

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université des Frères Mentouri Constantine1**



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

N° d'ordre:

N° de Série:

**Thèse Présentée en Vue de l'Obtention de Diplôme de**  
**Doctorat en Sciences**  
**Filière : Biotechnologie Végétale**  
**Option : Génomiques et Techniques avancées des végétaux**

**Thème**

**Caractérisation d'hybrides *Aegilops sp.*/ Blé dur (*Triticum durum* Desf.)  
pour l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse du blé dur :  
Caractérisation moléculaire par SSR.**

**Présentée par**  
**Zadri Fethia Epouse Boudchicha**

**Soutenu le : 28-12-2020**

**Devant le jury**

Président	DJEKOUN Abdelhamid	Pr. Université des Frères Mentouri Constantine1
Directeur de thèse	YKHLEF Nadia	Pr. Université des Frères Mentouri Constantine1
Examineur	BENMAHAMMED Amar	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
Examineur	BOUSBAA Ratiba	MCA. Université des Frères Mentouri Constantine 1
Examineur	BENBELKACEM Abdelkader	Directeur de Recherche. INRAA. Constantine
Examineur	LAIB Messaoud	MCA. Université 20 Août 1955.Skikda

## **Remerciements**

### **A Mme. Ykhlef Nadia**

Professeur, Vice Rectrice des relations extérieures à l'université des Frères Mentouri 1 de Constantine, et directrice de ma thèse. Comment pourrais-je, en quelques phrases seulement, vous remercier de tout ce que j'ai pu apprendre à votre côté, vous avez su, par vos remarques toujours pertinentes, me guider pour donner du meilleur de moi et à me perfectionner, ma gratitude vous sera éternelle. Je ne vous remercie pas seulement pour avoir dirigé ma thèse, mais aussi pour l'exemple continu que vous me donniez aussi bien dans la vie professionnelle que personnelle.

### **A Mr. Djekoun Abdelhamid**

Professeur à l'université des Frères Mentouri 1 de Constantine et Directeur du Centre de Recherche en pharmacologie, je vous remercie pour l'honneur que vous m'avez accordé en présidant ce Jury, mais également pour l'intérêt que vous portiez constamment à mon travail, ainsi que pour vos conseils précieux.

### **A Mr. Benmahammed Amar**

Professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif 1. Je vous remercie pour avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de ce jury.

### **A Mr. Benbelkacem Abdelkader**

Maître de Recherche à l'Institut Nationale de Recherche en Agriculture, Constantine. Je suis honoré par votre contribution à l'examen de mon travail, je vous remercie pour l'intérêt accordé à mon travail, vos remarques seront sans doute des plus pertinentes et ne feront qu'améliorer ce travail.

**A Mme. Bousbaa Ratiba**

Maître de conférences « A » à l'université des Frères Mentouri 1 de Constantine,  
je vous remercie pour avoir accepté d'examiner mon travail, vos remarques  
contribueront sûrement à améliorer mon travail.

**A Mr. LAIB Messaoud**

Maître de conférences « A » à l'université 20 Août 1955. Skikda. Je vous  
remercie pour avoir accepté de faire partie du jury et d'évaluer mon travail.

**A Mr. Kellou Kamel**

Pour votre aide inestimable, vos conseils et votre présence pour les autres en  
dépit de toutes circonstances, je vous exprime ma fronde gratitude.

**A Mlle Mouelef Adra et Mr Tamagoult Mohamed**

Chers collègues, pour votre présence et soutien durant toutes ces années

**A toute l'équipe du Laboratoire de Génétique, Biochimie  
et Biotechnologies Végétales**

**Mr. Belbekri Nadir**, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils.

**A Mme. Bouldjedj Rima et Mlle. Zahraoui Chafika**, pour avoir été présentes  
à chaque fois, leur aide et l'intérêt présenté pour mon travail.

**A Mlle. Djaghar Asma, Mr. Baaziz Karim et Mme. Nassar Meryem**,  
pour leur aide précieuse lors de la réalisation de l'étude cytogénétique.

**A toutes mes chères collègues au sein du laboratoire.**

**A Mr. Mezedjri Lyamine**

Professeur à l'Université 20 Août 1955. Skikda. Je vous remercie pour votre  
grande contribution à la réalisation de l'étude statistique de la tolérance à la  
sécheresse.

**A Mme. Boudchicha Rima Hind**

Maitre de recherche au Centre de Recherche en Biotechnologie, je vous remercie ainsi que l'ensemble de votre équipe du laboratoire de Biologie Moléculaire pour votre aide inestimable dans la partie de la caractérisation moléculaire.

**A Mr. Kissoum Yacine**

Maitre de conférence « B » à l'université 20 Août 1955.Skikda, ainsi que son épouse pour leur aide au traitement des images.

**A Mr. Baali Abderrahmane**

Je vous remercie pour votre dévouement et implication pour la correction grammaticale et linguistique de ma thèse.

## Dédicace

*Louange à ALLAH qui ma donné la santé, le courage et la patience durant toutes ces années pour réaliser ce modeste travail.*

*Je dédie le fruit de ces longues années de labeur :*

*A mes parents ; source de courage, de patience et de modestie ;*

*A mes deux grand-mères ; emblèmes de force et de sacrifice ;*

*A mon mari, et mes enfants ;*

*A mes Sœurs, leurs maris et mes nièces ;*

*A ma sœur et son fiancé ;*

*A mon cher frère ;*

*A mes oncles et leurs épouses, mes tantes et leurs conjoints ;*

*ainsi que tous mes cousins et cousines et leurs enfants ;*

*A toute ma belle famille ;*

*A toute l'équipe de crèche « Super Nounou », je vous remercie pour l'épanouissement de mes enfants. Surtout, A Mme Abada, la directrice, pour m'avoir ouvert son bureau pour travailler ;*

*A la mémoire de ceux qui sont partis sans me voir soutenir,*

*tout particulièrement Khalou Djamel*

*« Puisse Dieu vous accueillir en son vaste Paradis »*

*A tous ceux qui m'aiment et que j'aime.*

**Fethia.**

## Résumé

L'objectif de ce travail a été d'obtenir des hybrides interspécifiques entre blé dur et espèces sauvages d'*Aegilops* en tant que parent femelle. Le genre *Aegilops* présente un réservoir de gènes pour l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse qui occasionne de grandes pertes pour la céréaliculture en Algérie. A cet effet, trois variétés de blés durs (Oued Zenati, Waha et Hoggar) ont été croisées avec deux espèces sauvages tétraploïdes (*Aegilops geniculata* Roth et *Aegilops triuncialis* L.), pendant cinq années afin de déceler les géniteurs présentant plus d'affinité pour l'obtention d'hybrides. Ces géniteurs ont été aussi caractérisés pour leur tolérance à la sécheresse. Une culture d'embryons matures sur milieu MS a été entreprise, suite à une non germination des hybrides dans les conditions naturelles. La caractérisation des hybrides a été réalisée par le dénombrement chromosomique ainsi que par l'expression moléculaire de onze marqueurs microsatellites (SSR) en comparaison avec les parents. Les résultats montrent un grand potentiel de tolérance à la sécheresse des espèces sauvages, et une adaptation des variétés de blé aux conditions climatiques en zones de céréaliculture. 81 hybrides ont été obtenus, la combinaison des parent *Aegilops geniculata*/Oued Zenati a produit le plus grand nombre d'hybrides (54 soit un taux de 5,23%), suivie du croisement *Aegilops triuncialis*/Oued Zenati (18 hybrides soit un taux de 3,88%), les croisements des deux espèces d'*Aegilops* avec la variété Hoggar n'a produit qu'un nombre faible d'hybrides. Un avantage de ce sens de croisement est l'obtention d'hybrides en caryopse sans recours au sauvetage d'embryons. Cependant, une létalité ainsi que des anomalies de développement des hybrides ont été constatées à différents stades. Ainsi, aucune plante adulte n'a pu être régénérée. Pour l'hybride *Aegilops geniculata*/Oued Zenati, le nombre chromosomique a été établi à  $2n=24$ . Parmi les 11 amorces SSR, huit se sont révélées polymorphes, dont *Xbarc174* et *Xwms332* présentent un grand nombre de bandes permettant ainsi de différencier aux mieux les hybrides. Des différences d'expressions de marqueurs même pour les hybrides issus de même parents ont été observées, où l'amorce *Xwmc25* et *Xwms257* ont permis de déceler une fragmentation du chromosome 2BS et élimination des fragments pour deux hybrides *Aegilops geniculata*/Oued zenati. Ces résultats indiquent que les hybrides ont manifesté une hérédité cytoplasmique maternelle, et que des mécanismes d'isolement postzygotiques expliquent la létalité et les anomalies de développement, dans ce sens de croisement. La recherche au sein des *Aegilops* d'accessions présentant plus d'affinité de croisement, permettra la régénération d'hybrides et la réussite de telles hybridations.

**Mots clés :** *Aegilops*, blé dur, sécheresse, croisements interspécifiques, amélioration génétique, marqueurs SSR.

## Abstract

The aim of this work was the obtaining of interspecific hybrids between wheat and wild *Aegilops* species as the female parent. The *Aegilops* genus is a potential genes source to genetic breeding for drought tolerance which causes considerable losses for wheat culture, in Algeria. For that, three durum wheat varieties (Oued Zenati, Waha and Hoggar) were crossed with two tetraploid *Aegilops* species (*Aegilops geniculata* Roth and *Aegilops triuncialis* L.), crosses were realised for 5 years, to figure out parents having most cross-ability to obtain hybrids. Parents were also characterized for drought tolerance. *In-vitro* mature embryos culture was undertaken, for reason of non hybrids germination in natural conditions. Hybrids were characterized by chromosomes numbering and using eleven microsatellites markers (SSRs) for molecular expression in comparison with their parents. Results showed a great drought tolerance potential for *Aegilops* species and adaptation of wheat varieties to climatic conditions governing wheat culture areas. 81 interspecific hybrids were obtained. *Aegilops geniculata*/Oued Zenati crosses produced the higher hybrids number (54 hybrids as the rate of 5, 23%), followed by *Aegilops triuncialis*/Oued Zenati (18 as the rate of 3, 88%), crosses involving *Aegilops* species and variety Hoggar produced the less hybrids number. This direction of hybridization is advantageous, due to hybrid production without embryos rescue. However, lethality and abnormal hybrid development was observed at different stages, any plant hybrid could be generated. For *Aegilops geniculata*/Oued Zenati, chromosome number was established to be  $2n=24$ . From eleven SSR markers, eight were found to be polymorphic, two of which *Xbarc174* and *Xwms332*, had a big band number and better distinguished hybrids. Different patterns of markers expression were observed, even for hybrids having the same parents, where *Xwmc25* and *Xwms257* allowed characterization of 2BS chromosome fragmentation and elimination in two different *Aegilops geniculata*/Oued Zenati. These results indicate that maternal cytoplasmic inheritance took place in hybrid formation, and that postzygotic isolation mechanisms explain lethality and abnormal hybrids development, in this direction of hybridization. Searching within *Aegilops*, of accessions having more cross-ability to ensure hybrid regeneration and succeed such hybridizations.

