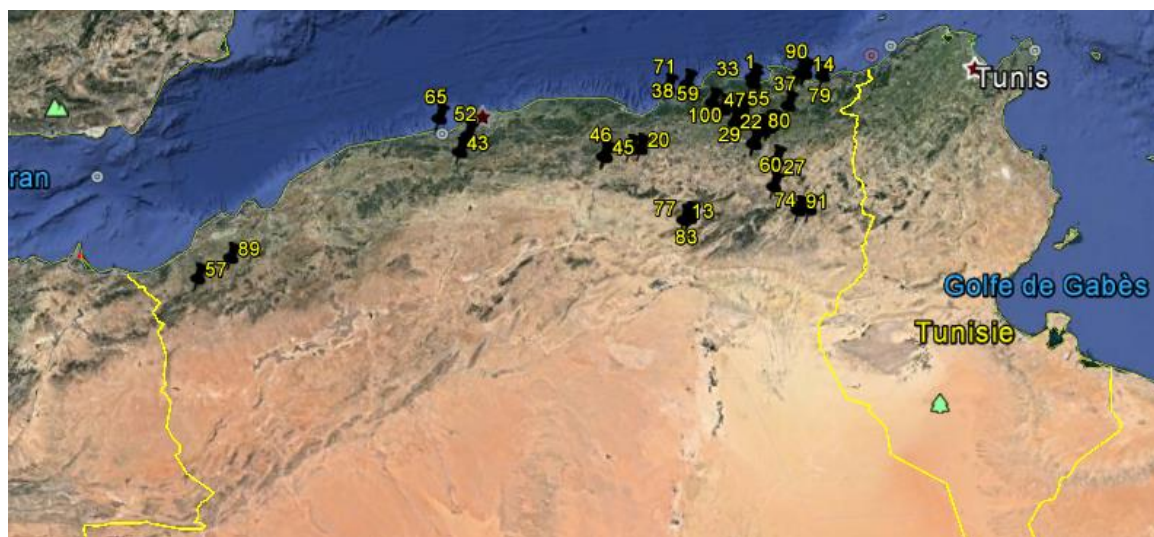


shelled and the dry seeds were poured in to separate paper bags at room temperature and the bags sealed tightly until their utilization. Taxonomic identification of accessions was verified by the morphology of plants grown from seeds, using the key provided by Quézel and Santa (1962). At sub-generic and sectional levels, we follow Kupicha (1976) and Maxted (1993) classifications. Vouchers are deposited in the laboratory of “génétique biochimie et biotechnologies végétales” at Constantine university.

**Table 1.** Passport information and taxonomic identification of accessions investigated

Taxa/section/subgenus	Code	Date of collection	Province /Locality/Origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<i>V. sativa</i> subsp. <i>consobrina</i> (Pomel) Maire. Section <i>Vicia</i> . Subgenus <i>Vicia</i>	14	1st.6.14	Annaba El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
	52	4.6.14	Blida National parc of Chréa	N36°24.538'	E002°45.519'	249
	59	30.5.14	Jijel	N36°35.082'	E006°16.728'	141
	65	9.6.14	Tipaza El Beldj Chenoua mountain	N36°37.667'	E002°21.150'	345
	86	13.6.14	Constantine Djbel El Ouehch	N36°23.690'	E006°39.011'	880
<i>V. sativa</i> subsp. <i>obovata</i> Gaudin. Section <i>Vicia</i> . Subgenus <i>Vicia</i>	6	22.5.14	Constantine Chaab ersas	N36°20.628'	E006°37.485'	563
	7	30.5.14	Mila Boudjriou	N36°29.743'	E006°25.527'	325
	10	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°28.409'	E006°38.239'	468
	20	3.6.14	Sétif Ain amat	N36°07.394'	E005°12.172'	866
	22	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
	32	22.5.14	Constantine Chaab Ersas	N36°20.634'	E006°37.486'	562
	57	6.6.14	Tlemcen Ain fezza	N34°52.732'	W001°13.726'	867
	70	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757
	80	28.5.14	Constantine Ain abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
<i>V. sativa</i> subsp. <i>angustifolia</i> (L.) Gaudin. Section <i>Vicia</i> . Subgenus <i>Vicia</i>	19	26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683
		18.5.14	Constantine Chaab Ersas	N36°20.634'	E006°37.486'	562
<i>V. sativa</i> subsp. <i>cordata</i> (Will) Batt. Section <i>Vicia</i> . Subgenus <i>Vicia</i>	13	26.5.14	Biskra El Kantra Ain Skhoun	N35°16.087'	E005°44.174'	584
	33	29.5.14	Skikda El hadaik	N36°49.894'	E006°53.079'	26
	35	1st.6.14	Annaba El bouni	N36°49.777'	E007°38.290'	28
	37	28.5.14	Guelma	N36°28.361'	E007°21.280'	223
	38	10.5.14	Jijel	N36°49.348'	E005°56.706'	14
	42	28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	47	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
	71	30.5.14	Jijel	N36°47.625'	E005°39.746'	17
<i>V. lutea</i> subsp. <i>vestita</i> (Boiss.) Rouy. Section <i>Hypechusa</i> . Subgenus <i>Vicia</i>	1	28.5.14	Skikda Ramdane Djamel	N36°45.977'	E006°53.432'	42
<i>V. lutea</i> subsp. <i>eu-lutea</i> Maire. Section <i>Hypechusa</i> . Subgenus <i>Vicia</i>	79	1st.6.14	El Tarf Ben M'hidi	N36°46.402'	E007°53.600'	11
	90	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24
	18	3.6.14	Bordj Bou Areridj Ain taghrouit	N36°07.741'	E005°03.364'	934
	26	28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757
	27	2.6.14	Oum El Bouaghi	N35°51.459'	E007°06.377'	887
	29	2.6.14	Oum El Bouaghi Sigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
	40	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711
	43	4.6.14	Médéa Harbil Oued	N36°13.633'	E002°37.643'	464

<i>V. monantha</i> subsp. <i>calcarata</i> (Desf.) Maire. Section Cracca. Subgenus Vicilla	45	3.6.14	Bordj Bou Areridj	N36°04.070'	E004°41.899'	923
	49	28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847
	60	2.6.14	Khenchla	N35°33.685'	E007°02.177'	860
	74	14.6.14	Tébessa	N35°15.936'	E007°30.306'	1078
	77	26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683
	102		Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
<i>V. monantha</i> subsp. <i>cinerea</i> (M.B.) Maire. Section Cracca. Subgenus Vicilla	46	3.6.14	Bordj Bou Areridj El Achir	N36°04.017'	E004°40.525'	944
	91	14.6.14	Khenchla	N35°15.704'	E007°20.957'	1222
<i>V. narbonensis</i> L. section Narbonensis. Subgenus Vicia	41	28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711
	55			N36°30.023'	E006°40.051'	443
	81	22.5.14	Constantine Didouche Mourad University	N36°20.387'	E006°37.177'	604
<i>V. tenuifolia</i> Roth. Section Cracca. Subgenus Vicilla	89	6.6.14	Sidi Bel Abbas Sidi Khaled	N35°06.59'	W000°44.238'	543
<i>V. leucantha</i> Biv. Section Cracca. Subgenus Vicilla	100	10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586



**Figure 1.** Geographical origin of the 46 Algerian populations studied

### Germination and growing

Dry seeds from each packet were scarified then imbibed overnight in distilled water. They were germinated in the dark at 28°C on Wattman paper in Petri dishes until the appearance of the radicle. Three germinated seeds from each accession were planted in a moist mixture of garden soil, sand and compost in 5 L capacity plastic pots and plants were grown under unheated greenhouse of the laboratory of “génétique biochimie et biotechnologies végétales”, at Constantine University.

### **Morphological analyses**

The variation of 78 morphological characters with two to five states was analyzed in 40 *Vicia* L. taxa as described by Bechkri and Khelifi (2017). The observations on growth form were taken on three individual plants per population. In total, 120 individuals were examined. These accessions were already examined using these morphological characters in previous works (Bechkri and Khelifi 2017, a second paper in review). Thus, in the present manuscript, we combine plant morphology and ISSR markers of the same samples with the aim to compare them.

### **DNA extraction**

Genomic DNA was isolated from approximately 0.3 g of fresh leaflets from every accession. Total DNA was extracted using CTAB method (Doyle and Doyle 1987). DNA concentration was determined spectrophotometrically by a nanodrop 2000-c (Thermoscientific) when DNA quality was estimated by visualization on 0.8% agarose gels in 1xTBE buffer.

### **Polymerase Chain Reaction and electrophoresis**

Four ISSR markers (Table 2) that proved to give clear polymorphic bands in literature (Han and Wang 2010, Liu et al. 2013, Rajkovic et al. 2015) were used in the present investigation. ISSR amplification was undertaken according to Han and Wang (2010) with some modifications: ISSR PCRs were carried out in a 10 µl reaction volume containing 10 ng DNA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM primers (AG)<sub>8</sub>T and (AC)<sub>8</sub>T or 2 µM primers (GACA)<sub>4</sub> and (GA)<sub>8</sub>T, 0,2 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase and 1x PCR reaction buffer (Mg<sup>++</sup> free). All amplifications were performed using a Techne-prime PCR thermocycler programmed for 1 cycle of 3 min at 94°C, followed by 35 cycles of 92°C for 30 s, 50°C or 55.2°C (primer 3) for 30 s, and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min. The PCR products of ISSR markers were resolved by electrophoresis on 1.8% agarose gels with a Tris-Boric acid EDTA buffer system. Fragment size was estimated by using a 100 bp molecular size DNA ladder. BET was used to make bands visible under UV light.

### **Data analyses**

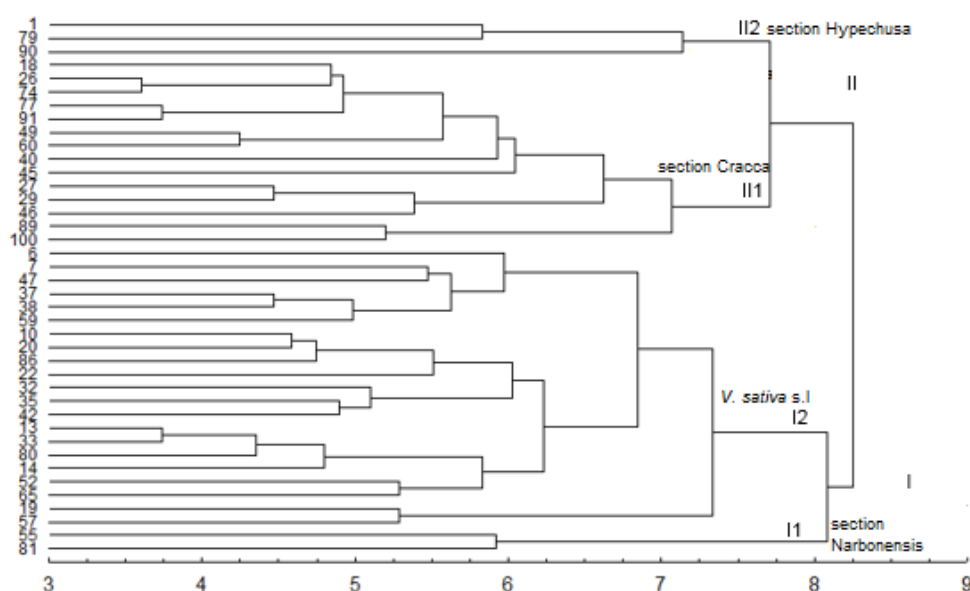
Cluster analysis of morphological characters was performed with Euclidean Distances Matrix based on the Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA). In the other side, Principal Component Analysis (PCA) was undertaken to distinguish the samples by the sum of the squared cosinus  $\geq 0.00$ . These analyses were carried out with data analysis software (STATISTICA version 6.1 program). Concerning molecular data, gels were scanned by Bio-Rad Gel-Doc and bands were scored using image-lab 5.0 software. The presence or absence of bands was scored as 1 or 0 and a data matrix was created for the four ISSR primers.

NTSYS software (NTSYSpc version 2.21q) was used to elaborate distances matrices using Dice and Jaccard indices, which, in turn, have been used in dendrograms construction using UPGMA. The same software was used to display correlation between Dice and Jaccard distance matrices by Mantel test (Mantel 1967) where 10000 random permutations were performed. Finally, the rate of polymorphism was calculated using the following formula:  $p=1-(3/N)$  where N= number of accessions. A band is considered polymorphic when its frequency is lower than the p value.