## Key words

*Aegilops*, durum wheat, drought, interspecific hybridization, genetic breeding, SSR markers.

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة كان الحصول على هجناء مابين الأنواع, بين القمح الصلب والنوع البري

*Aegilops* باعتباره الأم في هذا التهجين. هذا النوع البري يعد موردا هاما للتحسين الوراثي للنباتات إذ يحمل جينات تحمل الجفاف, المسبب لخسائر كبيرة لمحاصيل الحبوب. لهذا الغرض تم التهجين بين ثلاثة أصناف من القمح الصلب ( *Hoggar Oued Zenati* و *Waha*) ونوعين رباعيين الصيغة الصبغية (*Aegilops geniculata* Roth و *Aegilops triuncialis* L. ), لمدة خمس سنوات من أجل التعرف على الآباء الأكثر توافقا لإنتاج الهجناء. كما تمت أيضا دراسة تحمل الآباء للجفاف. نتيجة لعدم انتاش الهجناء في الظروف الطبيعية تمت زراعة أجنحتها الناضجة بتقنية الزراعة في الزجاجيات. دراسة الهجناء أجريت بتقنية حساب عدد الصبغيات و بدراسة التعبير عن المؤشرات الجزيئية الميكروساتلييتية (*SSR*), مقارنة بالآباء. أظهرت النتائج قدرة كبيرة للنوعين البريين على تحمل الجفاف و تأقلموا لأصناف القمح مع المناخ السائد في مناطق زراعة القمح. تم الحصول على 81 هجين مابين الأنواع وكان الهجناء الأكثر عددا هم *Aegilops geniculata*/Oued Zenati (54 بنسبة 23%, 5), *Aegilops triuncialis* /Oued Zenati

(18 بنسبة 88%, 3). في حين أن التهجينات بين النوعين البريين و الصنف *Hoggar* لم تنتج إلا عددا قليلا. الحصول على هجناء من غير اللجوء إلى تقنية إنقاذ الأجنة, تعد خاصية ذات أهمية بالنسبة لهذا الاتجاه من التهجين. إلا أنه تم تسجيل موت ومشاكل في النمو في عدة مراحل, مما أدى إلى عدم تشكيل نباتات هجينة بالغة. حساب عدد الصبغيات أظهر أن الهجين *Aegilops geniculata*/Oued Zenati يملك  $2n=24$  كروموزوما. 8 من بين 11 مؤشر (*SSR*), أظهرت تباينا جينيا, حيث أن *Xwms332* و *Xwms257* و *Xwms25* و *Xwms257* عن تكسر الكروموزوم 2BS و فقدان أجزاء مختلفة منه عند الهجينين *Aegilops geniculata*/Oued Zenati. هذه النتائج تظهر تفعيل الوراثة السيتوبلازمية للأم عند الهجناء وآليات العزل ما بعد التلقيح في هذا الاتجاه من التهجين, ما يفسر الموت والنمو غير الطبيعي للهجناء. إن إيجاد أفراد من مجموعات تنتمي لهذين النوعين البريين, تملك قابلية أكبر للتهجين, كفيل بإنجاح التهجين في هذا الاتجاه.

## الكلمات المفتاحية

*Aegilops*, القمح الصلب, الجفاف, التحسين الوراثي, التهجين مابين الأنواع, مؤشرات (*SSR*).

## Liste des abréviations

<b>AFLP :</b>	<i>Amplified fragment length polymorphism.</i>
<b>BET:</b>	Bromure d'ethidium.
<b>CTAB:</b>	Cetyl trimethylammonium bromide.
<b>CIMMYT:</b>	Centre international d'amélioration du maïs et du blé (l'acronyme vient du nom en Espagnol).
<b>HPM :</b>	Haut poids moléculaire.
<b>ICARDA:</b>	<i>International center for agricultural research in the dry areas.</i>
<b>ISSR :</b>	<i>Inter simple sequence repeats.</i>
<b>L :</b>	<i>Long arm (chromosome)</i>
<b>Lr :</b>	<i>Leaf rust.</i>
<b>LEA :</b>	<i>Late embryogenesis abundant proteins.</i>
<b>MAB :</b>	<i>Marker-assisted breeding.</i>
<b>MABC :</b>	<i>Marker-assisted back-crossing.</i>
<b>Pb :</b>	Paire de bases.
<b>PEG :</b>	<i>polyethylene glycol.</i>
<b>PCR :</b>	<i>Polymerisation chain reaction.</i>
<b>Pm:</b>	<i>Powdery mildew.</i>
<b>PMG :</b>	Poids de mille graines.
<b>QTL :</b>	<i>Quantitative trait loci.</i>
<b>RAPD :</b>	<i>Randomly amplified polymorphic DNA.</i>
<b>RFLP :</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism.</i>
<b>Rht :</b>	<i>Reduced height.</i>
<b>S :</b>	<i>Short arm (chromosome)</i>
<b>SNPs:</b>	<i>Single nucleotide polymorphism.</i>
<b>SSR:</b>	<i>Simple sequence repeats.</i>
<b>Sr:</b>	<i>Stem rust.</i>
<b>STB :</b>	<i>Septoria tritici blotch.</i>
<b>STS:</b>	<i>Sequence-tagged site.</i>
<b>TBE :</b>	Tris borate EDTA.
<b>UV :</b>	Ultra violet.

**X :** Cette lettre devant chaque amorce se réfère au locus du marqueur moléculaire de base dont la fonction est inconnue chez le blé.

**Yr :** *Yellow rust (Stripe rust).*

**Xbarc :** *Beltsville agriculture research science.*

**Xgwm :** *Gatersleben wheat microsatellite.*

**Xwmc :** *Wheat microsatellite consortium.*

**Xwms :** *Wheat microsatellite.*

<b>Index des figures</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 01 :</b> Photo d'un épi d' <i>Aegilops geniculata</i>	<b>8</b>
<b>Figure 02:</b> Photo représentant un épi d' <i>Aegilops triuncialis</i>	<b>9</b>
<b>Figure 03:</b> Histoire de l'obtention du blé dur et blé tendre (Saintenac, 2009)	<b>10</b>
<b>Figure 04 :</b> Courbe étalon du dosage des sucres solubles	<b>45</b>
<b>Figure05 :</b> Pollinisation des fleurs d'un épi d' <i>Ae.triuncialis</i> , préalablement castrées	<b>50</b>
<b>Figure 06 :</b> Effet du stress hydrique sur les paramètres physiologique :a- Teneur relative en eau ; b- Résistance stomatique ; c- Teneur de chlorophylle totale.	<b>66</b>
<b>Figure 07:</b> Influence du stress hydrique sur les paramètres biochimiques : a- Teneur en sucres solubles ; b-Activité peroxydase ; c- Activité catalase.	<b>70</b>
<b>Figure 08:</b> Dendrogrammes regroupement des génotypes étudiés par la distance carré de Pearson.	<b>73</b>
<b>Figure 09:</b> Photographies des caryopses hybrides récoltés en comparaisons avec ceux des parents.	<b>78</b>
<b>Figure 10:</b> Photographies d'embryons matures d' hybrides en germination sur milieu MS.	<b>79</b>
<b>Figure 11 :</b> Plantules hybrides régénérées.	<b>79</b>
<b>Figure 12 :</b> Photo d'une plaque métaphasique de l'hybride <i>Ae.gen/O.Z</i> sous microscope optique. Gx100	<b>82</b>
<b>Figure 13 :</b> Photo des profils électrophorétiques du locus <i>Xwmc 25</i> , sur gel d'agarose à 3%.	<b>87</b>
<b>Figure 14:</b> Photo des profils électrophoretiques du locus <i>Xwmc44</i> , sur gel d'agarose à 3%	<b>88</b>
<b>Figure15 :</b> Photo de l'amplification du locus <i>Xbarc 174</i> , en électrophorèse sur gel d'agarose à 3%	<b>90</b>
<b>Figure 16 :</b> Photo de l'amplification du marqueur <i>Xwmc 177</i> , par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%	<b>91</b>
<b>Figure 17 :</b> Photo de profils électrophorétiques du locus <i>Xwms 135</i> sur gel d'agarose à 3%	<b>92</b>
<b>Figure 18 :</b> Photo d'amplification du locus <i>Xwms257</i> , sur gel d'agarose à 3%	<b>93</b>

- Figure 19:** Dendrogramme de similarité entre parents et hybrides, établi par l'Indice de Jaccard des allèles des amorces *Xwmc25*, *Xwmc44*, *Xbarc174*, *Xwmc177*, *Xwms135* et *Xwms 257*. **94**
- Figure 20 :** Photo d'amplification du locus *Xwmc488*, sur gel de polyacrylamide à 10% **96**
- Figure 21:** Photo de profils électrophorétiques du marqueur *Xwms124*, sur gel polyacrylamide 10%. **97**
- Figure 22 :** Photo des profils électrophorétiques du locus *Xwms 332* sur gel de polyacrylamide à 10%. **98**
- Figure 23:** Photo de l'amplification du marqueur *Xwmc161*, sur gel de polyacrylamide 10% **100**
- Figure 24 :** Photo de l'amplification du marqueur *Xwms493* sur gel Polyacrylamide 10% **101**
- Figure 25 :** Dendrogramme de similarité entre parents et hybrides, établi par l'Indice de Jaccard des allèles des amorces *Xwmc 488*, *Xwms124*, *Xwms 332*, *Xwms161* et *Xwms 493*. **102**

<b>Index des tableaux</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 01:</b> Classification botanique et Génomique du genre <i>Aegilops</i> selon plusieurs Auteurs (Schneider et <i>al.</i> , 2008).	<b>5</b>
<b>Tableau 02:</b> Exemples de gènes de résistances majeurs, transférés dans les blés cultivés depuis les espèces sauvages (Schneider et <i>al.</i> , 2008).	<b>20</b>
<b>Tableau 03:</b> Quelques espèces d' <i>Aegilops</i> considérées comme sources potentielles de résistance aux stress abiotiques (Zaharieva, 1996).	<b>21</b>
<b>Tableau 04:</b> Caractéristiques principales des espèces <i>Aegilops</i> et des variétés de blé dur (ITGC, 1996 ; Van Slageren, 1994 ; Benbelkacem & Kellou, 2000).	<b>40</b>
<b>Tableau 05 :</b> Constitution du Milieu Murashige et Skoog (MS)(Anonyme, 1999)	<b>52</b>
<b>Tableau 06:</b> Liste des parents et des hybrides caractérisés par les marqueurs microsatellites	<b>55</b>
<b>Tableau 07 :</b> Liste des marqueurs microsatellites utilisés et leurs séquences.	<b>59</b>
<b>Tableau 08:</b> Composition du mélange de la réaction PCR au GBBV.	<b>60</b>
<b>Tableau 09 :</b> Les différents programmes PCR utilisés pour l'amplification des marqueurs microsatellites.	<b>61</b>
<b>Tableau 10:</b> Mélange réactionnel de PCR au CRBT	<b>62</b>
<b>Tableau 11:</b> Programmes PCR au niveau du CRBT avec les températures d'hybridation	<b>63</b>
<b>Tableau 12:</b> Moyennes des génotypes étudiés sous trois régimes hydriques, pour les paramètres physiologiques	<b>64</b>
<b>Tableau 13:</b> Moyennes des génotypes étudiés sous trois régimes hydriques, pour les paramètres biochimiques	<b>68</b>
<b>Tableau 14:</b> Matrice des corrélations linéaires des paramètres physiologiques et biochimiques	<b>72</b>
<b>Tableau 15 :</b> Tests d'analyses multivariées des cinq génotypes pour les paramètres mesurés	<b>72</b>
<b>Tableau 16:</b> Résultats des croisements de 5 années entre les espèces d' <i>Aegilops</i> et les variétés de blé dur.	<b>76</b>
<b>Tableau 17:</b> Résultats des croisements selon les combinaisons parentales	<b>78</b>
<b>Tableau 18 :</b> Germination et régénération de plantules hybrides par culture d'embryons matures.	<b>80</b>

## **Index des annexes**

**Annexe I :** Descriptives statistiques de l'étude de la tolérance à la sécheresse.

**Annexe II :** Résultats détaillés des paramètres de croisements par géniteurs et par année

**Annexe III :** Matrice de présence-absence des allèles répertoriés par les marqueurs SSR

(*Xwmc25, Xwmc44, Xbarc174, Xwmc177, Xwms135 et Xwms 257.*).