## Results

### Cluster analysis based on morphological traits

The relationships between these taxa, based on the variation in morphological characters are shown by the dendrogram illustrated in Figure 2. The cluster analysis of the tested accessions shows two main groups at a distance of 8.24. The first cluster comprises two sub-clusters. I1 (d=5.91) is formed by samples 55 and 81, while I2 (d=7.33) contains 21 samples (Figure 2).



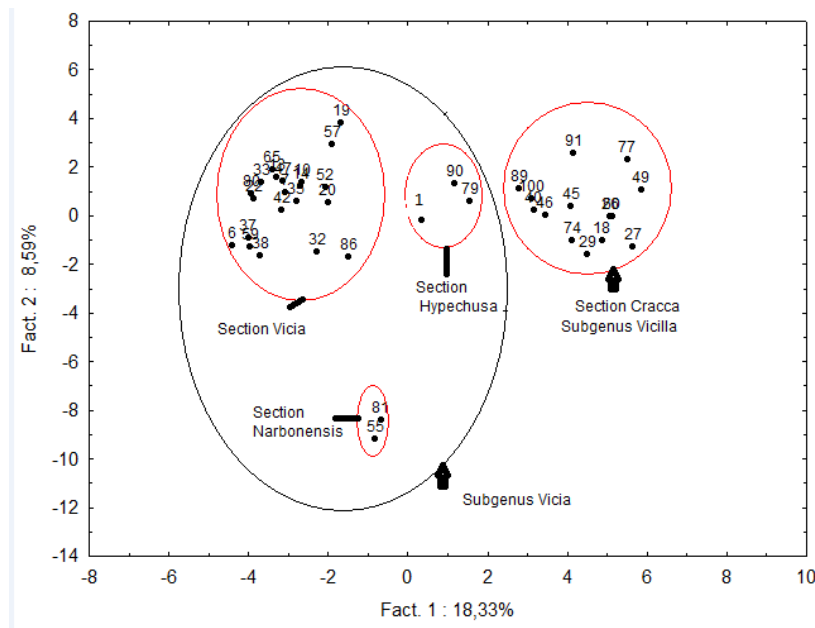
**Figure 2.** Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of *Vicia* accessions

The cluster II is further divided into two groups. II1 contains accessions 100 and 89 (d=5.19) which joined 12 other accessions (Figure 2). II2 (d=7.14) is composed of 3 populations. The variability between species is examined by the similarity matrix of all pairs of studied populations. The low distance value indicates high level of homology in the variation pattern of the morphological characters. The higher distance (d=10) is observed between samples 20 and 90 which differ by 37 morphological traits. The same distance is also observed between 55

and 57 which differ by 38 characters. A distance of 9.49 is obtained between 81 and 91 and between 6-45, 29-33.

### Principal Component Analysis

Nine characters (LAC, LAD, LMH, TB, SP, WL, KL, LSC, LBSH) were excluded from PCA as they are 100% identical between all accessions. The 69 remaining characters were used for the analysis. Two-dimensional plot from a PCA among the samples of vetches using plant morphology was obtained (Figure 3).

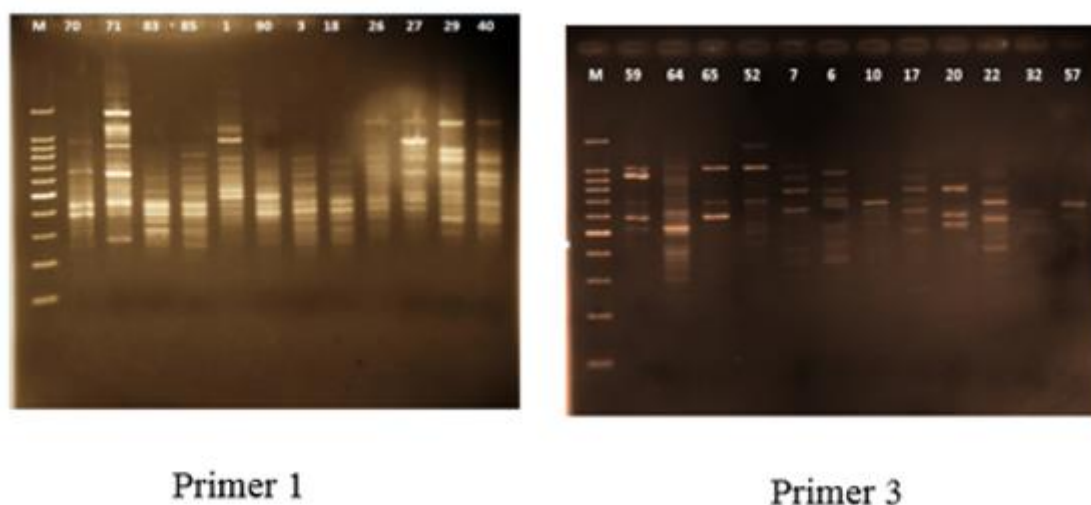


**Figure 3.** Principal Component Analysis of studied populations based on plant morphology

### ISSR-PCR results

DNA profiles of some accessions generated by primers 1 and 3 are presented in Figure 4. A total of 113 bands were scored using the 4 primers screened across 46 *Vicia* L. samples (Table 2), ranging from 1 to 11 (primer 3) per profile. Primer 1 did not amplify 15 samples. Primer 2 did not amplify 6 accessions. 11 samples were not amplified by primer 3, when primer 4 did not amplify 3 samples. Considering the four primers together, the sample which generated the most bands is the accession 18 with 19 bands. The accession 86 was not amplified by any primer (0 bands). Thus, it was removed from the matrix. Samples 6 and 33 have generated 3 bands. The most common band is 976,24 bp generated by the primer 3, obtained in 26 samples. 30 bands are unique and are observed in specific populations. The band 412,59 bp is the most common one generated by the primer 1 and is observed in 11 samples. 5 bands are unique. The band 652,2 bp (primer 2) is observed in 17 samples. 13 bands are unique concerning the primer 2. Seven unique bands were obtained by the primer 3. The primer 4 have generated 6 unique

bands. The band 594,58 is observed in 21 samples. The p value is equal to 0.93 and all the bands have a frequency lower than this value. Thus, the four primers showed 100% polymorphism.



**Figure 4.** Electrophoresis patterns of ISSR products amplified with primers 1 and 3

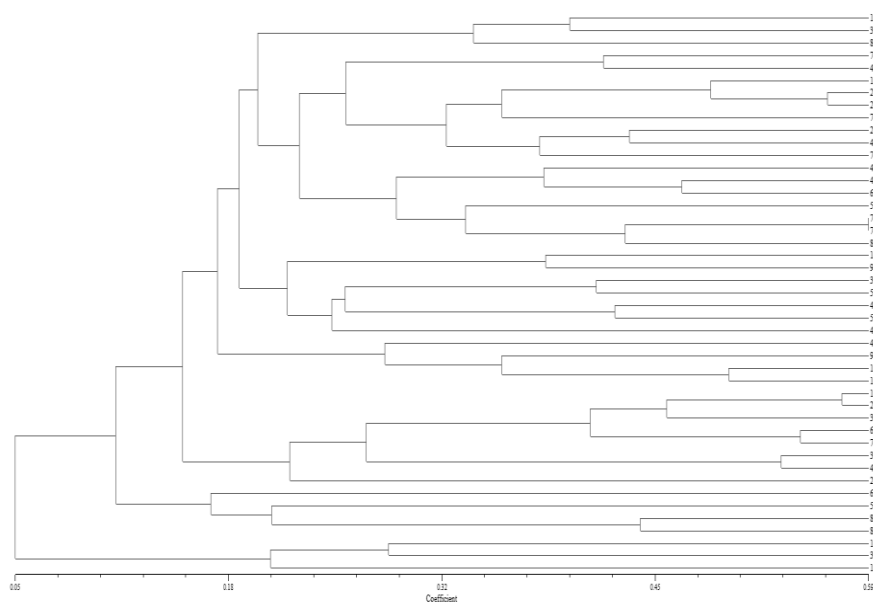
**Table 2. Passport data of ISSR primers used for testing DNA polymorphism within *Vicia* taxa**

Primer	Primer sequence	Annealing temperature °C	Total bands	Polymorphic bands	Polymorphism %	Fragments size (bp)
(GACA) <sub>4</sub>	GACA GACA GACA GACA	50	18	18	100	205.96 – 956.6
(AG) <sub>8</sub> T	AG AG AG AG AG AG AG AG T	50	31	31	100	222.6 – 1162.1
(AC) <sub>8</sub> T	AC AC AC AC AC AC AC AC T	55	39	39	100	406.1 - 1987.9
(GA) <sub>8</sub> T	GA GA GA GA GA GA GA GA T	50	25	25	100	145.65 - 1723

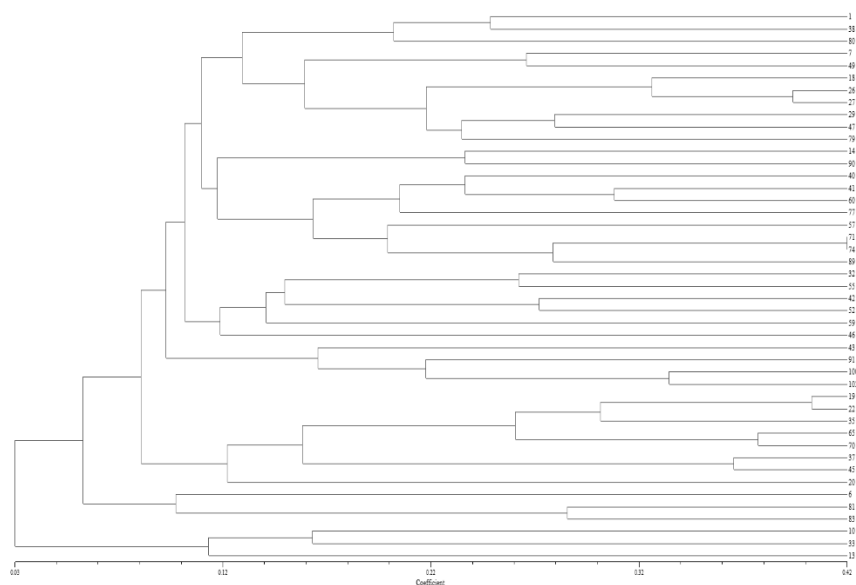
### Cluster analysis based on ISSR markers

Results of UPGMA based on ISSR markers using Dice index one side and Jaccard index another side are illustrated on Figure 5. Mantel test gave a correlation coefficient (r) equal to 0.99558 between distance matrices of the two indices. The dendrogram generated by Dice index (Figure 5a) showed that all the 45 germplasms were separated into 2 distinct major clusters. The first one (I) is composed of sample 13 joined to samples 10 and 33. The second cluster (II) which is the most important in term of accessions number, can be divided into several sub clusters : a) samples 83 and 81 joined sample 59 which are all clustered with sample 6, b) sample 20 join samples 37 and 45, which clustered with 70, 65, 35, the all clustered with samples 19 and 22, c) 102-100 join sample 91 which clustered with sample 43, d) sample 46 is clustered with 52-42, 55-32 and 90-14, e) sample 89 join 74-71 and 57, the all join 60-41 and 40, f) 79 clustered with 47-29 which join 77. The latter is regrouped with 27-26 and 18. The all join 49-7, g) sample 80 join samples 38-1. The distance matrix (Figure 6a) showed that big similarities (0.59) are observed between accessions 71 and 74, between samples 19 and 22

(0.57) and also between samples 26 and 27 (0.56), 65 and 70 (0.55). The high dissimilarity (0.00) is observed between several accessions as it is also shown in figure 6a. The dendrogram generated by Jaccard index (Figure 5b) gave more or less similar picture of the dendrogram generated by Dice index, except for some populations in some groups. The same observations are obtained concerning the highest and lowest distances (Figure 6b). Differences concern the following samples: a) absence of sample 6, d) absence of samples 90 and 14, e) absence of 60, 41 and 40, a new sub-cluster is appeared and regrouped samples 77, 60-41, 40, 90-14, f) absence of sample 77.

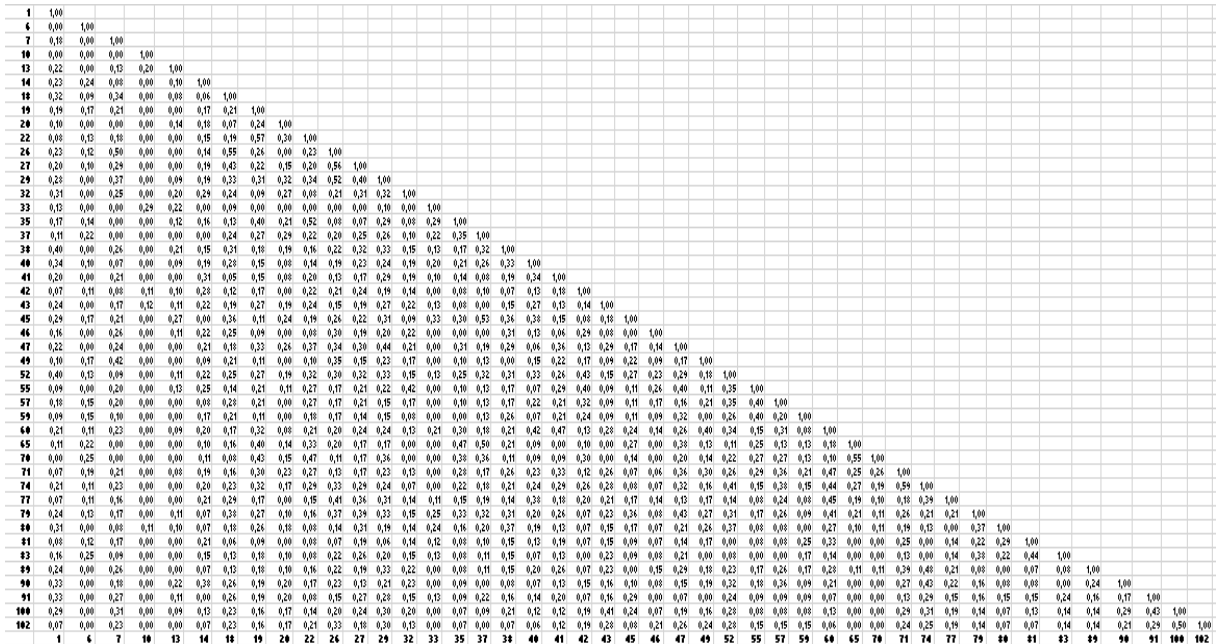


(a)

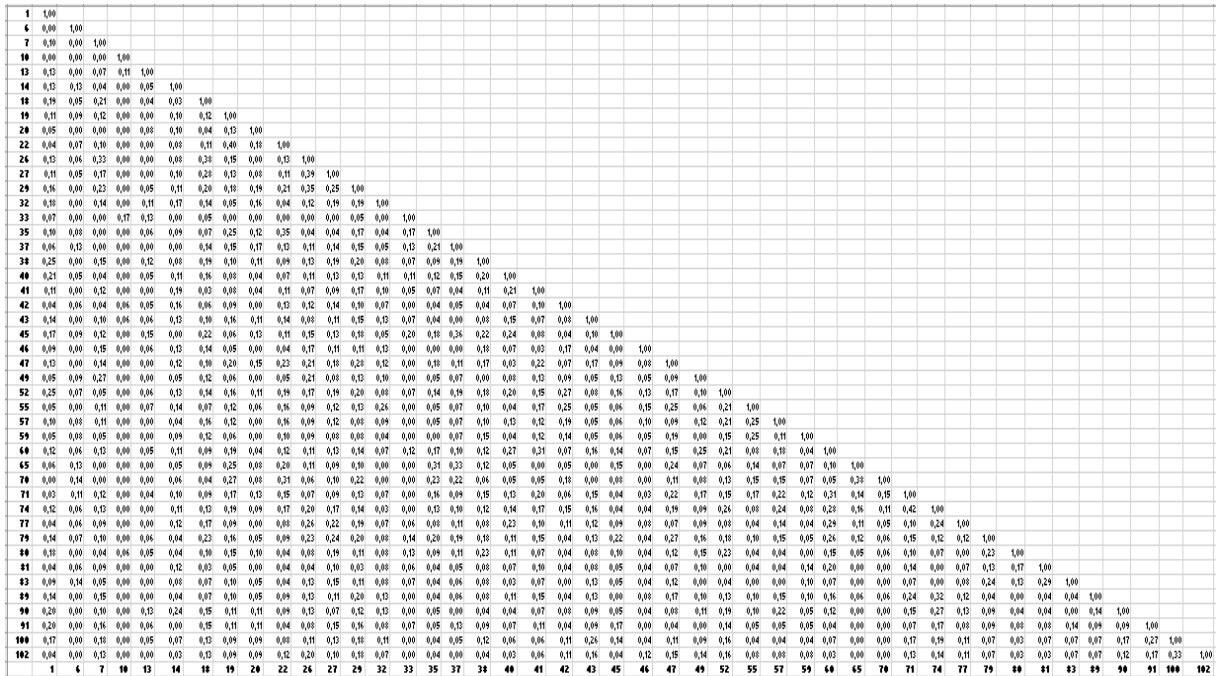


(b)

**Figure 5.** Dendrograms generated using UPGMA cluster analysis based on ISSR polymorphism of 45 *Vicia* accessions a) Dice index b) Jaccard index



(a)



(b)

Figure 6. Distance matrices

a) Dice index

b) Jaccard index



## Discussion

### Morphological data

Intraspecific variation within the 4 taxa belonging to the *V. sativa* group one side and within the seven other taxa another side, was previously discussed and will not be resumed again. Thereby, we only focus on the relationship on sectional and sub-generic levels.

Two major clusters are obtained. Within the cluster I (sub-genus *Vicia*), two sub-clusters are evident in the phylogram: the cluster I1 is constituted by two samples of *V. narbonensis* (sect. *Narbonensis*), while the cluster I2 comprises all taxa of *V. sativa* s.l. Within the cluster II, there are also two major groups. II1 contains all samples of section *Cracca* (subgenus *Vicilla*): *V. leucantha* and *V. tenuifolia* clustered together with all samples of *V. monantha*. The section *Cracca* is monophyletic based on the present results. II2 comprises the three samples of *V. lutea* (section *Hypechusa*). Thus, phylogenies derived from morphological traits strongly support the view that section *Hypechusa* represented by *V. lutea* is distant from the NSC represented by *V. narbonensis* (section *Narbonensis*). Section *Hypechusa* is more closely aligned with section *Cracca* while section *Narbonensis* is more closely aligned with section *Vicia* represented by samples of *V. sativa* s.l. The UPGMA, therefore, shows two distinct clusters corresponding to the two traditional subgenera (*Vicia* and *Vicilla*) established by several authors. However, samples of *V. lutea* belonging to section *Hypechusa*, sub-genus *Vicia* are linked to taxa of section *Cracca* (sub-genus *Vicilla*); whereas, in the absence of samples of *V. sativa*, they clustered with *V. narbonensis* accessions (paper in review). These results are supported by the utilization of the PCA (accessions projection) which regroups samples of *V. lutea* with those of section *Cracca*. The placement of *V. narbonensis* samples with those of *V. sativa* is justified as the two taxa belong to the sub-genus *Vicia*. In our previous work on the same taxa, without *V. sativa* (paper in review), *V. lutea* is placed near *V. narbonensis* and not with samples belonging to sect. *Cracca*. However, by adding samples of *V. sativa*, *V. narbonensis* approximates and away from *V. lutea*. Our previous works using morphological and biochemical markers showed a closer relationship between the NSC and section *Hypechusa*. These findings are supported by several other authors like Jaaska (1997) and Shiran *et al.* (2014). *V. lutea* has several morphological characters which suggests a distant link to *V. narbonensis* and so this species is placed on the *Vicia* side of *V. sativa* (section *Vicia*). Results of the present work join those of Potokina *et al.* (1999) who showed a closer relationship between the NSC and section *Vicia* than between the NSC and section *Hypechusa*. The results of the analysis consistently indicate a more natural affinity of *V. lutea* with section *Cracca*. In another side, *V. monantha*, *V. tenuifolia* and *V. leucantha* form a closely related group. The analysis suggests the forms are

closely allied, but the existence of sets of correlated characters that elsewhere in the classification distinguish species suggests that the three section *Cracca* taxa should retain their specific status.

### **Molecular data**

ISSR analyses have been focal point to explore genetic diversity in many plant taxa since last decade. Because of their good discrimination efficiency and high reproducibility, they are particularly suitable to identify the closely related species and varieties (Bozkurt 2013). In the present work, the average polymorphism of ISSR primers was very high (100%), confirming results that this type of markers could be useful in species differentiation and diversity studies in *Vicia* sp. as reported by Rajkovic et al. (2015). Despite the high levels of genetic diversity in taxa studied, the diversity changed a lot at the level of populations of the same taxon. The results indicate that the genetic diversity of *Vicia* taxa was distributed mainly within the populations, which could indicate a high level of gene flow among populations as reported by Han and Wang (2010).

The dendrogram generated by Dice index showed that the first major cluster contains three samples belonging to the same species: *V. sativa* (sect. *Vicia*, subgenus *Vicia*). The second major cluster shows several pictures. Some sub-clusters agree with subgeneric and sectional classifications of the genus because species belonging to subgenus *Vicia*, sect. *Vicia*, (*V. sativa*), sect. *Narbonensis* (*V. narbonensis*) and sect. *Hypechusa* (*V. lutea*) cluster together, except for two sub-clusters where there is no clear discrimination between the two sub-genera and sections. Species belonging to sect. *Cracca*, sub-genus *Vicilla*, also clustered together as in the case of *V. leucantha*, *V. tenuifolia* and some samples of *V. monantha*. The dendrogram generated by Jaccard index showed a general similar picture, but the cited index gives more groups inside sub-clusters and is more discriminatory. Except for the instable sub-clusters, sect. *Narbonensis* represented by *V. narbonensis* and sect. *Hypechusa* represented by *V. lutea*, formed a rather cohesive group with sect. *Vicia*, represented by *V. sativa*., whereas the populations of section *Cracca* were more remote from them. It is important to mention that samples presenting lower distances belong to the same species and thus to the same sections and sub-genera. Pattern formation of several clusters might be due to the special climatic conditions. Several studies which have assessed the genetic diversity of plants using molecular markers have established the correlation between geographical distance and genetic similarity between individuals (Islam 2004). The high ecogeographic diversity of the present collection has already be elucidated in our previous works. Species with a wide geographic area generally have more genetic diversity (Hamrick and Godt 1989). The taxa studied are widely distributed

in Algeria (Table 1), which may be one of the reasons for the unexpectedly high level of genetic diversity. Samples 1 and 38 are a good example in this case as they are collected from stations characterized by the same bioclimate (Less Humid with warm and mild winters, respectively). Another example concerns samples 100 and 102 belonging to stations characterized by Higher semi-arid bioclimate and cool winter. Accessions 14 and 90 belong to different sections (*Vicia* and *Hypechusa* respectively) but have the same bioclimate (sub-humid with mild winter). Thus, cluster analysis showed that groupings of the germplasms can be correlated with their comprehensive environmental conditions and geographic origin. The same findings were reported by Liu et al. (2013). Despite the high diversity observed in the molecular data, several accessions were not amplified by each of the four primers after several repetitions. Moreover, the use of the four primers did not produce stable groupings related to taxonomy, which can indicate that their usefulness in further variability studies is questionable.

### Conclusion

The separation obtained by the morphological traits is sufficient to warrant distinct sectional status for the taxa studied. The polymorphism of ISSR primers was very high. However, the number of bands obtained and their inability to amplify several samples make their use questionable. We join several author's opinion that in variability studies of *Vicia* taxa, some other approach should be considered, but, before drawing conclusions too quickly, it is preferable to test more ISSR primers on the studied taxa.

### References

- Ball PW. 1968. *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (eds.) *Flora Europaea*, vol.2, *Rosaceae* to *Umbelliferae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 129–136.
- Bechkri S, Khelifi D (2017) Variation in *Vicia sativa* s.l. from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64: 815-832
- Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter* 19(3): 209-215
- Bozkurt M, Ertugrul K, Uysal T. 2013. The determination of genetic relationships among some *Vicia* L. (Vetch) taxa by using ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation* 6/3: 135-139
- Davis PH, Plitmann U. 1970. *Vicia* L. In: Davis PH. (ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, pp. 274-321
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15
- Endo Y, Ohashi H. 1996. The infrageneric position of East Asian species of *Vicia* (Leguminosae). *Journal of Japanese Botany* 71: 254–262
- Fedchenko BA (1948) *Vicia* L. In: Shishkin BK, Bobrov EG. (eds.) *Flora of the USSR* 13. Moscow, pp. 406-475.