**Annexe IV :** Matrice de présence-absence des allèles répertoriés par les marqueurs SSR

(*Xwmc 488, Xwms124, Xwms 332, Xwms161 et Xwms 493.*).

# SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre Synthèse Bibliographique</b>	
<b>I - Au sein des Triticées</b>	<b>3</b>
1-La famille des <i>Poaceae</i>	3
2- La tribu des <i>Triticées</i>	3
3- Histoire évolutive des blés	9
4- Organisation des génomes	11
<b>II- Hybridations interspécifiques</b>	<b>13</b>
1-Notion d'hybridation	13
2- Obstacles liés à l'hybridation interspécifique	13
3- Hybridation entre les espèces du genre <i>Triticum</i> et <i>Aegilops</i> .	16
4- Outils de Biotechnologies pour contourner les problèmes d'hybridations interspécifiques	17
<b>III- Intérêt des <i>Aegilops</i> et Amélioration du blé</b>	<b>19</b>
1-Contribution des <i>Aegilops</i> dans l'amélioration du blé	19
2-Amélioration de la tolérance à la sécheresse	21
3-Travaux sur l'amélioration de la tolérance à la sécheresse	25
<b>IV- Les marqueurs moléculaires</b>	<b>30</b>
1- Les marqueurs Moléculaires ; définition	30
2 -Différents types de marqueurs	30
3-Application diverses des Microsatellites	34
4 -Sélection assistée par marqueurs MAS	37
5- MAS et la sécheresse	38
<b>Chapitre Matériels et méthodes</b>	
<b>I- Première partie : Caractérisation des géniteurs pour leur tolérance à stress hydrique</b>	<b>40</b>
1-Matériel végétal	40
2-Dispositif expérimental	42
3- Paramètres étudiés	42
3-1- Paramètres physiologiques	43
3-1-1- La teneur relative en eau TRE « % »	43
3-1-2 Mesure de la résistance stomatique (Rs « m2.s/mol ») :	43
3-1-3 Mesure de le teneur en chlorophylle totale (TCT « unités SPAD »)	43

3-2- Paramètres biochimiques	44
3-2-1- Dosage de la teneur en sucres solubles (TSS) « µg/100mg MF »)	44
3-2-2- Dosage de l'activité antioxydante de la peroxydase et de la catalase	45
4- Traitement et analyses statistiques des résultats	47
<b>II-Deuxième partie : Croisements interspécifiques et obtention d'hybrides</b>	<b>48</b>
1-Matériel Végétal	48
2- Conduite de l'essai	48
3-Traitements des résultats	50
<b>III- Troisième partie : Régénération d'hybrides <i>in-vitro</i> et étude Cytogénétique</b>	<b>51</b>
<b>III-1 Développement des hybrides et caractérisation morphologique</b>	<b>51</b>
1- Matériel végétal	51
2- Culture <i>in-vitro</i> des embryons matures	51
<b>III-2 Etude cytogénétique : Dénombrement chromosomique</b>	<b>53</b>
1-Matériel végétal	53
2- Etapes de préparation de plaques métaphasiques	53
<b>IV- Quatrième partie : Caractérisation des hybrides interspécifiques par les marqueurs SSR</b>	<b>55</b>
1-Matériel végétal	55
2- Extraction d'ADN génomique	56
3- Réaction PCR	58
3-1 Marqueurs microsatellites utilisés	58
3-2- Conduite des Réactions PCR	60
3-2-1 PCR au niveau du laboratoire GGBV	60
3-2-2 PCR au niveau du laboratoire du CRBT	62
<b>Chapitre Résultats et Discussions</b>	<b>64</b>
<b>I- Caractérisation des géniteurs pour leur tolérance à la sécheresse</b>	<b>64</b>
1-Paramètres physiologique	64
2- Les paramètres biochimiques	68
3-Recherche de corrélation entre les paramètres physiologiques et biochimique	71
4-Comparaison des comportements des génotypes face au stress hydrique	72
5-Discussion	74
6-Conclusion	74

<b>II- Croisements interspécifiques et obtention d'hybrides</b>	<b>75</b>
1- Affinité de croisement entre les parents	78
2- Récolte des hybrides	78
3-Discussion	79
4-Conclusion	79
<b>III-Régénération d'hybrides <i>in-vitro</i> et étude cytogénétique</b>	<b>80</b>
1-Développement des hybrides et caractérisation morphologique	80
2-Dénombrement chromosomique	82
3-Discussion	84
4-Conclusion	85
<b>IV- Caractérisation des hybrides interspécifiques</b>	<b>86</b>
<b>par les marqueurs SSR</b>	
1- Résultats de l'amplification des marqueurs SSR au GBBV	86
1-1 Locus <i>Xwmc 25</i>	86
1-2 Locus <i>Xwmc 44</i>	88
1-3 Locus <i>Xbarc 174</i>	89
1-4 Locus <i>Xwmc 177</i>	91
1-5 Locus <i>Xwms 135</i>	92
1-6 Locus <i>Xwms 257</i>	93
2-Résultats de l'amplification des marqueurs SSR au GBBV	95
2-1 Locus <i>Xwmc 488</i>	95
2-2 Locus <i>Xwms 124</i>	97
2-3 Locus <i>Xwms 332</i>	98
2-4 Locus <i>Xwmc161</i>	99
2-5 Locus <i>Xwms 493</i>	101
3-Discussion	103
4-Conclusion	104
<b>V-Discussion Générale</b>	<b>106</b>
<b>Conclusion Générale</b>	<b>111</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>113</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Publication</b>	

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**

## Introduction générale

---

Les céréales figurent parmi les plantes à l'origine de l'agriculture, étant parmi les premières à subir la domestication du fait de leur importance énergétique. Le blé représente 20 % des calories et des protéines de l'alimentation humaine (Saintenac, 2009). Dans le monde, le blé dur (*Triticum durum*) est cultivé sur environ 17 millions d'hectares. Le bassin méditerranéen est la plus grande zone de production et de consommation du blé, tout comme où elle est, aussi, la principale culture qui connaît en fin de cycle, les hautes températures et le déficit hydrique (Nazco et al., 2012). En Algérie, plusieurs plats traditionnels sont des sous produits du blé dur, qui revêt une importance nutritionnelle, sociale et économique (Attab & Brinis, 2012 ; Chahbar & Belkodja, 2016).

Une augmentation mondiale sur la demande du blé d'au moins 60% est attendue en 2050 pour nourrir plus de 9 milliards de personnes (Yu et al., 2017). De ce fait, il est nécessaire d'augmenter les rendements en maîtrisant les bases génétiques qui y sont liées et en améliorant l'adaptation des variétés de blés aux différentes contraintes biotiques et abiotiques dues aux changements climatiques que connaît notre planète (Nazco et al., 2012 ; Yu et al., 2017). Une diversité génétique adéquate est une première exigence pour tout programme d'amélioration génétique, l'avancement dans la sélection est directement relié à la variabilité génétique présente dans le pool de gènes et à la qualité des gènes parentaux impliqués dans les programmes (Dreisigacker et al., 2004 ; Jahier et al., 2006).

Le genre *Aegilops*, apparenté au genre *Triticum*, représente une importante source de gènes d'intérêt potentiel pour l'amélioration génétique du blé (Rolland et al., 2014). En effet, beaucoup d'espèces d'*Aegilops* sont adaptées à divers étages bioclimatiques, notamment aride et semi-aride, et présentent de ce fait, une tolérance à la sécheresse (Molnár et al., 2004 ; Dulai et al., 2006) et à la salinité (Colmer et al., 2006).

Des lignées d'addition ou de substitution ont été développées à partir d'hybrides interspécifiques entre les espèces de blé et d'*Aegilops* (Schneider et al., 2005), permettant ainsi l'introgession, avec succès, de beaucoup de gènes de résistance aux maladies depuis les espèces du genre *Aegilops* (Schneider et al., 2008).

## Introduction générale

---

Récemment, de tels lignées ont été créées afin d'introduire des gènes qui codent pour une utilisation efficace du phosphore par la plante (Wang et *al.*, 2010), des valeurs élevées en zinc et en fer des graines (Tiwari et *al.*, 2010; Neelam et *al.*, 2011), l'amélioration de la qualité des pâtes et la fabrication de pains (Wang et *al.*, 2013).

Malheureusement, les travaux dédiés à l'introgession de caractères de tolérance aux stress abiotiques depuis les espèces du genre *Aegilops* restent rares. De plus, l'élargissement de la variabilité génétique a été intensivement exploité pour le génome D. Néanmoins, les génomes A et B n'ont pas bénéficié d'une telle attention, mais suscitent un intérêt croissant des chercheurs (Mujeeb-Kazi et *al.*, 2013).

Les marqueurs moléculaires étudient la diversité directement au niveau de l'ADN. Le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Parmi eux, les marqueurs microsatellites (*SSRs*), se sont révélés, par leur nature co-dominante, de puissants outils pour la détection de polymorphisme, de lien de parenté ainsi que l'établissement de cartes génétiques (Dreisigacker et *al.*, 2004).

Ainsi la présente étude s'est fixée comme objectifs ; l'étude du potentiel d'hybridation entre les espèces du genre *Aegilops* et les variétés de blés durs et l'influence du sens de croisement sur l'obtention d'hybrides interspécifiques *Aegilops*/blé dur. Comme cette étude est une partie de programme d'amélioration de la tolérance à la sécheresse du blé, par les espèces sauvages du genre *Aegilops*, les géniteurs ont été aussi caractérisés pour leur tolérance au stress hydrique durant la période de croisements. Ainsi que la caractérisation des hybrides par des approches cytogénétique et moléculaire, en comparaison avec les parents.

**SYNTHESE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

# Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

---

## 1-La famille des *Poaceae*

La famille de *Poaceae* renferme les grandes céréales et la plupart de graines mineures, qui ont été à la base de l'alimentation de l'homme depuis leur domestication. Elle constitue un groupe botanique des monocotylédones, avec plus de 10000 espèces décrites, répertoriés taxonomiquement en 700 genres, unifiés en sous-tribus, tribus, super-tribus et sous-famille, reflétant ainsi une grande diversité génétique qui a permis à ce groupe de conquérir des habitats différents (Keller & Feuillet, 2000 ; Caetano-Anollés, 2005).

Les céréales ont tous en commun une structure florale et une inflorescence unique qui est l'épillet, qui semble être le résultat de plusieurs événements évolutifs. Ils se distinguent bien aussi par leur fruit caractéristique : le caryopse, unique dans les plantes à fleurs (Caetano-Anollés, 2005).

## 2- La tribu des *Triticées*

Les blés appartiennent à la tribu des *Triticées*, qui comporte environ 400 espèces réparties en une vingtaine de genres (nombre variable suivant les classifications) (Jahier et al., 2006). Les espèces de cette tribu sont répertoriées dans les régions tempérées des deux hémisphères de la planète. Celles du genre *Aegilops* et *Triticum* (notamment le blé) peuvent cohabiter dans les régions du moyen orient et la méditerranée étant les centres de diversification de ces espèces. Certaines espèces d'*Aegilops* poussent dans les champs de blés et sont considérées comme des mauvaises herbes (Van Slageren, 1994).

### 2-1 Position systématique des genres *Triticum* et *Aegilops*

Les classifications des genres *Triticum* et *Aegilops* ont été depuis longtemps très controversés entre scientifiques, qui pour certains, fusionnent le genre *Aegilops* avec celui *Triticum*. Alors que pour d'autres, ces genres sont séparés les uns des autres (tableau 01). La dernière révision de la classification des *Aegilops* semble la plus acceptée de nos jours dans la communauté scientifique est celle de Van Slageren (1994).

# Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

---

**Embranchement** Plantae

**Sous-embranchement** Angiospermes

**Classe** Monocotylédones

**Ordre** Glumiflorale

**Famille** : *Poaceae* Barnhart

**Sous-famille** : *Poideae*

**Tribu** : *Triticeae* Dumort

**Sous-tribu** *Triticinae* Griseb (Van Slagreen, 1994),

## 2-2 Le genre *Aegilops* : Description botanique

Les espèces du genre *Aegilops* sont des céréales annuelles qui poussent en touffes, les chaumes ne sont pas ramifiés, généralement courbés à la base puis montant et formant un port semi-dressé, possédant de un à cinq nœuds, la hauteur de la plante varie généralement de 10 à 60cm, cependant des hauteurs de 75 à 80 cm sont enregistrées pour *Ae.speltoides* et *Ae.cylindrica*.

Les glumes sont coriaces, arrondies en arrières, dentelées et/ou barbues (1 à 5). Les lemmas sont elliptiques, fins avec 1 à 3 dents et/ou de 1 à 3 barbes (Zaharieva & Monneveux, 2006). Les épillets sont sessiles, ou presque sessiles, et sont clairement, et le plus souvent, individuellement arrangés le long d'un axe. Le rachis de l'épi se terminant ou pas par un épillet apical.

Les espèces sauvages du genre *Aegilops* sont caractérisées, au cours de la maturation des graines, par la désagrégation de l'épi, le plus souvent, le long de sites d'abscission préformés laissant une cicatrice lisse de la fracture, résultant en des unités de dispersion selon trois modes : (a) tout l'épi, (b) des épillets ou des fleurs individualisés et (c) des segments de rachis spéculant de l'épi (Jahier et al., 2006 ; Scholz, 2007).

La dormance des graines permet aux espèces du genre *Aegilops* de survivre aux étés chauds, ainsi une importante réserve est conservée dans le sol, pouvant résister de 3 à 5 années, ceci permet aux espèces sauvages d'éviter les conditions non favorables et par la suite coloniser d'autres aires (Zaharieva & Monneveux, 2006).

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

**Tableau 01** : Classification botanique et Génomique du genre *Aegilops* selon plusieurs Auteurs (Schneider et al., 2008).

Génome	Van Slageren (1994)	Kimber & sears (1987)	Witcombe (1983)
T	<b>Genus <i>Amblyopyrum</i></b> (Jaub. & Spach) Eig* <i>Triticum tripsacoides</i> (Jaub. & Spach) Bowden var. muticum var. loliaceum (Jaub. & Spach)	<i>Ae. mutica</i> Boiss.	<b>Section <i>Amblyopyrum</i></b> (Jaub. & Spach) Zhuk  <i>Ae. mutica</i> Boiss.
S	<b>Section <i>Sitopsis</i></b> (Jaub. & Spach) Zhuk. <i>Ae. speltoides</i> Tausch var. speltoides var. ligustica (Savign.) Fiori	<i>Triticum speltoides</i> (Tausch) Gren. ex Richter	<b>Section <i>Sitopsis</i></b> (Jaub. & Spach) Zhuk.  <i>Ae. speltoides</i> Tausch  <i>Ae. ligustica</i> (Savign.)Coss.
S <sup>b</sup>	<i>Ae. bicornis</i> (Forssk.)Jaub. & Spach var. bicornis var. anathera Eig	<i>Triticum bicornis</i> Forssk.	<i>Ae. bicornis</i> (Forssk.) Jaub. & Spach
S <sup>l</sup>	<i>Ae. longissima</i> Schweinf. & Muschl.	<i>Triticum longissimum</i> (Schweinf.& Muschl.) Bowden	<i>Ae. longissima</i> Schweinf. & Muschl.
S <sup>s</sup>	<i>Ae. searsii</i> Feldman & Kislev ex Hammer	<i>Triticum searsii</i> (Feldman & Kislev) Feldman, comb. nov.	<i>Triticum searsii</i> Feldman & Kislev
S <sup>sh</sup>	<i>Ae. sharonensis</i> Eig		<i>Ae. sharonensis</i> Eig

\*Amblyopyrum est classé en un genre séparé uniquement par Van Slageren (1994).

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

**Tableau 01 :** Suite Classification botanique et Génomique du genre *Aegilops* selon plusieurs Auteurs (Schneider et *al.*, 2008).

Génome	Van Slageren (1994)	Kimber & sears (1987)	Witcombe (1983)
	<b>Section Vertebrata</b> Zhuk.emend. Kihara		<b>Section Vertebrata</b> Zhuk.
<b>D</b>	<i>Ae. tauschii</i> Coss.	<i>Triticum tauschii</i> (Coss.) Schmalh.	<i>Ae. squarrosa</i> L.
<b>DMU</b>	<i>Ae. juvenalis</i> (Thell) Eig	<i>Triticum juvenile</i> Thell.	<i>Ae. juvenalis</i> (Thell).Eig
<b>DMS</b>	<i>Ae. vavilovii</i> (Zhuk.)Chennav.	<i>Triticum syriacum</i> Bowden	<i>Ae. vavilovii</i> (Zhuk.)Chennav.
<b>DM/DDM</b>	<i>Ae. crassa</i> Boiss.	<i>Triticum crassum</i> (Boiss.) Aitch.& Hensl.	<i>Ae. crassa</i> Boiss.
<b>DN</b>	<i>Ae. ventricosa</i> Tausch	<i>Triticum ventricosum</i> Ces.	<i>Ae. ventricosa</i> Tausch
	<b>Section Cyliandropyrum</b> (Jaub. & Spach) Zhuk.		<b>Section Cyliandropyrum</b> (Jaub. & Spach) Zhuk.
<b>C</b>	<i>Ae. caudata</i> L.	<i>Triticum dichasians</i> (Zhuk.) Bowden	<i>Ae.caudata</i> L.
<b>CD</b>	<i>Ae. cylindrica</i> Host	<i>Triticum cylindricum</i> Ces.	<i>Ae.cylindrica</i> Host
	<b>Section Comopyrum</b> (Jaub. & Spach) Zhuk.		<b>Section Comopyrum</b> (Jaub. & Spach) Zhuk.
<b>M</b>	<i>Ae.comosa</i> Sm. in Sibth. & Sm. var.comosa var. subventricosa Boiss.	<i>Triticum comosum</i> (Sibth. & Sm.) Richter	<i>Ae. comosa</i> Sibth. & Sm.
<b>N</b>	<i>Ae. uniaristata</i> Vis.	<i>Triticum uniaristatum</i> (Vis.) Richter	<i>Ae. uniaristata</i> Vis.

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

**Tableau 01** : Suite Classification botanique et Génomique du genre *Aegilops* selon plusieurs Auteurs (Schneider et *al.*, 2008).

Génome	Van Slageren (1994)	Kimber & sears (1987)	Witcombe (1983)
	<b>Section Aegilops L.</b>		<b>Section Polyeides Zhuk.</b>
U	<i>Ae.umbellulata</i> Zhuk.	<i>Triticum umbellulatum</i> (Zhuk.) Bowden	<i>Ae.umbellulata</i> Zhuk.
UM	<i>Ae. columnaris</i> Zhuk.	<i>Triticum columnare</i> (Zhuk.) Morris & Sears	<i>Ae.columnaris</i> Zhuk.
UM	<i>Ae.biuncialis</i> Vis.	<i>Triticum macrochaetum</i> (Shuttl.& Huet) Richter	<i>Ae.lorentii</i> Hochst.
UM	<i>Ae. geniculata</i> Roth	<i>Triticum ovatum</i> (L.) Raspail	<i>Ae. ovata</i> L.
UM/UMN	<i>Ae.neglecta</i> Req. Ex Bertol.	<i>Triticum triaristatum</i> (Willd.) Godr. & Gren.	<i>Ae.triaristata</i> Willd.
UC	<i>Ae.triuncialis</i> L. var. <i>triuncialis</i> var. <i>persica</i> (Boiss.) Eig	<i>Triticum triunciale</i> (L.) Raspail	<i>Ae. triuncialis</i> L.
US	<i>Ae.kotschyi</i> Boiss.	<i>Triticum kotschyi</i> (Boiss.)Bowden	<i>Ae.kotschyi</i> Boiss.
US	<i>Ae. peregrina</i> (Hack. in J. Fraser) Marie & Weiller var. <i>peregrina</i> var. <i>brachyathera</i> (Boiss) Marie& Weiller	<i>Triticum kotschyi</i> (Boiss.) Bowden	<i>Ae. peregrina</i> Hackel) Maire et Weiller

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

---

Comme pour le blé, les espèces d'*Aegilops* ont été divisées, par Tanaka (1954) in (Zaharieva & Monneveux, 2006) en trois groupes selon leur besoin en vernalisation ; espèce d'hiver, de printemps, et des groupes intermédiaires.

### 2-2-1 *Aegilops geniculata* Roth.

C'est une espèce annuelle, autogame allotétraploïde ( $2n=4X=28$  MU). Les chaumes courbés à la base puis ascendant sont très remarquables pour cette espèce et pour son ancêtre *Ae.umbellulata*, pour lesquelles aussi, l'épi est presque ovoïde (fig.01) et constitue l'unité de dispersion (Zaharieva & monneveux, 2006).