- Han Y, Wang HW. 2010. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships of Two Closely Related Northeast China *Vicia* Species Revealed with RAPD and ISSR Markers. *Biochem. Genet.* 48: 385–401
- ILDIS. 2005. *ILDIS World Database of Legumes*. International Legume Database & Information Service (ILDIS), <http://www.ildis.org>.
- Islam A. 2004. Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and Biotechnological Approaches for in vitro regeneration and long-term conservation of *C. longa* Germplasm. PhD thesis. University of Hannover
- Jaaska V. 1997. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae). *Genet. Res. Crop Evol.* 44: 557–574
- Jaaska V. 2005. Isozyme Variation and Phylogenetic Relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (Fabaceae). *Annals of Botany* 96: 1085–1096
- Kupicha FK. 1976. The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Roy Bot Gard Edinb* 34:287–326
- Linnaeus C. 1753. *Species Plantarum*, Vol 2. Salvius, Stockholm
- Liu Y, Zhang JM, Wang XG, Liu F, Shen ZB. 2013. Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 51: 86–93
- Mantel N. 1967. Adaptation of Karber's method for estimating the exponential parameter from quantal data, and its relationship to birth, death, and branching processes. *Biometrics*, 23: 739-746
- Maxted N. 1993a. A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Viciae). *Bot. J. Linn. Soc.* 111: 155–182.
- Nikiforova OD. 1985. The system of the genus *Vicia* (Fabaceae) in Siberia. *Botanicheskii Zhurnal (Leningrad)* 70(5): 604-611
- Nikiforova OD. 1988. Wild vetches of Siberia. Nauka, Novosibirsk (in Russian)
- Potokina E, Tomooka N, Vaughan DA, Alexandrova T, Xu RQ. 1999. Phylogeny of *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Genet Res. Crop Evol.*, 46: 149–161
- Quézel P, Santa S. 1962. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tomes 1 et 2. Paris : CNRS.
- Radzhi AD. 1970. Conspectus systematis specierum Caucasicarum Generis *Vicia* L. Pp. 228–240 in: Tzvelev, N. N. (ed.), *Novit. Syst. Plant. Vascul.*, vol. 7. Nauka, Leningrad. [In Russian.]
- Rajković D, Ksenija Taški-Ajduković K, Nagl N, Isakov M, Milić D, Karagić D, Mikić A. 2015. Potential Use of SSR and ISSR Markers in Estimation of DNA polymorphism within genus *Vicia*. *Ratar. Povrt.* 52(2): 1-7
- Roti-Michelotti G, Serrato-Valentini G. 1989. Seed characteristics in Italian species of genus *Vicia* section *Ervum* and their diagnostic value. *Seed Science Technology* 14: 391-402.
- Shiran B, Kiani S, Sehgal D, Hafizi A, Hassan T, Chaudhary M, Raina SN. 2014. Internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA resolving complex taxonomic history in the genus *Vicia* L. *Genet Resour Crop Evol.*, 61:909–925
- Tzvelev N. 1980. Systema specierum generis *Vicia* L. in parte Europaea URSS. *Novitates Systematicae Plantarum Vascularium* 17: 200–208 (in Russian).
- Williams JGK, Kubelik AR, Liva KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics* 20: 176-183.

**Cinquième chapitre**  
**Synthèse, conclusions et perspectives**

---

**Synthèse des travaux réalisés**

---

**I- Diversité génétique associée aux paramètres écogéographiques et aux caractères morphologiques de la plante**

**I-1- *Vicia sativa* s.l**

- La discrimination des taxa du complexe *sativa* via les descripteurs morphologiques et écogéographiques est difficile à cause de l'existence d'une variation continue. Des populations qui paraissent appartenir à la même sous-espèce sur la base de quelques traits, possèdent, en effet, beaucoup de caractères communs démontrant une morphologie intermédiaire entre les taxa. La comparaison de nos résultats avec ceux des autres auteurs demeure difficile car chacun possède ses propres définition et délimitation des taxa
- Les résultats indiqueraient que *V. sativa* pourrait être un assemblage de sous-espèces possédant une hétérogénéité considérable. Nous pouvons suggérer que le groupe *sativa* contient des taxa très proches qui continuent de subir un processus de spéciation rapide.
- L'ACP a identifié les caractères qui contribuent le plus à la discrimination des accessions. Les plus importants peuvent être aussi bien quantitatifs que qualitatifs. Les caractères qui contribuent le moins à la discrimination des accessions sont pour la plupart qualitatifs. Beaucoup d'auteurs soulignent l'importance des caractères quantitatifs à ce niveau taxonomique. Cette analyse a également démontré que les caractères morphologiques qui contribuent fortement à la discrimination des accessions concernent les folioles, les vrilles, la fleur, la gousse et les stipules, démontrant l'importance de chaque partie de la plante dans la distinction des accessions.
- Les métriques utilisées sur les feuilles ont été mesurées au premier nœud. Les mesures sur les folioles ont également été entreprises sur la partie inférieure des tiges, mettant en évidence l'hétérophyllie, un indicateur de la différence dans la forme des feuilles dans les parties inférieures et supérieures de la plante.
- Les sites de collecte appartiennent à 7 bioclimats différents, avec des hivers frais, doux, chauds ou tempérés. Ils sont caractérisés par un climat favorable fournissant de bonnes conditions pour la croissance et le développement des plantes
- Les paramètres écogéographiques recueillis et calculés ont permis d'établir des cartes de distributions des taxa. Ces données de passeport peuvent être utilisées dans la planification des futures missions de collecte.

### Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives

- La classification hiérarchique obtenue avec les données écogéographiques n'indique aucune discrimination claire des accessions. L'association entre la diversité génétique et l'écogéographie est ainsi moins significative. En effet, les taxa du complexe *sativa* sont connus pour être sympatriques dans une large mesure et les types ne sont pas écologiquement isolés ; un champ peut être colonisé par quatre à cinq taxa différents.

#### I-2- Les sept autres taxa

- Les 78 traits morphologiques utilisés ont produit des groupes stables, rejoignant le concept de Quézel et Santa. L'analyse en clusters a révélé deux groupes monophylétiques, différant seulement par la position relative de certaines accessions dans les sub-clusters : le premier comprend les échantillons de *V. narbonensis* et *V. lutea*, le second regroupe les accessions de la section *Cracca* (*V. monantha*, *V. tenuifolia* et *V. leucantha*).
- La section *Cracca* est la section la plus hétérogène : un chevauchement des traits morphologiques entre les taxa de cette section est ainsi mis en évidence. La séparation de ces deux groupes n'est pas assez distincte comme c'est le cas des sections *Hypechusa* et *Narbonensis*.
- L'ACP a montré que parmi les caractères qui contribuent le plus à la discrimination des accessions, trois sont quantitatifs, mais la majorité sont qualitatifs. Ceux qui contribuent le moins à la séparation sont aussi bien qualitatifs que quantitatifs. Les données quantitatives sont totalement appropriées dans les études systématiques, particulièrement phylogénétiques. D'un autre côté, il existe quelques caractères qualitatifs comme la couleur de la graine ou la couleur du hile qui ne sont pas usuellement utilisés en taxonomie, mais qui sont importants dans l'identification des cultivars. La variabilité de ces caractères héréditaires dans des populations de différentes régions géographiques peut également être utile pour les conservateurs et les collectionneurs. Parmi les caractères qui contribuent le plus à la discrimination des accessions, six concernent les traits des folioles.
- Tout comme dans le cas de *V. sativa*, les paramètres écogéographiques et les données de passeport des stations des 7 taxa ont élucidé la localisation de chaque accession. Le dendrogramme obtenu avec les paramètres écogéographiques n'indique pas de discrimination claire des accessions selon leur origine géographique. Les origines géographiques diverses peuvent expliquer le degré élevé de variabilité parmi les taxa et devraient être prises en considération dans les programmes de conservation et dans l'amélioration génétique de ces taxa.

## **II-Diversité génétique associée aux protéines de réserve du grain et aux paramètres écogéographiques**

L'investigation du polymorphisme des accessions de vesce par les marqueurs protéiques représentés par trois fractions des protéines de réserve de la graine font ressortir que :

- Les électrophorogrammes peuvent être utilisés comme données de passeport pour l'identité génétique des accessions étudiées. Les résultats soutiennent la validité de l'électrophorèse des protéines du grain comme outil puissant dans l'identification des taxa, la clarification des questions de taxonomie et d'évolution et l'étude de la diversité génétique.
- Chaque accession présente son propre électrophorogramme. Une hétérogénéité intraspécifique a été mise en évidence. Cette dernière serait probablement due à la nature de fertilisation croisée du genre
- Dans les albumines, quelques bandes sont spécifiques à certains taxa et peuvent être utilisées comme marqueur de discrimination interspécifique. D'autres permettent une distinction au niveau intraspécifique. Ceci rejoint les conclusions des auteurs qui recommandent l'utilisation de cette fraction dans la mise en évidence d'une variation génétique même mineure entre les échantillons. Les albumines présentent le nombre de bandes le plus élevé parmi les autres fractions, ce qui souligne leur rôle crucial dans la diversité génétique et dans la discrimination des accessions de vesce.
- Les globulines, qui représentent la fraction majeure des protéines de réserve chez les légumineuses, peuvent présenter des profils électrophorétiques discriminatoires entre les accessions sur les plans intra et interspécifiques. Tout comme les albumines, les globulines peuvent présenter des bandes uniques spécifiques à des taxa particuliers
- Les études concernant l'utilisation des profils de prolamines dans la discrimination des accessions du genre *Vicia* sont rares. Nos résultats montrent l'utilité de cette fraction dans la séparation des accessions sur les plans inter et intraspécifiques spécialement pour les populations de *V. sativa*.
- Concernant *V. sativa*, les profils sont compatibles avec ceux obtenus par la caractérisation morphologique des mêmes accessions et indiqueraient une éventuelle instabilité phylogénétique des taxa appartenant à ce groupe.
- Nos données révèlent que le sous-genre *Vicia* est bien discriminé et concordent avec les résultats traditionnels basés sur la morphologie ainsi que les résultats des analyses phylogénétiques.



**Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives**

- En dépit des profils électrophorétiques clairs et reproductibles, l'absence d'une nomenclature allélique pouvant être utilisée dans une lecture génétique, rend l'utilisation de ce marqueur biochimique moins crédible
- Aucune subdivision claire quant à l'origine géographique des accessions n'est observée, rejoignant les observations obtenues par la corrélation entre la morphologie et l'écogéographie.

**III- Diversité génétique associée aux systèmes enzymatiques de la plante et aux propriétés physiques du grain**

Les marqueurs enzymatiques représentés par trois systèmes d'isozymes, en l'occurrence, la SOD, l'ADH et l'AAT montrent que :

- L'âge des folioles utilisées dans l'extraction des enzymes n'a pas d'influence sur la mobilité électrophorétique. Quelques changements dans l'intensité relative des bandes semblent, toutefois, liés à l'âge des folioles
- Une forte corrélation est obtenue entre les zymogrammes des trois systèmes pris ensemble ou pris deux à deux. L'utilisation de l'un de ces trois systèmes semble ainsi suffisante dans la discrimination des taxa
- Certaines bandes appartenant aux trois systèmes s'avèrent être de bons marqueurs de discrimination entre les taxa étudiés
- Les isozymes révèlent des groupes monophylétiques qui correspondent largement aux sections délimitées dans les traitements morphologiques traditionnels. Les zymogrammes de *V. sativa* indiquent, encore une fois, la relation étroite entre les sous-espèces du complexe
- Les trois systèmes analysés semblent plus appropriés pour les études de diversité interspécifique mais le sont moins pour faire ressortir les affinités intraspécifiques.
- La nomenclature allélique nous a permis d'entreprendre une lecture génétique conférant une crédibilité à ce marqueur biochimique
- Les propriétés physiques du grain chez les taxa du genre *Vicia* en Algérie n'ont pas été caractérisées. Le présent travail montre que :
  - L'UPGMA des douze paramètres physiques des grains n'a pas donné de groupes stables. Le schéma global montre que les accessions de la même espèce tendent à se regrouper. Les espèces traditionnellement connues pour avoir un niveau élevé de variabilité sont présentes dans plus d'un cluster.
  - La variabilité entre les accessions appartenant au même taxon peut s'expliquer par les caractéristiques génétiques et environnementales du polymorphisme des grains.

### Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives

- L'analyse discriminatoire par les propriétés physiques du grain n'a montré aucune correspondance avec la systématique. Cependant, cette caractérisation est utile parce que les graines qui varient dans leur apparence, varient également dans leur composition chimique. Lorsque nous sommes appelés à manipuler les constituants chimiques des grains, il devient alors important de classer les grains selon leurs types et leurs propriétés physiques.

#### IV- Diversité génétique associée à la morphologie de la plante et aux marqueurs moléculaires de type ISSR

- Concernant les traits morphologiques, nous nous sommes intéressés, dans ce volet, aux relations sur les plans sectionnel et sub-générique. Les relations phylogénétiques concordent avec les données qui avancent que la section *Hypechusa* est distante du NSC. La section *Hypechusa* est plutôt alignée avec la section *Cracca* alors que la section *Narbonensis* est plus alignée avec la section *Vicia*. Ainsi, l'UPGMA, montre deux clusters correspondant aux deux sous-genres traditionnels (*Vicia* et *Vicilla*). Cependant, les accessions de *V. lutea* appartenant à la section *Hypechusa* (sous-genre *Vicia*) sont liés aux taxa de la section *Cracca* (sous-genre *Vicilla*) ; alors, qu'en absence des échantillons de *V. sativa*, ils se regroupent avec les accessions de *V. narbonensis*. Ces résultats rejoignent ceux de l'ACP. Le placement des accessions de *V. narbonensis* avec ceux de *V. sativa* est justifié car les deux taxa appartiennent au sous-genre *Vicia*. Nos résultats rejoignent ceux des auteurs qui ont établi une relation étroite entre NSC et la section *Vicia*, plutôt qu'entre NSC et la section *Hypechusa*.
- Concernant les résultats moléculaires, quatre marqueurs ISSR choisis dans la littérature ont été utilisés dans la présente étude. Le protocole d'amplification a nécessité des mises au point spécialement au niveau du profil thermique de la PCR
- Un total de 113 bandes a été généré par l'utilisation des 4 primers. Le nombre des bandes par profil est compris entre 1 et 11. Au total, les quatre amorces ont montré 100% de polymorphisme, confirmant les résultats qui avancent que ce type de marqueur serait utile dans les études de diversité du genre *Vicia*. La diversité varie énormément au sein des populations du même taxon. Ceci indiquerait, probablement, un flux de gènes important entre les populations.
- La grande diversité des ISSR détectée dans le complexe *sativa* rejoint les avis des auteurs qui suggèrent que ce marqueur peut d'abord être utilisé pour sélectionner de nouveaux génotypes de *V. sativa* ayant une importance agronomique et économique.

### Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives

- Le test de Mantel a montré une forte corrélation entre les deux indices (Dice et Jaccard) choisis pour évaluer les distances entre les accessions. Les deux indices ont effectivement montré plus ou moins des ressemblances dans les groupes. Le dendrogramme généré par l'indice de Dice a montré une cohérence entre certains groupes et la taxonomie traditionnelle sur les plans sub-générique et sectionnel, alors que d'autres groupes n'ont pas montré de discriminations claires au sein des sous-genres et des sections. Les taxa de la section *Cracca* (sous genre *Vicilla*), se regroupent ensemble comme c'est le cas des accessions de *V. leucantha*, *V. tenuifolia* et quelques échantillons de *V. monantha*. L'indice de Jaccard a produit une image générale similaire sauf qu'il s'avère plus discriminatoire. Il est important de mentionner que les échantillons présentant les plus faibles distances appartiennent à la même espèce et donc aux mêmes sections et sous-genres.
- Plusieurs études ayant traité de la diversité génétique des plantes par les marqueurs moléculaires ont établi une corrélation entre la distance géographique et les similarités génétiques entre les individus. Les espèces avec un large spectre géographique ont généralement le plus de diversité génétique. Les populations étudiées sont largement distribuées en Algérie, ce qui pourrait être l'une des raisons du taux élevé de diversité génétique.
- En dépit de la grande diversité génétique révélée par les données moléculaires, plusieurs accessions n'ont pas été amplifiées par les amorces utilisées, et ce après plusieurs répétitions. En plus, l'utilisation de ces amorces n'a pas produit de groupes stables en relation avec la taxonomie, ce qui indiquerait que leur utilisation dans d'autres études de variabilité est à discuter. Nous rejoignons les avis des auteurs que la variabilité génétique au sein des taxa de vesce, devrait être évaluée par d'autres approches, mais avant de tirer des conclusions hâtives, il serait préférable de tester un nombre plus important d'amorces sur les accessions étudiées.

---

**Analyse et conclusions**

---

- En Algérie, les recherches de botanique phylogénétique et phytogéographique sont rares. Ceci fait ressortir l'importance des études systématiques au niveau des espèces et des populations dans l'interprétation de la structure et de la dynamique de la flore Algérienne, ainsi que leurs impacts sur l'évaluation et la conservation de la biodiversité.
- La présente thèse a une valeur prédictive pour la caractérisation des populations spontanées de vesce qui doivent en priorité s'intégrer, tant dans les programmes de valorisation des ressources phylogénétiques que dans la stratégie de conservation de la biodiversité. La démarche adoptée dans ce travail est motivée par la préoccupation d'appréhender la diversité génétique de populations naturelles de vesce et leur structuration écogéographique. Nous nous sommes attachés à effectuer un échantillonnage le plus large possible, le plus représentatif de la répartition écogéographique des taxa du genre. Aussi, nous avons tenté de diversifier les milieux de récoltes pour mieux traduire la plasticité écologique des vesces face aux contraintes des facteurs écologiques. La situation des sites de récoltes sur la carte bioclimatique du nord de l'Algérie et leurs principales caractéristiques climatiques rendent compte du gradient de variation écogéographique et de son étendue. Cependant et bien qu'impressionnante, cette caractérisation bioclimatique n'est pas suffisante car les conditions méso et microclimatiques stationnelles confèrent aux biotopes des conditions spécifiques.
- La prise de conscience de l'importance de la collecte de données géographiques et écologiques détaillées complémentaires ainsi que l'organisation des missions de collecte sont d'une importance majeure. Il y a également un besoin de réaliser, préférentiellement en ligne, des catalogues de cultivars et des espèces de vesce en parallèle aux données de caractérisation et d'évaluation
- Les résultats de la caractérisation écogéographique de la présente étude doivent être combinés avec ceux des études précédentes qui ont cerné la distribution de ces mêmes taxa, pour fournir plus d'informations sur l'écogéographie du matériel étudié. Il s'agit d'une démarche importante dans toute analyse écogéographique fiable, car elle permet la formation d'une image plus complète de la distribution de chacun des taxa.
- Dans les zones de transition bioclimatique, les populations sont souvent caractérisées par une diversité génétique importante. Ces zones méritent une attention particulière dans les efforts de conservation de la biodiversité, car elles peuvent constituer des centres de

### Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives

spéciation suite à des micro-isolements. La connaissance des limites d'aires de répartition des espèces le long du gradient écologique s'avère donc déterminante comme source d'indication sur le potentiel évolutif des programmes d'évaluation et de conservation de la biodiversité.

- Les difficultés que nous avons rencontrées dans l'identification des taxa du genre *Vicia* mettent en évidence l'urgence de la mise à jour taxonomique et la compréhension de la flore de l'Algérie. Une mise à niveau sur les plans taxonomique et nomenclatural de la flore doit être le point de repère pour l'évaluation et la conservation de la biodiversité. Il faut reconnaître que les concepts d'espèces diffèrent de groupe en groupe et il y a souvent des différences nationales ou régionales dans la façon dont le concept d'espèce est employé, ce qui rend les comparaisons difficiles. Pour les espèces répandues dans plus d'un pays ; il faudrait prendre des précautions, les mêmes espèces peuvent être inscrites sous différents noms dans la flore, en fonction du pays. En l'absence de toute nomenclature convenue, des conseils auprès de botanistes spécialisés doivent être recherchés.
- Les données que nous avons consultées dans les thèses et les rapports du MADR concernant les vesces font ressortir les points suivants :
  - Le manque d'intégration entre les programmes de conservation et d'utilisation, le manque de coordination entre les chercheurs, les sélectionneurs et les agriculteurs ainsi que l'inexistence d'un cadre réglementaire en matière d'utilisation durable et de commercialisation des espèces sous exploitées.
  - Les collections de notre pays ne sont souvent pas complétées par un document de référence. Nous ne disposons pas d'une base de données informatisée, ni d'un catalogue publié. Aucun système d'informations homogène n'est utilisé par les instituts pour stocker, gérer ou analyser les données de caractérisation et d'évaluation. La caractérisation est basée principalement sur les caractères morphologiques et agronomiques et rarement sur les aspects physiologiques, biochimiques et moléculaires. La diversité présente dans les collections nécessite d'être caractérisée et évaluée en détail en utilisant les données agromorphologiques combinées aux techniques moléculaires. En plus de l'utilisation de ces résultats dans l'entretien des collections, ces données, combinées aux techniques de systèmes d'information géographique, pourraient être utilisés pour identifier les lacunes dans les collections et des zones pour une éventuelle conservation *in situ*.
  - Il est important d'élaborer un Programme National pour promouvoir la conservation *in situ*, la gestion et l'amélioration des ressources de vesce. Cet aspect permettra aux agriculteurs de sélectionner leur semence et être ainsi plus autonomes d'une part et permettra l'échange et

### Cinquième chapitre : Synthèse, conclusions et perspectives

la commercialisation des semences de ferme d'autre part tout en préservant les ressources phytogénétiques.

- Certaines espèces de vesce considérées comme mauvaises herbes, souvent associées à des systèmes agricoles traditionnels, sont en train de disparaître avec les changements dans l'utilisation des terres. Par conséquent, l'attention doit également être accordée à la conservation systématique de ces espèces. Les espèces non cultivées ou qui n'ont pas une exploitation immédiate potentielle sont sous-représentées dans les collections *ex situ*, mais du fait que la majorité des pays de la région Méditerranéenne ont signé la convention sur la diversité biologique (CBD 1992), ils sont obligés de faire en sorte que ces espèces soient également conservées. Des efforts sont nécessaires pour sensibiliser les milieux politiques de notre pays quant à la valeur stratégique des ressources de vesces et à l'importance d'un engagement public à long terme pour leur conservation et leur mise en valeur.

---

**Perspectives**

---

- Nous envisageons la programmation de nouvelles prospections et collectes à travers le pays, afin d'élargir la collection de vesce par d'autres accessions. En effet, le genre *Vicia* renferme quelques espèces fourragères potentielles qui n'ont pas encore été testées ou essayées. Les populations ayant une diversité élevée ont besoin d'être identifiées et échantillonnées de manière plus approfondie afin d'élargir la base génétique disponible pour la sélection végétale.
- Les accessions que nous avons collectées devraient d'abord être conservées dans les banques de gènes. Il est important de s'assurer qu'elles soient dupliquées entre au moins deux banques de gènes comme mesure de sécurité contre la perte accidentelle d'accessions.
- Les accessions doivent être multipliées à des intervalles appropriés. La priorité devrait donc être donnée pour tester ce matériel pour sa viabilité. Avant qu'une multiplication appropriée ne soit entreprise, il faut définir le système de reproduction des espèces en question. Si l'espèce se reproduit par allogamie, son auto-multiplication peut conduire à une perte inutile de la diversité génétique. Ainsi, il est important de connaître si une espèce est autogame ou allogame. Cette information n'est pas disponible pour la majorité des espèces du genre *Vicia*.
- L'enquête écogéographique initiée devrait être complétée par l'exploration d'autres paramètres, afin de consolider la base de données écogéographiques des taxa étudiés
- D'autres propriétés physiques du grain (zone projetée, porosité, vitesse terminale, coefficient statique de friction contre différents matériaux, résistance au bombardement...) sont à explorer. En parallèle, toutes les propriétés physiques doivent être estimées en fonction d'un gradient de taux d'humidité.
- Les techniques de cytogénétique classique et moléculaire devraient être utilisées pour répondre aux questions des délimitations intra spécifiques, surtout dans le groupe *sativa* ;
- Il serait intéressant de tester les propriétés physico-chimiques des taxa, leurs facteurs antinutritionnels et évaluer leur potentiel agronomique afin de proposer des ratios graminée-légumineuse appropriés, surtout que la composition minérale des grains apparaît significativement différente selon leurs origines géographiques, qui est attribuée aux facteurs génétiques et environnementaux des aires de production
- La diversité génétique et les affinités phylogénétiques de la collection pourraient être consolidées par l'utilisation d'un nombre plus important de marqueurs biochimiques (IEF, systèmes enzymatiques...) et de marqueurs moléculaires (AFLP, ITS, SRAP ...).