Cette espèce a une grande distribution autour de la méditerranée, présentant ainsi une adaptation à des conditions climatiques très différentes (Bandou et *al.*, 2009). Ceci se traduit par une variabilité intra-spécifique pour les différents habitats (Perrino et *al.*, 1993 ; Zaharieva et *al.*, 1999 ; Zaharieva et *al.*, 2001 ; Bandou et *al.*, 2009).



**Figure 01** : Photo d'un épi d'*Aegilops geniculata*

### 2-2-2 *Aegilops triuncialis* L.

C'est une espèce annuelle d'hiver, l'épi a une forme presque cylindrique, avec des glumes épais et inflexible enveloppant des épillets matures (fig.02). Cette inflorescence est généralement dispersée en une seule unité, quoique les épillets restent intacts mêmes séparés des épis. Le plus souvent chaque épillet, contient deux graines dont l'une est 2,5 plus grande que la deuxième. Les glumes et la grande graine, tout deux, peuvent empêcher la germination de la petite graine, ce qui permet la persistance d'une fraction de semences dans le sol (Marty et *al.*, 2015).

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

---

Cette espèce est considérée comme une plante adventice en Belgique, Allemagne et en Suisse (Van Slageren, 1994). Aux Etats Unis, c'est une espèce invasive des cultures de blés et menace la diversité des céréales autochtones (Marty et *al.*, 2015).



**Figure 02:** Photo représentant un épi d'*Aegilops triuncialis*

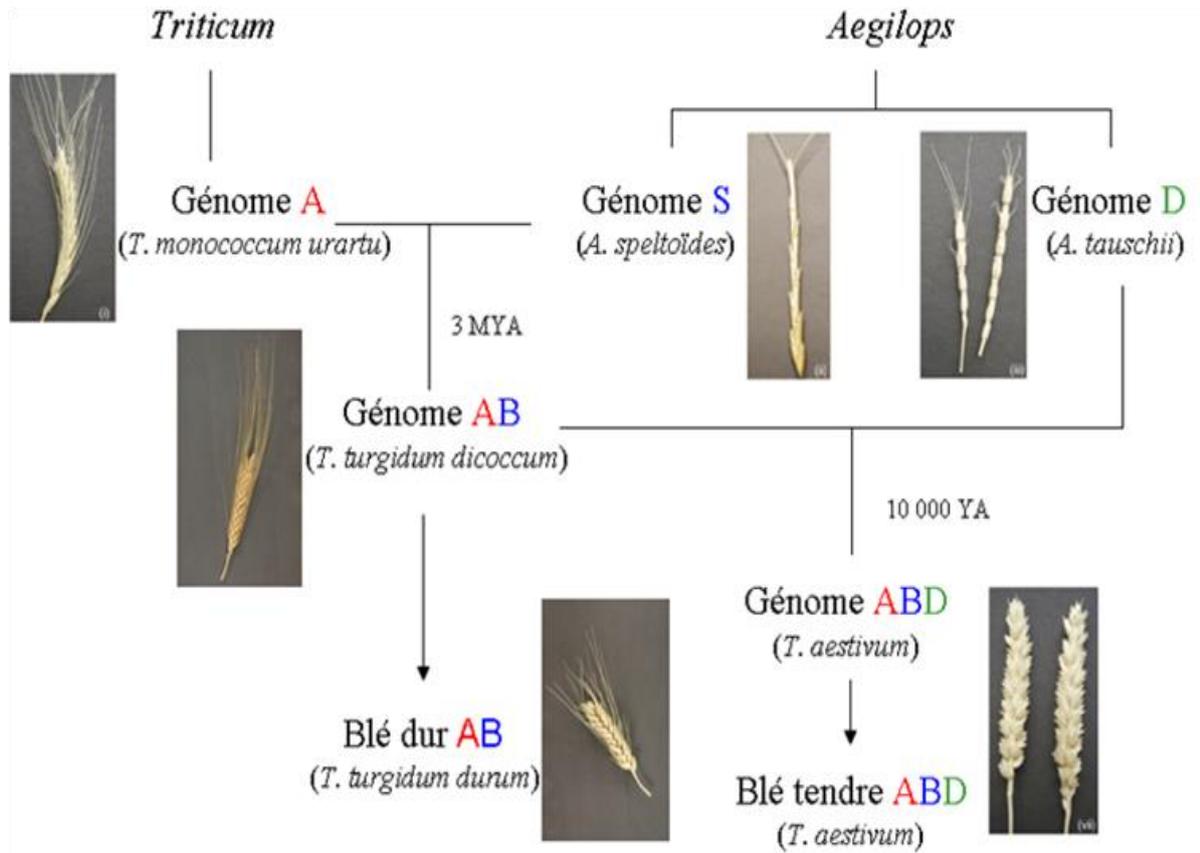
### 3- Histoire évolutive des blés

De nos jours, les blés cultivés sont essentiellement le blé dur tétraploïde ou blé à macaroni ( $2n=4x=28$ , AABB) et blé tendre hexaploïde ( $2n=6x=42$ , AABBDD) très utilisé en panification. Le blé diploïde engrain ou petit épeautre ( $2n=2x=14$ ) n'est cependant cultivé que sur des aires réduits.

La première étape dans l'évolution des blés était la formation de *Triticum turgidum* L. ssp. *dicoccoides* Körn. ex Asch. & Graebn, une espèce tétraploïde avec un génome AABB par l'hybridation de *Triticum urartu* ( $2n = 14$ , AA) et une autre espèce diploïde proche d'*Aegilops speltaoides* Tausch. ( $2n=2x=14$ , BB), il y a au moins 500 000ans (fig.03). Des événements de non-réduction des gamètes mâle et femelle ou un dédoublement de chromosome spontané ont contribué à l'obtention de tels hybrides, d'où le nom de amphiploïdie, le terme qui désigne une hybridation interspécifique suivi de doublement de chromosomes.

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

La domestication et la sélection au sein de cette espèce a fait ressortir le blé dur. 10 000 ans plus tard, *Triticum turgidum* s'est croisé avec *Aegilops tauschii* Coss. (syn. *Ae. squarrosa*) ( $2n=2x=14$ , DD), donnant naissance aux blés hexaploïdes (Jahier et al., 2006 ; Schneider et al., 2008).



**Figure 03** : Histoire de l'obtention des blés cultivés (Saintenac, 2009).

Si le donneur du génome A et D sont bien définis, celui du génome B reste controversé, quoiqu'appartenant à la section *Sitopsis* (Génome S), plusieurs raisons peuvent être à l'origine de cette confusion :

- La première est que l'espèce donatrice d'origine n'existe plus ;
- Le génome B n'a pas une seule origine, il serait issu de deux sources ou plus ;
- La structure génomique de l'espèce donatrice a subi des changements majeurs (Schneider et al., 2008)

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

---

Beaucoup d'investigations ont conclu que le génome S d'*Ae. speltoides* Tausch. montre de très grandes ressemblances avec le génome B des blés cultivés et qu'il est le donneur de ce génome (Fernandez-Calvin & Orellana, 1990 ; Bálint et al., 2001).

La domestication des espèces de blés par l'homme s'est réalisée dans la zone du croissant fertile, qui correspond au centre de répartition géographique des ancêtres sauvages. Cette domestication a conduit à deux grandes différences majeures des espèces sauvages (revoir description botanique du genre *Aegilops* plus haut) ; la fragmentation des épis à maturité qui aurait sans doute occasionné des pertes de rendements pour les premiers cultivateurs de blés ; et grain vêtu qui constitue une sorte de protection et de persistance des graines dans le sol. Ainsi la sélection a abouti à des blés à graine nue ayant des épis non cassant, augmentant la récolte des blés (Jahier et al., 2006).

### 4- Organisation des génomes

Les espèces du genre *Aegilops* et *Triticum* font partie d'un complexe d'espèces cultivées et sauvages dont les allopolyploïdes ont évolué par spéciation (Jahier et al., 2006 ; Zaharieva & Monneveux, 2006).

Dans le genre *Triticum*, trois différents génomes existent (A, B et D) dont chacun contient sept chromosomes ( $n=7$ ). Les paires de chromosomes du même génome ayant les allèles du même gène sont appelés homologues, alors que ceux de différents génomes, par exemple 1A, 1B et 1D sont nommés homéologues (Waines & Hegde, 2003 ; Zaharieva & Monneveux, 2006). Ceci a aussi été observé pour les *Aegilops* par des investigations cytologiques de (Kiraha, 1937 & Sears, 1941 in : Zaharieva & Monneveux, 2006). Ces études ont permis de classer les *Aegilops* en trois niveaux de ploïdie, diploïde ( $2n=2x=14$ ), tétraploïde ( $2n=4x=28$ ) et hexaploïde ( $2n=6x=42$ ) (Zaharieva & Monneveux, 2006), ainsi il existe 22 espèces dont 11 espèces diploïdes, 10 tétraploïdes et 2 hexaploïdes (Van Slageren, 1994). Les formules génomiques sont très diverses comprenant les génomes D, S, U, C, N et M (Schneider et al., 2008). L'espèce *Ae. neglecta* existe en forme tétraploïde (UM) et hexaploïde (UMN) (Zaharieva & Monneveux, 2006).

## Synthèse bibliographique : I- Au sein des Triticées

---

Selon leurs génomes, les espèces polyploïdes du genre *Aegilops* et *Triticum* ont été divisées en trois groupes, ceux possédant en commun un génome 'pivot' (A, U ou D) qui a été très conservé au cours de l'allopolyploïdisation et la spéciation, alors que le deuxième génome (ou le troisième) (M, N, C et S) a subi des modifications au cours du processus de la spéciation ainsi, les polyploïdes du groupes A ont en commun le génome de *Ae.urartu* , ceux du groupe D celui de *Ae.tauschii* et ceux du groupe U celui de *Ae.umbellulata*.

En dehors des polyploïdizations et les duplications, les différences de taille des génomes entre les espèces de la tribu des *Triticées* sont dues aux séquences non codantes et répétées de l'ADN. Ces différences résultent le plus souvent de mécanisme mutationnelle d'addition et de délétion d'acide nucléiques, à l'instar de l'activité d'éléments transposables, insertions et délétions spontanées et les réarrangements chromosomiques (Caetano-Anollés, 2005).

# Synthèse bibliographique : II-Hybridations Interspécifiques

---

## 1-Notions sur l'hybridation et l'introgession

Pris dans un sens large, l'hybride est la progéniture d'individus issus de populations se distinguant par un ou plusieurs caractères héréditaires (Harrison, 1990).

Le terme hybride peut définir, dans un sens strict, des organismes issus d'une fertilisation croisée entre individus appartenant à des espèces différentes. Comme il existe plusieurs concepts pour la définition de l'espèce dont le plus admis est celui biologique, ainsi pour celle de l'hybridation interspécifique il est nécessaire d'adapter ce concept biologique à « des populations génétiquement isolées » plutôt que « reproductivement isolées ».