# **Annexes**



### Annexe 1 : Solutions utilisées pour l'extraction et l'électrophorèse des protéines de réserve de la vesce (*Vicia L.*)

- **PMSF (1%) pour 5 ml** : Conserver à 4°C pendant 9 mois
  - PMSF.....0.087 g
  - Isopropanol.....5 ml
  
- **Albumines : Solution d'extraction pH 8.0 (pour 100 ml)**
  - CaCl<sub>2</sub> ..... 0.11 g
  - MgCl<sub>2</sub>.....0.0952 g
  - H<sub>2</sub>O distillée.....qsp 100 ml
  
- **Globulines : Solution d'extraction pH 7.5-8**
  - Tris..... 1.211 g
  - NaCl .....10 g
  - EDTA .....0.292 g
  - EGTA.....0.380 g
  - H<sub>2</sub>O distillée.....qsp 100 ml
  
- **Prolamines : Solution d'extraction = éthanol 75%**
  
- **Tampon de charge** :
  - Solution stock (pour 25 ml)
    - Glycérol..... 10 ml
    - Tris-HCl pH 6.8..... 6.25 ml
    - Eau permutée.....12.05 ml
    - SDS..... 2 g
    - Bromophénol..... 0.01 g
  - Dilution (pour 10 ml) :  
Conditions non réductrices :
    - Solution stock..... 4.50 ml
    - Eau pure..... qsp 10 ml
  
- **Tampon de migration (4 litres : 3L pour bac inf. + 1L pour bac sup.)**  
Pour 2L :
  - SDS..... 2 g
  - Glycine .....28.22 g
  - Tris .....6 g
  
- **Solution de coloration pour gels (3 gels) : 150 ml/gel**
  - TCA .....54 g
  - Solution mère de bleu de Coomassie ..... 22,5 ml
  - Eau distillée ..... qsp 450 ml
- **Solution de coloration pour gels (4 gels)**
  - TCA .....72 g
  - Solution mère de bleu de Coomassie ..... 30 ml
  - Eau distillée ..... qsp 600 ml

- **Solution mère de Bleu de Coomassie (1%) :**

- Bleu de Coomassie R250..... 10 g
- Ethanol 96%.....1000 ml

Mettre l'éthanol en agitation, ajouter le bleu de Coomassie graduellement. Laisser en agitation 2h ou toute la nuit. Filtrer.

- **Tampon Tris 8.8 (pour 250 ml) :**

- Tris ..... 30.285 g
- H<sub>2</sub>O..... 200 ml
- Ajuster le Ph avec l'HCl fumant (env. 4ml)
- H<sub>2</sub>O..... qsp 250 ml

- **Tampon Tris 6.8 (pour 250 ml) :**

- Tris ..... 30.285 g
- H<sub>2</sub>O..... 200 ml
- Ajuster le Ph avec l'HCl fumant (env. 19.5ml)
- H<sub>2</sub>O..... qsp 250 ml

- **Acrylamide 40%**

- Acrylamide..... 40 g
- H<sub>2</sub>O..... qsp 100 ml

- **Bis-Acrylamide 2%**

- Acrylamide..... 2 g
- H<sub>2</sub>O..... qsp 100 ml

- **SDS 10%**

- SDS..... 10 g
- H<sub>2</sub>O..... qsp 100 ml

**Annexe 2 : Extraction basée sur le critère de solubilité des protéines de réserve de la vesce (*Vicia L.*) selon Ribeiro *et al.* (2004) modifié**

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Broyage des cotylédons</li> <li>- Peser 10 mg (=0,01 g) de farine</li> </ul> |
|---|

- Déposer **340 µl** / 10 mg d'échantillon **de n-hexane**
- Vortexer
- Mettre en agitation pendant ¼ h
- Centrifuger pendant 15 min. à 4°C, 14000 rpm (max.)
- Décanter l'hexane
- Sécher à l'étuve (37°C)

**Albumines**

- **Solution A** = 10 ml de solution d'extraction + 100 µl PMSF (le rajouter avant manip.)
- Déposer **350 µl** / éch. de solution **A**
- Vortexer
- Agitation à 4°C pendant 20 min.
- Centrifuger pendant 15 min. à 4°C, 14000 rpm
- **Récupérer le surnageant** contenant les albumines **dans de nouveau tubes**..... 1
- **Lavage du culot** :
- Ajouter **100 µl** de la **solution d'extraction** au culot
- Emietter
- Vortexer
- Agitation à 4°C / 20 min.
- Centrifuger pendant 15 min. à 4°C, 14000 rpm
- Eliminer le surnageant et garder le **culot**..... 2
- Dans 1, rajouter :
- **1 ml d'acétone** (préalablement glacé au congélateur)
- Déposer au congélateur (-20°C) pendant 1h.
- Centrifuger pendant 10 min. à 4°C, 14000 rpm
- Eliminer l'acétone (avec une seringue)
- Sécher à l'étuve (37°C)
- Mettre **100 µl** de **tampon de charge**
- Emietter
- Vortexer
- Mettre à l'étuve à 65°C pendant 30 min.

Dépôt : **20 µl**

### Globulines

**Solution B** : 10 ml de la solution d'extraction + 100  $\mu$ l PMSF (le rajouter avant manip.)

- Dans 2, déposer **350  $\mu$ l de solution B**
- Emitter
- Vortexer
- Agitation à 4°C pendant 30 min.
- Centrifuger à 4°C pendant 15 min. 14000 rpm
- Récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes
- Garder le **culot**..... 3
- Ajouter **1 ml d'acétone glacé**
- Congeler 1 h
- Centrifuger 10 min. à 4°C 14000 rpm
- Eliminer l'acétone
- Sécher à l'étuve à 37°C
- Déposer **100  $\mu$ l de tampon de charge**
- Emitter
- Vortexer
- Mettre dans l'étuve à 65°C / 30 min.

Dépôt : **8  $\mu$ l**

### Prolamines

Dans 3 :

- Mettre **50  $\mu$ l** / échan. **éthanol (75%)**
- Emitter
- Vortexer
- Agitation 20 min. à 4°C
- Centrifugation 15 min. 4°C 14000 rpm
- Récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes
- Ajouter **500  $\mu$ l d'acétone glacé**
- Congeler pendant 1 h
- Centrifugation pendant 10 min. 4°C ; 14000 rpm
- Eliminer l'acétone avec une seringue
- Mettre dans l'étuve à 37°C jusqu'au séchage (max. 5 min.)
- Mettre **100  $\mu$ l de tampon de charge**
- Emitter
- Vortexer
- Mettre dans l'étuve 30 min. à 65°C

Dépôt : **70  $\mu$ l**

### Annexe 3 : SDS-PAGE des protéines de réserve de la vesce (*Vicia L.*)

- Préparer APS 1% (0,1g/10 ml d'eau distillée)

#### Pour 2 gels :

- **Gel de séparation** (running gel) 12%
  - Acrylamide 40%.....23,9 ml
  - Bisacrylamide 2%.....4,7 ml
  - Eau distillée .....16,5 ml
  - Tampon Tris HCl pH8.8.....29,3 ml
  - SDS 10%.....770 µl (0,77 ml)
  - APS 1%.....1930 µl (1,93 ml)
  - TEMED.....39 µl (0,039 ml)
 Total = 77 ml
- **Gel de concentration** (stacking gel) 5% avec APS 20%
  - Solution stock acry/bis (30 : 0.8%).....8.09 ml
  - Tampon Tris-HCl pH 6.8 .....5 ml
  - Eau distillée .....13 ml
  - APS 20% (0.2 g/1ml).....100 µl (0.1 ml)
  - TEMED.....16 µl
- **Conditions de migration** (nuit) : V = 60      A = 500 (max.)      Temps max ~ 24h  
 Le lendemain : mettre les conditions du jour : 1200V 80mA (40 mA/gel)

Après coloration, mettre en agitation toute la nuit. Le lendemain : Décoloration à l'eau courante

#### Pour 4 gels :

- **Gel de séparation** (running gel) 12%
    - Acrylamide 40%..... 36.6 ml
    - Bisacrylamide 2%.....7.2 ml
    - Eau distillée .....25.2 ml
    - Tampon Tris HCl pH8.8.....44 .8 ml
    - SDS 10%.....1,18 ml
    - APS 1%.....2,95 ml
    - TEMED.....59 µl (0,059 ml)
 Total = 118 ml
  - **Gel de concentration** (stacking gel) 5% avec APS 20%
    - Solution stock acry/bis (30 : 0.8%).....12.14 ml
    - Tampon Tris-HCl pH 6.8 .....7.5 ml
    - Eau distillée .....19.5 ml
    - APS 20% .....150 µl (0.15 ml)
    - TEMED.....24 µl (0.024 ml)
 Total = 30 ml
  - **Conditions de migration** (nuit) : V = 60      A = 500 (max.)      Temps max ~ 24h  
 Le lendemain : remettre aux conditions jour : 1200 V 80 mA (40 mA/gel)
- Après coloration, mettre en agitation toute la nuit. Le lendemain : Décoloration à l'eau courante

**Annexe 4 : Extraction des systèmes enzymatiques chez la vesce (*Vicia L.*) selon Jaaska (2002, 2005)**

- **Solution d'extraction pH 7.4.** Quantités pour 50 ml :
  - Tris..... 0.302 g
  - EDTA.....0.186 g
  - DTT.....0.038 g
  - Glycérol 50%.....0.3 ml
  - Sephadex G-200.....0.05 g (50 mg)
- **Tampon de charge**
  - Solution d'extraction .....1 ml
  - Bleu de Bromophénol..... quelques grains
  
- Peser **0.1 g** de **folioles**
- Sur de la glace pilée, broyer les folioles dans **600 µl de solution d'extraction**
- Garder les tubes dans la glace
- Mettre **10 µl** / échantillon de **tampon de charge**
- Vortexer
- Centrifugation 20 min. 4°C 14000 rpm (max.)