L'introgession peut être définie par l'échange de gènes entre individus de populations génétiquement différentes (Rieseberg & Carney, 1998) ou encore, par une intégration stable de matériel génétique d'une espèce dans une autre espèce par des rétrocroisements répétés (Baack *et al.*, 2007).

## 2- Obstacles liés à l'hybridation interspécifique

La réalisation d'hybrides interspécifiques soulève très souvent des difficultés nombreuses qui se situent généralement au niveau de la réalisation d'un zygote hybride, de la construction morphogénétique du végétal hybride, de la fertilité de l'hybride (Demol, 2002). Les barrières pré et post-zygotiques, sont des mécanismes qui empêchent le flux génique entre des individus qui peuvent potentiellement se rencontrer.

### 2-1 Les barrières pré-zygotiques

Les croisements entre espèces différentes se heurtent souvent à des barrières complexes de biologie florale, de compétition pollinique, d'incompatibilité, de non-fécondation (Demol, 2002)

### 2-2 Les barrières post-zygotiques

Ces mécanismes ont été étudiés dans le but de mieux comprendre la spéciation, ils s'installent après une fécondation réussie dans des croisements intra ou interspécifiques. Les plus communes sont : la non-viabilité des hybrides ou leur faiblesse ; la stérilité des hybrides ; et la dégénérescence des hybrides pour laquelle, les hybrides F1 sont robustes et fertiles, mais les générations suivantes sont caractérisées par une faiblesse ou une non-viabilité.

## Synthèse bibliographique : II-Hybridations Interspécifiques

---

Lorsqu'une graine hybride est obtenue, on observe souvent des défauts de développement. Toute une série de difficultés se rencontrent au niveau du développement morphogénétique. La cohabitation dans une même plante de deux génomes non homologues peut déterminer un certain nombre de désordres de nature physiologique pouvant aboutir à des anomalies au niveau de la différenciation et de la morphogénèse (Demol, 2002). Parfois des différences d'expression de ces mécanismes peuvent être constatées dans les générations hybrides.

Il a été démontré que la stérilité et la létalité des hybrides sont dues à des réarrangements chromosomiques, majoritairement des translocations (Rieseberg & Carney, 1998 ; Tikhenko et *al.*, 2008). Les génomes des espèces sont préférentiellement perméables face à l'introgession, où certaines parties du génome sont accessibles pour une incorporation de l'ADN étranger, alors que d'autres régions limitent ce transfert par limitation des recombinaisons dans ces régions (Baack & Rieseberg, 2007).

De fortes interactions géniques exerçant des épistasies négatives peuvent aussi être à l'origine de barrières postzygotiques. Beaucoup d'investigations essaient d'expliquer les mécanismes d'action de tels gènes. Dans la tribu des *Triticeae*, (Sears, 1940 in : Tikhenko et *al.*, 2008) a été le premier à mettre en évidence, dans les croisements *Triticum monococcum*/*Ae.umbellulata*, deux allèles létaux provenant de *Triticum monococcum*.

La mort des hybrides au stade plantule a été très bien étudiée chez le genre *Nicotiana*, le processus ressemble à une mort cellulaire programmée ou apoptose, des gènes causant la mort chez les hybrides, ont été caractérisés sur un chromosome d'un des deux parents.

Pour les céréales, trois causes ont été émises, pouvant limiter la viabilité et la fertilité des hybrides, la stérilité hybride, la mort des embryons viables faute de développement de l'endosperme et l'élimination sélective de sets de chromosomes parentaux. Chez le seigle le gène *Eml* est responsable de la non formation des pousses apicales méristématiques, des hybrides dans les croisements impliquant le blé tendre.

## Synthèse bibliographique : II-Hybridations Interspécifiques

---

Quant à la stérilité des hybrides, on observe que c'est au niveau de la méiose que de nombreux problèmes peuvent se poser. En effet, pour qu'un individu hybride F1 puisse atteindre un certain niveau de fertilité, il faut que les chromosomes parentaux puissent s'apparier et que les structures des gènes soient compatibles.

Pour que l'hybridation puisse réussir, les parents croisés doivent avoir une affinité génétique et plus spécialement une bonne similitude des arrangements génétiques. Lorsque les stocks chromosomiques en jeu n'ont ni nombre de bases identiques, ni homologies rémanentes suffisantes, la méiose de l'hybride se caractérise par une asyndèse totale. Parfois, des espèces possédant des stocks chromosomiques très proches, sont croisées entre elles en espérant une bonne fertilité de l'hybride. Or, ces hybrides se révèlent complètement stériles, simplement par la présence de petits remaniements qui intéressent de petits segments chromosomiques indécélables à l'examen de la métaphase méiotique (*cryptic structural differentiation*) (Demol, 2002).

### **2-3 Compatibilité des génomes d'une cellule végétale**

Pour assurer ses fonctions vitales, une cellule végétale, élabore un réseau de communication entre le noyau et les organites du cytoplasme via des protéines et mARN, des gènes codés par le noyau et les différents génomes cytoplasmiques gouvernent ces interactions nucléaires- cytoplasmiques (*NCI*). Au cours de la spéciation, des combinaisons spécifiques ont été sélectionnées pour optimiser la fitness d'une espèce.

Quand la comptabilité est compromise dans les croisements interspécifiques, les résultats peuvent être dramatiques.

Le rôle du cytoplasme dans le défaut du fonctionnement de l'hybride n'est pas négligeable. C'est la raison pour laquelle le sens de croisement joue souvent un très grand rôle dans le succès de telles hybridations (Demol, 2002).

### 3- Hybridation entre les espèces du genre *Triticum* et *Aegilops*

L'hybridation interspécifique entre les espèces de la tribu des *Triticées* est très courante sous conditions naturelle ou artificielle (Redinbaugh et al., 2000).

Chez le blé, le gène *ph1 Pairing homeologous1* exerce un control préméiotique stricte qui assure l'alignement et l'appariement des chromosomes homologues uniquement, inhibant ainsi ceux homéologues, des bivalents sont donc formés au cours de la méiose induisant chez le blé un comportement de type allopolyploïde avec une hérédité disomique. Ce gène a été localisé sur le bras long du chromosome 5B à environ 1 cM du centromère, il agit comme étant un gène dominant, dont l'action de supprimer les appariements homéologues a été observée chez des hybrides entre blés et d'autres espèces apparentées, limitant ainsi les croisements interspécifiques.

Si le gène *Ph1* est supprimé, les chromosomes homéologues peuvent s'apparier résultant en un ou plusieurs multivalents selon des fréquences relativement fortes. De ce fait, il est nécessaire de supprimer son action pour un appariement homéologue, mais cela ne garantie pas la formation de synapses et une recombinaison qui sont plutôt liées au degré de divergence des chromosomes homéologues, ainsi plus ces derniers sont divergents plus rares ou inexistantes sont les recombinaisons. Ceci peut être un véritable obstacle pour le transfert de gènes depuis les espèces sauvages porteuses de gènes d'intérêt à l'amélioration du blé, car ce transfert nécessite des évènements de recombinaison méiotique entre les chromosomes du blé et ceux de l'espèce apparentée.

Chez le blé tendre, à coté du système génétique *Ph1*, un autre système génétique existe, nommé *Kr* est impliqué dans sa croissabilité avec le seigle (Waines & Hegde, 2003 ; Jahier et al., 2006).

L'élimination de l'action du gène *Ph1* a été observée pour certains hybrides interspécifiques entre blé et quelques espèces diploïdes du genre *Aegilops*, des données sur des séries multi- alléliques existent sur la suppression préférentielle de ce gène dans la plupart des espèces diploïdes, mais l'information manque sur la possibilité que les espèces polyploïdes du genre *Aegilops* puissent posséder un tel mécanisme (Waines & Hegde, 2003).

### **4- Outils de Biotechnologies pour contourner les problèmes d'hybridation interspécifiques**

Il est aujourd'hui possible, en surmontant les obstacles liés à l'hybridation interspécifique, de croiser le blé avec la plupart des espèces et d'exploiter les hybrides produits pour introduire une nouvelle variabilité génétique.

#### **4-1 La culture *in-vitro***

Le développement et la maîtrise des techniques de culture *in-vitro*, a facilité les hybridations interspécifiques (El Jaafari et *al.*, 2001), permettant la création et l'ajout de variabilité génétique.

##### **a- Culture d'embryons immatures**

Sauver les embryons immatures qui dans les conditions naturelles auraient avorté en raison d'incompatibilités génétiques, permet d'élargir les choix et les possibilités de croisements interspécifiques (El Jaafari et *al.*, 2001). La culture est le plus souvent pratiquée entre 12 à 16 jours après fécondation, pour les croisements impliquant le blé avec les espèces sauvages (Jauhar & Peterson, 1996).

##### **b- Culture d'embryons matures**

La faute de germination des graines hybrides dues à des anomalies de l'endosperme peut être contournée par la culture *in vitro* (Anjum et *al.*, 2011). Ainsi, la culture d'embryons matures sur un milieu de culture adéquat, aux exigences nutritionnelles des embryons permettra la germination et le développement de plantes hybrides.

#### **4-2 Le doublement chromosomique et la cytogénétique**

La découverte de la colchicine en 1936 a permis la manipulation des génomes, au début, elle concernait le doublement du nombre chromosomique d'une espèce diploïde impliquant ainsi, l'amélioration de certains caractères. La maîtrise de cette technique a permis la création de nouvelles espèces (triticale) ou la production d'espèces allopolyploïdes (colza) par hybridation interspécifique suivie du doublement chromosomique (Gallais, 2002). Elle permet de contourner la stérilité des hybrides interspécifiques par le dédoublement du stock chromosomique, donnant des lignées diploïdes, fertiles et parfaitement homozygotes.

## Synthèse bibliographique : II-Hybridations Interspécifiques

---

De plus, la production d'un individu homozygote en une seule étape permet un gain de temps appréciable pour la sélection (Picard et *al.*, 1994 ; Cherkaoui et *al.*, 2001).

L'hybridation interspécifique est appelée à profiter davantage du développement des connaissances en cytologie moléculaire. La méthode des bandes (chromosome banding), l'hybridation in situ, permettent de mieux comprendre et ainsi résoudre au niveau cellulaire le comportement des chromosomes lors de la méiose chez les hybrides et l'incidence sur la fertilité. Ainsi que de suivre l'incorporation d'un chromosome étranger chez l'espèce cultivée menant à l'élucidation des relations d'homologie ou homéologie entre les génomes et leurs conséquences sur l'hybridation (El Jaafari et *al.*, 2001).

# Synthèse bibliographique : III- Intérêt des *Aegilops* et Amélioration du blé

---

## 1-Contribution des *Aegilops* dans l'amélioration du blé

Quelques espèces du genre *Aegilops* appartiennent au deuxième pool génétique du blé, pour certains au moins l'un de leur génome est homologue à celui des génomes du blé cultivés, ce qui permet la transmission de caractères favorables chez le blé, en utilisant les moyens conventionnels de croisements et les méthodes de recombinaisons normales (Schneider et *al.*, 2008 ; Mujeeb-Kazi et *al.*, 2013). De ce fait, ces espèces sont une véritable source de gènes d'intérêt pour l'amélioration du blé.