**Annexe 5 : PAGE des systèmes enzymatiques chez la vesce (*Vicia L.*)**• **2 gels**- **Gel de séparation**

- Acrylamide 40%.....10.2 ml
- Bisacrylamide 2%.....2.7 ml
- Eau distillée.....10.5 ml
- Tris HCl 8.8.....15.2 ml
- APS 1%.....1 ml
- TEMED.....0.020 ml
- Riboflavine.....0.0002 g

Total = 40 ml

- **Gel de concentration (5%)**

- Solution stock acry/bis (30 : 0.8%).....8.09 ml
- Tampon Tris-HCl pH 6.8 .....5 ml
- Eau distillée .....13 ml
- APS 20% .....100 µl (0.1 ml)
- TEMED.....16 µl

• **4 gels**- **Gel de séparation**

- Acrylamide 40%.....19.6 ml
- Bisacrylamide 2%.....5.2 ml
- Eau distillée.....20.3 ml
- Tris HCl 8.8.....29.3 ml
- APS 1%.....1.93 ml
- TEMED.....0.039 ml
- Riboflavine.....0.0004 g

Total = 77 ml

- **Gel de concentration (5%)**

- Solution stock acry/bis (30 : 0.8%).....8.09 ml
- Tampon Tris-HCl pH 6.8 .....5 ml
- Eau distillée .....13 ml
- APS 20% .....100 µl (0.1 ml)
- TEMED.....16 µl

Total = 30 ml

Dépôt : **30 µl**

Conditions de migration (jour) : 1200 V    80 mA    300 W (toujours)

**Annexe 6 : Tampons de migration utilisés pour les systèmes enzymatiques chez la vesce (*Vicia L.*)**

- **Tampon du bac supérieur (Tris-glycine) : 1 L**
  - Glycine.....6.005 g
  - Tris .....1.211 g
  - Eau distillée.....1000 ml
  
- **Tampon du bac inférieur (Tris acétate pH 8.9) : 3 L (le garder tant que le pH est sup. à 7)**
  - Tris..... 36.33 g
  - Acide acétique.....3.60 ml
  - Eau distillée..... 3000 ml



**Annexe 7 : Révélation des systèmes enzymatiques  
chez la vesce (*Vicia L.*) selon Wendel et Weeden (1989)**

**SOD (SuperOxide Dismutase) EC 1 15 1 1**

- Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 ..... 50 ml \*
- Riboflavine ..... 2 mg
- EDTA ..... 1 mg
- NBT ..... 10 mg  
(1ml)

**\* Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 :**

- Tris ..... 0.302 g
- Eau distillée ..... 50 ml

**ADH**

- Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 ..... 50 ml
- NAD ..... 10 mg (1ml)
- Ethanol ..... 0.2 ml (=200 µl)
- NBT ou MTT ..... 10 mg (1ml)
- PMS ..... 2 mg (0.4 ml)

Incubation jusqu'à apparition optimale des bandes. Rincer et stocker dans l'eau, si le NBT est utilisé, ou fixer

**GOT**

- Solution substrat pH 7.4 ..... 50 ml
- Fast blue BB salt ..... 50 mg (1ml)

Solution substrat : (se conserve 3 semaines au réfrigérateur)

- H<sub>2</sub>O ..... 800 ml
- Acide α-cétoglutarique ..... 292 mg
- Acide L-aspartique ..... 1.07 g
- PVP-40 (polyvinylpyrrolidone) ..... 4g
- EDTA, Na<sub>2</sub> salt ..... 400 mg
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 11.36 g

Incuber à T° ambiante, à l'obscurité jusqu'à apparition de bandes bleues

**Fixation :**

- Méthanol : eau : acide acétique ..... 5 : 5 : 1 Ou ;
- Ethanol : eau : acide acétique : glycérol ..... 5 : 4 : 2 : 1 Ou ;
- Glycérol : eau ..... 1 : 1

## Annexe 8 : Solutions pour l'extraction de l'ADN

Toutes les solutions se conservent à température ambiante

Le CTAB additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol doit se préparer juste avant l'extraction

- **Tampon CTAB 2x (pH8) :** pour 1 litre

- CTAB.....20 g
- Tris.....12.11 g
- Na<sub>2</sub>EDTA.....7.44 g
- NaCl.....81.8 g
- PVP40.....10 g
- H<sub>2</sub>O distillée.....qsp 1litre

Dissoudre le CTAB dans 800 ml d'eau distillée, à chaud : 50°C (sur une plaque chauffante, avec agitation). Ajouter, dans l'ordre, les autres produits

Ajuster le pH à 8 avec HCl 1N

Compléter le volume à 1 litre

Stériliser 15 à 20 minutes (dans l'autoclave)

Conserver à température ambiante.

- **Tampon CTAB 2x additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol (1%) :** exemple pour 20 ml :  
200  $\mu$ l = 0.2 ml de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans 20 ml de CTAB

- **Solution de lavage 1**

- Acétate de sodium..... 0.4 g
- H<sub>2</sub>O.....6 ml
- Ethanol 100%.....19 ml

- **Solution de lavage 2**

- Acétate d'ammonium.....0.02 g
- H<sub>2</sub>O.....6 ml
- Ethanol 100%.....19 ml

- **Chloroforme / alcool isoamylique (24 :1) :** pour 25 ml

- Chloroforme.....24 ml
- Alcool isoamylique.....1 ml

- **TE 1x (pH8) :** pour 100 ml

- Tris ..... 0.12 g
- Na<sub>2</sub>EDTA.....0.04 g
- H<sub>2</sub>O.....qsp 100 ml

Ajouter H<sub>2</sub>O jusqu'à 90% du volume

Ajuster le pH à 8 avec l'HCl fumant

Compléter le volume

Stériliser 15-20 min.

- **TE 0.1x (pH8) :** pour 100 ml

- TE 1x.....10 ml
- H<sub>2</sub>O.....qsp 100 ml

Ajouter H<sub>2</sub>O jusqu'à 90% du volume

Vérifier que le pH de la solution est 8

Compléter le volume

Stériliser 15-20 min.

**Annexe 9 : Solutions pour le contrôle de la qualité de l'ADN**

- **Tampon TBE 10x : 1000 ml = 1 litre**
  - Tris ..... 108 g
  - Borate ..... 55 g
  - Na<sub>2</sub>EDTA ..... 7.44 g
  - H<sub>2</sub>O..... qsp 1000 ml

- **Tampon TBE 10x : 200 ml**
  - Tris ..... 21,6 g
  - Borate ..... 11 g
  - Na<sub>2</sub>EDTA ..... 1.488 g
  - H<sub>2</sub>O..... qsp 200 ml

- **Tampon TBE 1x**
  - TBE 10x..... 100 ml
  - H<sub>2</sub>O..... qsp 1000 ml

- **Gel d'agarose (0.8%)**
  - Agarose .....0.8 g
  - TBE 1x..... 100 ml

Mélanger dans un erlen de 200 ou 250 ml. Ne pas remuer. Chauffer dans un four à microondes pendant env. 2 min. Laisser bouillir jusqu'à ce que la solution devienne limpide. Laisser refroidir jusqu'à ce que la température baisse à 50°-60°C.

- **Solution de révélation (le BET est un produit cancérigène dangereux. Se munir de gants)**
  - H<sub>2</sub>O..... 300 ml
  - BET..... 9 gouttes

**Annexe 10 : Extraction de l'ADN (Doyle et Doyle 1987)**

- Peser 0.3 g de feuilles fraîches
  - Broyer les feuilles dans de l'azote liquide
  - Congeler à -20°C
- 
- Préchauffer le CTAB additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol à 65°C à l'étuve
  - Ajouter 900  $\mu$ l / échantillon de tampon CTAB
  - Vortexer
  - Incuber 45-60 min. à 65°C avec agitation
  - Centrifuger 15 min. à 4°C 10000 rpm
  - Etiqueter de nouveaux tubes eppendorf
  - Récupérer le surnageant (env. 800  $\mu$ l) dans les nouveaux tubes
  - Ajouter 800  $\mu$ l de solution chloroforme/alcool isoamylique
  - Agiter 45 min. à température ambiante, vitesse lente
  - Centrifuger 15 min. à 4°C 10000 rpm
  - Etiqueter de nouveaux tubes eppendorfs
  - Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette p1000 dans les nouveaux tubes (éviter de prendre la couche blanche du milieu)
  - Ajouter 5  $\mu$ l / éch. de RNase (10 mg/ml)
  - Agiter par inversion
  - Incuber 30 min. à 37°C
  - Ajouter 540  $\mu$ l / éch. d'isopropanol (2-propanol), préalablement congelé (-20°C)
  - Inverser délicatement
  - Précipiter à -20°C / 10 min.
  - Centrifuger 10 min. à 4°C 10000 rpm
  - Eliminer délicatement le surnageant
  - Ajouter 500  $\mu$ l / éch. de la solution de lavage 1
  - Suspendre le culot dans la solution en secouant le tube
  - Incuber à température ambiante / 15 min.
  - Centrifuger à 4°C / 5 min. 10000 rpm
  - Eliminer le surnageant
  - Ajouter 500  $\mu$ l / éch. de la solution de lavage 2
  - Ne pas incuber plus de 5 min.
  - Centrifuger à 4°C / 5 min. 10000 rpm
  - Eliminer le surnageant
  - Sécher l'ADN sous la hotte pendant environ 20 min.
  - Suspendre le culot d'ADN dans 100  $\mu$ l de T.E 0.1 x
  - Conserver à 4°C toute une nuit
  - Congeler à -20°C

## Annexe 11 : Dosage, dilutions et contrôle de qualité de l'ADN

- **Dosage**

Doser, au nanodrop, 1 µl de la solution mère d'ADN (congelée à -20°C)

- **Calcul des volumes pour les dilutions**

Volume total = **100 µl**

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad \text{Donc} \quad V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$C_1$  = concentration trouvée par le nanodrop

$C_2$  = 50 ng

$V_2$  = 100 µl

Exemple :

La concentration donnée par le nanodrop = 478 ng/ µl

478 ----- 100 ng/ µl

50 ng/ µl ----- x=?

**x = 10.46 µl** dans 50 ng/ µl

Le volume du TE 0.1 x à ajouter :

100 - 10.46 = **89.54 µl**

Donc : **10.46 µl ADN + 89.54 TE 0.1 x = 100 µl**

- Etiqueter de nouveaux tubes
- Sous hotte : Faire les dilutions de tous les échantillons. Les conserver à 4°C.
- Congeler les échantillons d'ADN originaux

Exemple 2 :  $C_2 = 20$  ng

478 ----- 100 ng/ µl

20 ng/ µl ----- x=?

**x = 4,18 µl** d'ADN

Le volume du TE 0.1 x à ajouter :

100 - 4,18 = **95,82 µl**

Donc : **4,18 µl ADN + 95,82 TE 0.1 x = 100 µl**

- **Qualité de l'ADN par électrophorèse**

- Déposer le peigne
- Couler le gel d'agarose (0.8%)
- Laisser polymériser 20 min.
- Etiqueter des tubes centrifuges
- Préparer les échantillons d'ADN (mis au frigo) dans les nouveaux tubes :  
10 µl d'ADN + 2 µl de tampon DNA loading buffer 6x (stocké à -20°C). Mélanger avec l'embout
- Congeler les échantillons d'ADN de la solution mère pour les prochaines amplifications (PCR)
- Enlever le peigne. Déposer le gel dans la cuve. Verser une quantité de TBE 1x. Ne pas remplir pour voir les puits. Déposer les échantillons (**12 µl / puits**). Ajouter le TBE 1x jusqu'à la flèche indiquée sur la cuve
- Migration : 100 V / 20 min. ou jusqu'à ¾ du gel
- Révélation : déposer le gel dans la solution de révélation. Couvrir pendant 10-15 min.
- Visualiser sous U.V

## Annexe 12 : Amorces ISSR utilisées

	<b>Amorce 1</b>	<b>Amorce 2</b>	<b>Amorce 3</b>	<b>Amorce 4</b>
<b>Oligo name</b>	160216D51	160216D52	160216D53	160216D54
<b>Séquence</b>	5'-GACA GACA GACA GACA-3'	5'-AG AG AG AG AG AG AG AG T-3'	5'-AC AC AC AC AC AC AC AC T-3'	5'-GA GA GA GA GA GA GA GA T-3'
<b>Longueur</b>	16	17	17	17
<b>GC (%)</b>	50	47	47	47

## **Annexe 13 : Reconstitution et dilutions des amorces**

### **Reconstitution (avec le TE 1x) : à faire la veille**

- Ajouter le volume de TE à l'amorce (voir fiche technique pour chaque amorce). Ne pas mélanger. Ne pas vortexer
- Mettre à 4°C pendant 2 heures
- Vortexer

Ceci est la solution stock -20°C de concentration 100 µM. Il faut impérativement la stocker à -20°C après dilutions

### **Reconstitution à l'eau pure stérile**

- Ajouter le volume d'eau pure stérile (voir fiche technique pour chaque amorce).  
Vortexer

Ceci est la solution stock -20°C de concentration 100 µM. Il faut impérativement la stocker à -20°C après dilutions

**Annexe 14 : Préparation du Mix pour PCR (Han et Wang 2010, modifié)**

Volume réactionnel = **10 µl**

- ADN..... 10 ng
  - MgCl<sub>2</sub>..... 1,5 mM
  - Amorce ..... 0,2 µM (primers 2 et 3) et 2 µM (primers 1 et 4)
  - dNTPs (Mix)..... 0,2 µM
  - Tampon 1 x
  - Taq polymérase..... 1 U
- 
- Décongeler l'ADN à T° ambiante, puis à 4°C
  - Décongeler la solution stock de l'amorce, le MgCl<sub>2</sub>, les dNTP, le tampon 10 x, puis les mettre dans le carboglass pendant la manip. Ne faire sortir la Taq du congélateur qu'au moment de l'utiliser
  - Commencer avec les grands volumes :
    - Eau pure
    - Tampon 10x
    - MgCl<sub>2</sub>
    - dNTP
    - Amorce
    - Taq (tjrs en dernier)
  - Vortexer le mix 1'', puis le centrifuger 15''
  - Vortexer l'ADN 1''
  - Mettre le Mix dans les tubes centrifuges (10 – 1 = 9 µl), puis ajouter 1 µl d'ADN
  - Vortexer



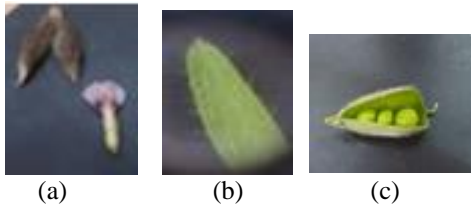
**Annexe 15 : PCR (Han et Wang 2010 modifié), dépôt, migration et révélation**

**Profil thermique de la PCR**

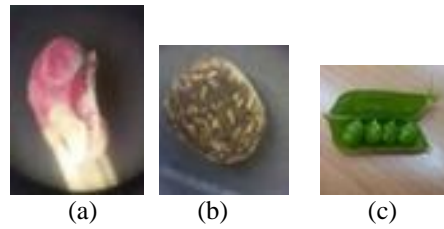
- 1 cycle de 3 min. à 94°
  - 30 cycles de : 35 s à 92°C, 30 s à 50°C (ou 55°C pour l'amorce 3), 60 s. à 72°C
  - 1 cycle de 7 min. à 72°C
- 
- Mettre les tubes contenant le mix + ADN dans le thermocycler
  - Après amplification, rajouter 2,5 µl de tampon de charge.
  - Pipeter 1 ou 2 fois pour mélanger
  - Déposer 12,5 µl dans chaque puits
  - Déposer 3 µl de marqueur de taille (100 pb)
  - Migration : gel d'agarose (1,8%), environ 80 min. à 100 volt dans du TBE 1x
  - Révélation : BET dans de l'eau / 15-20 min.