Beaucoup de gènes de résistances aux maladies ont été introduits dans le blé à partir des espèces sauvages du genre *Aegilops* (Molnar et *al.*, 2004), le gène *Sr32* introduit chez le blé et conduisant à une résistance à la rouille de tige (McIntosh 1991), le gène *Lr35* pour la résistance à la rouille des feuilles (Kerber & Dyck 1990) et *Pm13* pour la résistance à l'oïdium (Ceoloni et *al.* 1992) (tableau 02). Certaines accessions d'*Ae.biuncialis* sont résistantes au luteovirus de nanisme jaune (Makkouk et *al.*, 1994).

Les espèces d'*Aegilops* poussant dans les régions arides et semi-arides notamment *Aegilops geniculata*, sont un réservoir potentiel de gènes de tolérance à la sécheresse pour l'amélioration du blé (Baalbaki et *al.*, 2006). L'étude de Molnar et *al.*, 2004 a montré que quelques accessions d' *Ae.biuncialis* sont tolérantes à la sécheresse, alors que d'autres ont une bonne résistance aux gels (Masoomi-Aladizgeh et *al.*, 2015) (tableau 03).

Dans d'autres études, Rodriguez-Quijano et *al.*, (2000) ont détecté de nouveaux allèles de sous-unités de gluténines HPM intéressant pour l'amélioration de la qualité des blés, chez *Ae.umbellulata* Zhuk., *Aegilops comosa* Sibth. & Sm. et *Ae.caudata* (syn *Ae. markgrafii* Greuter L.), donneurs des génomes U, M et C respectivement. Ainsi, le développement d'hybrides interspécifiques entre le blé et les espèces d'*Aegilops*, a permis l'amélioration de la qualité boulangère et celle des pâtes des blés (Wang et *al.*, 2013). L'introduction de quelques chromosomes U et M d'*Ae.geniculata* et *Ae.biuncialis* a augmenté la teneur en protéines de réserves des graines de blés et a amélioré la qualité diététique de la farine (Rakszegi et *al.*, 2017).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

**Tableau 02:** Exemples de gènes de résistances majeurs, transférés dans les blés cultivés depuis les espèces sauvages (Schneider et *al.*, 2008).

Maladie	Espèce donneuse	Gènes de résistance	Références
Rouille des feuilles ( <i>Puccinia recondita</i> )	<i>Ae.umbellulata</i>	<i>Lr9</i>	Sears (1956) Athwal & Kimber (1972)
	<i>Ae.geniculata</i>	Plusieurs gènes <i>Lr57</i>	Dhaliwal et <i>al.</i> , 2002 Kuraparthi et <i>al.</i> , 2007
	<i>Ae.triuncialis</i>	<i>LrTr</i>	Aghae-Sarbarzeh et <i>al.</i> , 2002
Rouille des tiges ( <i>Puccinia graminis</i> )	<i>Ae.speltoides</i>	<i>Sr32, Sr39</i>	McIntosh, 1988 Kerber & Dyck, 1990
	<i>Ae.comosa</i>	<i>Sr34</i>	McIntosh et <i>al.</i> , 1982
	<i>Ae.ventricosa</i>	<i>Sr38</i>	Bariana & McIntosh, 1993 ; Seah et <i>al.</i> , 2001
	<i>Ae.tauschii</i>	<i>Sr33</i>	Kerber & Dyck, 1979
Rouille striée ( <i>Puccinia striiformis</i> )	<i>Ae.comosa</i>	<i>Yr8</i>	McIntosh, 1988
	<i>Ae.ventricosa</i>	<i>Yr17</i>	Bariana & McIntosh, 1993
	<i>Ae.geniculata</i>	<i>Yr40</i>	Kuraparthi et <i>al.</i> , 2007
	<i>Ae.tauschii</i>	<i>Yr28</i>	McIntosh, 1988
Oidium ( <i>Erysiphe graminis</i> )	<i>Ae.speltoides</i>	<i>Pm12</i>	Miller et <i>al.</i> , 1987; Jia et <i>al.</i> , 1996
		<i>Pm32</i>	Hsam et <i>al.</i> , 2003
	<i>Ae.longissima</i>	<i>Pm13</i>	Ceolini et <i>al.</i> , 1988 ; Ceolini et <i>al.</i> ,1992 ; Cenci et <i>al.</i> , 1999 ; Donini et <i>al.</i> , 1995.
	<i>Ae.geniculata</i>	<i>Pm29</i>	Zeller et <i>al.</i> , 2002 ; Stoilova & Spetsov, 2006

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des *Aegilops* et Amélioration du blé

**Tableau 03** : Quelques espèces d'*Aegilops* considérées comme sources potentielles de résistance aux stress abiotiques (Zaharieva, 1996).

Stress abiotiques	Espèce	Références
<b>Froid</b>	<i>Ae. tauschii</i>	Barashkova, 1981
	<i>A. umbellulata</i>	Limin & fowler, 1981
	<i>Ae. neglecta</i>	Barashkova & vavilov, 1991
	<i>Ae. cylindrica</i>	
	<i>Ae. triuncialis</i>	
<b>Déficit hydrique</b>	<i>Ae. tauschii</i>	Mayoral et al., 1981
	<i>Ae. sharonensis</i>	Shimshi et al., 1993
	<i>Ae. longissima</i>	Rekika et al., 1995
	<i>Ae. geniculata</i>	
	<i>Ae. triuncialis</i>	
<b>Froid</b>	<i>Ae. tauschii</i>	Barashkova, 1981
	<i>Ae. umbellulata</i>	Limin & fowler, 1981
	<i>Ae. cylindrica</i>	Barashkova & vavilov, 1991
	<i>Ae. neglata</i>	
	<i>Ae. triuncialis</i>	

### 2-Amélioration de la tolérance à la sécheresse

#### 2-1-Notion de stress

La plante, dans son environnement, fait constamment face à divers stress ou contraintes biotiques et abiotiques. Si certains sont faciles à déterminer et contrôlables, d'autres le sont moins et peuvent interagir ensemble et aggraver de plus les conséquences sur la croissance de la plante.

#### a-Stress biotiques

Ces stress englobent les maladies causées par les micro-organismes tels que champignons, bactéries, virus. Les néfastes causés par des ravageurs tels que les insectes, les vers, les chenilles, les araignées etc...(Makkouk et al., 1994). Plusieurs auteurs ont décrits que tels maladies provoquaient d'autres types de stress tels que les stress oxydatifs (Cruz de Carvalho, 2008).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

### **b-Stress abiotiques**

Ces stress traduisent les conditions environnementales, selon leur nature (Monneveux & This, 1997) les ont classés en :

- **Stress ioniques** liés aux concentrations des éléments minéraux du sol, que ce soit en carence ou en excès.
- **Stress hydrique** englobant le stress osmotique rapporté à l'humidité relative du sol, et le stress évaporatoire qui évoque celle de l'air.
- **Stress thermique** émanant des hautes températures ou au contraire de celles basses qui causent ou non des gels.
- **Stress oxydatif**

Dans les conditions normales, le métabolisme cellulaire produit de faibles quantités d'espèces réactives à l'oxygène (*ROS*) qui résultent du métabolisme normale de l'oxygène (Anjum et *al.*, 2011). L'oxygène singulet  $^1O_2$  et le radical hydroxyl  $OH$  sont produits à des valeurs minimales contrairement au superoxyde  $O_2^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  produits en grandes quantités (Cruz de Carvalho, 2008). Les organes responsables de la génération des *ROS* sont les chloroplastes, les peroxysomes et à des valeurs moindre les mitochondries (Cruz de Carvalho, 2008), donc liés principalement aux processus de la photosynthèse, de la respiration et de la photorespiration, mais ils peuvent être directement produits par certaines enzymes (oxydases). Différents facteurs externes sont susceptibles d'induire une grande production de *ROS* notamment le déficit hydrique, les basses températures, les herbicides et certaines maladies, entraînant un stress oxydatif qui est défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules (Hogg, & Kalyanaraman, 1999 ; Chaves et *al.*, 2003).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

### **2-2 Notion de sécheresse**

Les différents stress abiotiques cités en haut, peuvent agir séparément ou en complicité, de ce fait la sécheresse se définit comme étant une interaction de stress hydriques et thermiques (Ali Dib & Monneveux, 1992 ; Monneveux & This, 1997 ; Anjum *et al.*, 2011). Elle sévit dans les régions arides et semi-arides là où les pluies sont rares ou irrégulières et les températures souvent élevées (Monneveux & Nemmar, 1986).

Les stress hydriques étant les plus importants du fait de l'intervention de l'eau dans de nombreux processus vitaux de la plante, de leur intensité découlent différents types de stress hydriques, et par conséquent de sécheresses (Monneveux & This, 1997) variant selon les années et les régions (Ali Dib & Monneveux, 1992). En effet, dans les régions où la sécheresse sévit, l'intensité du stress hydrique du sol est variable selon les types de pluies et les caractéristiques du sol (Belhassen *et al.*, 1995).

### **2-3-Mécanisme de tolérance**

Pour faire face au stress, différentes stratégies d'adaptation sont mises en œuvre par les plantes dont l'esquive, l'évitement ou la tolérance (Levitt, 1980). La tolérance à la sécheresse est définie par la stabilité du rendement dans un environnement défini (Serraj *et al.*, 2005). Les changements adaptatifs d'une plante face au déficit hydrique sont le résultat de plusieurs composantes (Serraj *et al.*, 2009).

Du fait que la réponse de la plante au stress hydrique affecte beaucoup de paramètres physiologiques et biochimiques intimement liées à la croissance (ajustement osmotique, le taux des pigments et l'activité photosynthétique), elle se répercute, ainsi directement, sur le rendement ou sur ses composantes (Anjum *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2014) selon des degrés très variables dépendant du moment, de la durée et de la sévérité de la sécheresse (Serraj *et al.*, 2009).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

### 2-3-1-Paramètres physiologiques

Les paramètres morfo-physiologiques d'adaptation permettent de rendre compte des phénomènes de tolérance (liés à la réduction des pertes en eau, à la régulation des quantités d'eau absorbées, et à l'ajustement osmotique réalisé par l'accumulation de composés organiques et minéraux), et des phénomènes de résistance (aptitude à maintenir l'intégrité des structures et des fonctions). Au cours de ces dernières années, l'accent a, en particulier, été mis par différents auteurs sur les effets du déficit hydrique sur la photosynthèse (Ali Dib et *al.*, 1992).

#### 2-3-1-1 Etat hydrique de la plante

La diminution du potentiel hydrique du sol en conditions de sécheresse provoque une perte importante de la turgescence au niveau de la plante (Henchi, 1987). L'augmentation de la production, dans ces conditions, dépend des mécanismes de tolérance qui assurent l'hydratation cellulaire et diminuent la perte en eau, en maintenant un statut hydrique favorable au développement foliaire. Le maintien d'un potentiel hydrique élevé est lié à l'aptitude à extraire l'eau du sol et à la capacité à limiter les pertes d'eau par transpiration (Slama et *al.*, 2005, Anjum et *al.*, 2011).