**Annexe 16 : Photos des traits morphologiques d'accessions représentatives des 11 taxa de vesce étudiés**

***Vicia lutea* subsp. *vestita***

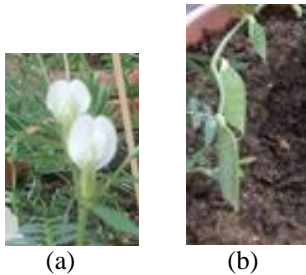


(Accession 1)  
 (a) Gousse mature et fleur  
 (b) Foliolle  
 (c) Gousse à 3 graines  
 (avant maturité)

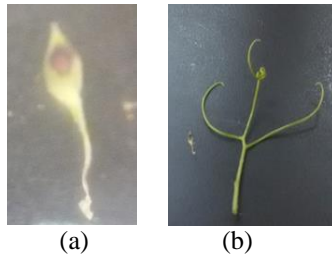


(Accession 58)  
 (a) Carène  
 (b) Graine mature  
 (c) Gousse à 4 graines  
 (avant maturité)

***Vicia lutea* subsp. *eu-lutea***



(Accession 62)  
 (a) Fleurs  
 (b) Gousses immatures



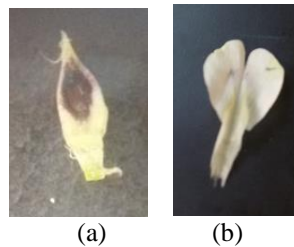
(Accession 63)  
 (a) Stipule  
 (b) Vrilles



(Accession 79)  
 Base du calice

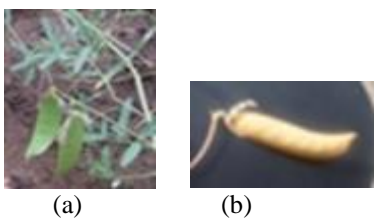


(Accession 82)  
 Gousses avant maturité



(Accession 90)  
 (a) Stipule  
 (b) Etendard

***Vicia monantha* subsp. *calcarata***



(Accession 12)  
 (a) Gousses, avant maturité  
 (b) Gousse mature



(Accession 26)  
 Carène et calice



(Accession 27)  
 Calice



(Accession 40)  
 Calice

**Annexes**



(Accession 18)  
Calice et carène



(Accession 45)  
Gousse avant  
maturité



(a)



(b)

(Accession 60)  
(a) Etendard  
(b) Calice



(a)



(b)

(Accession 60)  
(a) Fleurs  
(b) Calice



(Accession 102)  
Gousses matures



(Accession 98)  
Gousse à 3 graines  
avant maturité

***V. monantha* subsp. *cinerea***

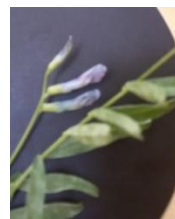


(a)



(b)

(Accession 91a)  
(a) Calice  
(b) Gousse avant maturité



(a)



(b)

(Accession 101)  
(a) Fleurs et folioles  
(b) Calice

***Vicia narbonensis***



(a)

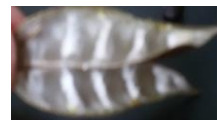


(b)

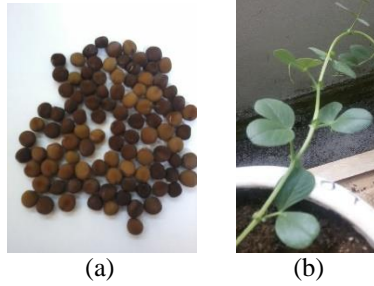
(Accession 30)  
(a) Folioles  
(b) Stipule



(Accession 34)  
Fleur, folioles  
et vrilles



(Accession 81)  
Gousses matures



(Accession 23)  
(a) Graines  
(c) Tige et folioles

*Vicia tenuifolia*



(Accession 56)  
Tige, folioles, fleurs et vrilles



(Accession 89)  
Gousses avant maturité

*Vicia leucantha*



(Accession 100)  
(a) Stipule (b) Etendard  
(c) Calice et carène  
(d) Fleurs

*Vicia sativa* subsp. *angustifolia*



(Accession 19)  
(a) Foliole  
(b) Foliole  
(c) Stipule  
(d) Gousses matures

*Vicia sativa* subsp. *consobrina*

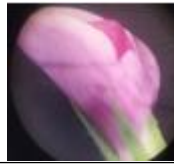


(a)



(b)

(Accession 14)  
(a) Foliolle  
(b) Gousses matures



(Accession 36)

Fleur



(a)



(b)

(Accession 64)  
(a) Foliolles, fleurs et vrilles  
(b) Gousses matures



(a)



(b)

(Accession 86)  
(a) Calice et carène  
(b) Vrilles



(Accession 65a)  
Gousses avant maturité

*V. sativa* subsp. *obovata*



(a)



(b)

(Accession 6)  
(a) Foliolles  
(b) Gousse avant maturité

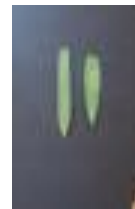


(Accession 7)

Carène



(a)



(b)

(Accession 10)  
(a) Graines  
(b) Foliolles



(a)



(b)

(Accession 22)  
(a) Foliolles et fleur  
(b) Gousse mature et graines avant maturité



(Accession 51)

Foliolles



(a)



(b)



(c)

(Accession 68)  
(a) Foliolles  
(b) Stipules  
(c) Aile



(Accession 72)  
Folioles et fleurs



(a)



(b)



(c)



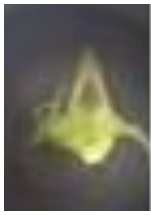
(d)

(Accession 80)  
(a) Surface de la gousse mature  
(b) Gousse mature après égrenage  
(c) Stipule (d) Folioles

*V. sativa subsp. cordata*



(Accession 8)  
Etendard



(a)



(b)

(Accession 11)  
(a) Stipule  
(b) Calice et carène



(a)

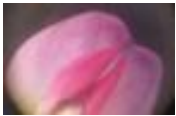


(b)

(Accession 13)  
(a) Calice  
(b) Gousse avant maturité



(a)



(b)



(c)

(Accession 33)  
(d) Vrilles  
(e) Etendard et ailes  
(f) Calice



(a)



(b)

(Accession 42)  
(a) Vrilles  
(b) Etendard et ailes  
(c) Calice

### Annexe 17 : Prégermination, semis et suivi du développement jusqu'au stade fructification



Serre du laboratoire de génétique biochimie et biotechnologies végétales. Université Frères MENTOURI Constantine



Pots contenant gravier, terre, sable et terreau

#### Exemple de l'accession 79 (*Vicia lutea* subsp. *eu-lutea*)



Graines prégermées



Semis



Arrosage



Sortie des premières feuilles



Floraison



Fructification

<b>Nom et Prénom :</b> BECHKRI Sakina	<b>Date de soutenance :</b> 15 / 05 / 2017
<b>Thème :</b>	Le genre <i>Vicia</i> L. en Algérie Caractérisation de 11 taxa naturels : Approches éco-géographique, morphologique, biochimique et moléculaire
<b>Nature du diplôme :</b>	Doctorat en Sciences. Filière : Biotechnologies Végétales. Option : Biotechnologies Végétales.
<b>Résumé</b>	<p>La convention sur la diversité biologique affirme le droit souverain des Etats à tirer des avantages équitables de l'utilisation des ressources phylogénétiques présentes sur leur territoire. Ce droit est cependant lié à la responsabilité nationale de conserver ces ressources et d'en promouvoir l'utilisation. Des lacunes et des besoins dans les activités de conservation et dans la mise en valeur de ces ressources existent. Les bénéfices considérables qui pourraient être réalisés au travers de ces ressources ne sont ni atteints ni équitablement partagés.</p> <p>La vesce (<i>Vicia</i> L.) est une légumineuse fourragère bien placée pour aider à répondre à la demande croissante pour l'alimentation animale et de fournir des cultures pour une diversité des systèmes agricoles. Il est cependant important de s'assurer que ses ressources génétiques soient conservées et donc disponibles pour la sélection continue des semences intéressantes.</p> <p>La présente étude est la première du genre dans la valorisation de 11 taxa naturels de vesce collectés à travers l'Algérie, par l'utilisation de marqueurs génétiques représentés par 78 caractères morphologiques de la plante, 3 fractions de protéines de réserve, 3 systèmes enzymatiques, 12 propriétés physiques du grain et un marqueur à ADN représenté par 4 amorces de type ISSR. En parallèle, 5 paramètres écogéographiques ont été utilisés pour la caractérisation des sites de collecte des accessions.</p> <p>La discrimination des taxa du complexe <i>Vicia sativa</i> via les descripteurs morphologiques et écogéographiques est difficile à cause de l'existence d'une variation continue. Quant aux autres taxa, l'analyse morphologique multi-traits révèle des discriminations plus stables qui concordent avec la taxonomie du genre. La connaissance des limites d'aires de répartition des espèces le long du gradient écologique est déterminante comme source d'indication sur le potentiel évolutif des programmes d'évaluation et de conservation de la biodiversité. Les données recueillies pourraient être valorisées dans la programmation des futures missions de collecte. Les électrophorégrammes des protéines de réserve peuvent être utilisés comme données de passeport pour l'identité génétique des accessions de vesce. Les zymogrammes sont compatibles avec les délimitations taxonomiques traditionnelles des espèces. Quant à l'analyse discriminatoire par les propriétés physiques du grain, elle n'a montré aucune correspondance avec la systématique. Les quatre amorces ISSR utilisées ont révélé 100% de bandes polymorphes. Cependant, leur utilisation éventuelle dans d'autres études de variabilité est à discuter. Les difficultés rencontrées dans l'identification des taxa mettent la lumière sur la nécessité de la révision taxonomique de la flore de l'Algérie.</p> <p><b>Mots clés :</b> Algérie ; vesce ; diversité ; caractérisation ; écogéographie ; marqueurs génétiques.</p>
<b>Laboratoire de recherche :</b>	Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Membres du jury :</b>	
<b>Présidente :</b> Dalila SATTA .....	Professeur. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Rapporteur :</b> Douadi KHELIFI .....	Professeur. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Examineur :</b> Mohammed Abdelhafid HAMIDECHI .....	Professeur. Université Frères MENTOURI Constantine
<b>Examineur :</b> Miloud HAFSI.....	Professeur. Université Sétif 1
<b>Examineur :</b> Abdelkrim MEBARKIA .....	Maître de Conférences. Université Sétif 1
<b>Examineur :</b> Ammar MEBARKIA.....	Maître de Conférences. Université Sétif 1