#### 2-3-1-2- Régulation des mouvements stomatiques

Les variations de facteurs environnementaux entraînent la fermeture ou l'ouverture des stomates afin d'optimiser les échanges gazeux, ce qui se révèle déterminant pour les capacités d'adaptation des plantes. En effet, la conductance stomatique régule l'entrée de CO<sub>2</sub> et les pertes en eau au niveau des feuilles. L'ouverture des stomates est provoquée par la force motrice liée à l'augmentation du volume des cellules de garde et la pression de turgescence causée par une entrée d'eau dans l'apoplasme. Ces flux d'eau accompagnent l'accumulation d'ions K<sup>+</sup> provoquée par une hyperpolarisation de la membrane, suite à l'activation d'une pompe à proton (Outlaw et *al.*, 1979). L'ouverture stomatique est ensuite maintenue par l'accumulation de sucres. La fermeture des stomates résulte d'un processus inverse, impliquant en plus le calcium (Ca<sup>2+</sup>) dont la stimulation de son absorption est influencée par l'acide abscissique (ABA) ou une hausse de concentration en CO<sub>2</sub> (Anjum et *al.*, 2011).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

### 2-3-2 Ajustement osmotique

Le stress hydrique provoque la mise en place d'un état de régulation hydrique de la plante qui se manifeste par la fermeture stomatique et par une régulation du potentiel osmotique. Parmi les osmorégulateurs les plus importants qui s'accumulent chez les céréales en conditions de déficit hydrique figurent les sucres et la proline (Vendruscolo et *al.*, 2007). Les sucres sont considérés par plusieurs auteurs comme de bons osmorégulateurs (Kameli & Lösel, 1995) qui peuvent jouer un rôle important dans l'ajustement osmotique et l'adaptation des plantes à la sécheresse (Morgan, 1984 ; Zhang et *al.*, 1999).

L'accumulation de la proline constitue aussi un véritable mécanisme de tolérance à la sécheresse. En effet, la teneur en proline est plus élevée en cas de déficit hydrique, (Slama et *al.*, 2005) et en particulier, chez les génotypes les plus résistants à la sécheresse (Slama, 2002 ; Vendruscolo et *al.*, 2007). Bien que les doutes persistent sur l'accumulation des acides aminés comme un avantage adaptatif ou seulement une conséquence des changements dans le métabolisme dus aux stress (Vendruscolo et *al.*, 2007).

L'ajustement osmotique peut être aisément évalué à partir des mesures de potentiel osmotique et de la teneur relative en eau, l'accumulation des sucres solubles étant la cause essentielle de la baisse du potentiel osmotique (Hassani et *al.*, 2008). Les améliorateurs recherchent à identifier des paramètres physiologiques et biochimiques pouvant être exploités pour la sélection de génotypes tolérant à la sécheresse (Houasli et *al.*, 2014).

### 3-Travaux sur l'amélioration de la tolérance à la sécheresse du blé

Il a été estimé que dans les années à venir, la rareté des pluies sera plus sévère, ainsi la sécheresse sera parmi les plus importants des désastres naturels qui occasionneront des pertes considérables dans les rendements des plantes cultivées (Jatoi et *al.*, 2014). La révolution verte a été réalisée par l'augmentation des rendements pour les écosystèmes irrigués. Cela ne fut pas le cas pour beaucoup de culture dans les écosystèmes dépendants de la pluie (Serraj et *al.*, 2011 ; Talebi, 2011).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

Relativement, les travaux dédiés à l'amélioration de la tolérance à la sécheresse des plantes cultivées restent peu (Ashraf, 2010), moins encore pour le blé (Molnar et *al.*, 2004). Le succès limité dans l'amélioration classique de la tolérance à la sécheresse est probablement due à la complexité des mécanismes de la tolérance à la sécheresse ; un control multigénique ayant des effets additifs (les loci sur les chromosomes hébergeant de tels gènes sont considérés en tant que QTL) ; l'existence de fortes interactions entre les gènes pour la tolérance à la sécheresse et ceux impliqués dans le rendement ; une faible héritabilité de certains de ces caractères et une forte interaction entre le génotype et l'environnement dans les schémas de sélections pour de tels caractères (Vendruscolo et *al.*, 2007 ; Ashraf, 2010).

L'amélioration de la résistance à la sécheresse est encore compliquée, par le manque de technique de criblage rapide d'une part, d'autre part il est aussi difficile de reproduire les conditions de stress hydrique bien défini pour une évaluation efficace de grands nombres de génotypes, du fait d'une adaptation spécifique régionale nécessitant différents gènes dans des années et des sites différents (Nachit, 1997 ; Serraj et *al.*, 2011).

### **III-3-1 Amélioration du rendement sous conditions de stress**

Dans le cas du blé, les travaux se sont focalisés sur le rendement et ses composants (Cattivelli et *al.*, 2008; Jatou et *al.*, 2014), seulement ces caractères sont génétiquement intriqués et ne sont pas faciles à manipuler. Ceci a eu comme répercussions peu de fait accomplis dans l'amélioration de la tolérance à la sécheresse des génotypes du blé, ces cinq dernières décennies (Munir et *al.*, 2006). Ainsi, il est nécessaire de chercher des approches plus efficaces pour disséquer l'adaptation génétique des cultures, en vue de l'amélioration de la tolérance à la sécheresse.

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

D'autres stratégies visent à stabiliser les rendements sous contrainte hydrique plutôt que d'améliorer les rendements. Cette stabilité pourrait être obtenue par l'identification de mécanismes de résistance à la sécheresse et par une meilleure connaissance de la participation des principaux organes de la plante à l'élaboration du rendement en grains (Slama et *al.*, 2005).

Les paramètres morpho-physiologiques, les caractéristiques des racines, les traits en relation à l'osmorégulation, la teneur relative en eau ont été étudiés pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse du blé (Al Hakimi et *al.*, 1998 ; Hafsi et *al.*, 2001 ; Khazaei et *al.*, 2009).

### III-3-2 Exploitation de la variabilité génétique des espèces apparentées

L'amélioration pour n'importe quel caractère nécessite une variabilité génétique avec une magnitude d'héritabilité. Dans le cas du blé, les combinaisons intraspécifiques ont été largement exploitées. La variabilité intra et interspécifique des espèces sauvages apparentées aux blés, offrait ainsi de nouvelles sources, pour des combinaisons nouvelles de gènes. Ainsi, au *CIMMYT*, le développement par les méthodes empiriques a permis, la création d'un blé hexaploïde synthétique possédant le génome D d'*Ae. tauschii*, ce blé a apporté une nouvelle source significative pour la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Ashraf, 2010 ; Mujeeb-Kazi et *al.*, 2013). Cette approche nécessite, néanmoins, plusieurs rétrocroisements et se heurte à plusieurs obstacles : taux de nouaisons faibles, viabilité et fertilité des hybrides, expression des gènes d'intérêt, fréquence de recombinaisons (Jahier, 2004).

### III-3-3 Exploitation de la vigueur d'hybrides

Les méthodes d'amélioration conventionnelles ont été remplacées par des approches différentes qui ont prouvé leur efficacité pour d'autres cultures, se basant sur le principe que l'effet de l'hétérosis pour le rendement et pour ses composants peut être augmenté sous conditions de stress hydrique, ce qui permettra l'obtention de meilleurs rendements que ceux des lignées pures, en cherchant les meilleures combinaisons parentales pour la vigueur d'hybrides. Cette approche a prouvé son efficacité pour l'orge et semble prometteuse pour la culture de blé, sous stress hydrique (Jatoi et *al.*, 2014). Ainsi, ces auteurs ont observé un effet d'hétérosis désirable pour ; le nombre de grain par épi ; la récolte en grains par plante ; indice de grains, la teneur relative en eau.

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

### III-3-4 Culture *in-vitro*, variation soma-clonale et mutagénèse, pour la sélection de génotypes tolérants

Afin de pallier aux problèmes rencontrés lors de la sélection en condition de champs, une autre approche vise une sélection précoce de génotypes tolérants aussi bien à la sécheresse qu'à d'autres stress abiotiques, en conditions contrôlées *in-vitro*, par l'ajout d'agents osmotiques dont le plus utilisé est le PEG, sur des cultures d'embryons matures, afin de simuler un stress hydrique en conditions naturelles. La culture *in-vitro* permet l'introduction d'une variation soma-clonale utilisée pour le criblage de plantes tolérantes. Cependant, il est nécessaire de disposer de protocoles de cultures cellulaires et de régénération de plantes efficaces *in-vitro*, pour une telle approche (Benderradji et al., 2011 ; Bouatrous et al., 2012 ; Benabdelhafid et al., 2015 ; Kacem et al., 2017; Mouellef et al., 2018)

La mutagénèse a rencontré un essor considérable dans la sélection végétale comme méthode d'induction de la variabilité génétique surtout par l'utilisation des rayonnements gamma, induisant des mutations morpho-physiologiques permettant la sélection de mutants tolérants aux divers stress abiotiques (Bammoun, 1997 ; Louali et al., 2015).

### III-3-5 Les approches transgéniques

Les avancées en protéomique ouvrent des perspectives pour la compréhension au niveau cellulaire, des mécanismes d'adaptation des plantes aux stress biotiques et la sélection de génotypes tolérants, notamment pour le stress hydrique (Mazzucotelli et al., 2008 ; Kosová et al., 2014 ; Hamla et al., 2014 ; Bouchemal et al., 2017 ; Bouchemal et al., 2018). L'utilisation de l'ingénierie génétique pour le transfert de gènes et de facteurs transcriptionnels permettant la surexpression de protéines, d'osmorégulateurs, régulateurs de croissance, les antioxydants, les protéines embryonnaires (Mazzucotelli et al., 2008 ; Ashraf, 2010 ; Kosová et al., 2014), a permis l'amélioration de la tolérance à la sécheresse et un gain de rendement pour plusieurs cultures, notamment le riz.

Chez le blé, la surexpression du gène *mt1D* impliqué dans la biosynthèse du mannitol, un des meilleurs osmoprotecteur, a permis l'amélioration de la tolérance à la sécheresse et à la salinité. Un autre exemple est donné par la surexpression d'une catégorie de protéines embryonnaires *LEA* qui a permis l'amélioration de la sécheresse chez les lignées transgéniques du blé et de riz (Ashraf, 2010).

## Synthèse bibliographique : III- Intérêt des Aegilops et Amélioration du blé

---

Cependant, des observations d'une croissance anormales ont été rapportées pour les lignées transgéniques, dans de telles études. Ceci est expliqué par une surconsommation des métabolites au détriment de la croissance des plantes, car les gènes en question présentent une expression continue, impliquant une réponse physiologique de la plante au transgène et un dysfonctionnement dans la régulation de la réponse aux stress. Plus loin encore, très peu de ces études ont été testées sur champs, ce qui nous laisse sans connaissance de leur performance dans les conditions naturelles où plusieurs stress abiotiques et biotiques peuvent interagir (Mazzucotelli et *al.*, 2008; Ashraf, 2010). Ainsi, l'observation du transcriptome ne donne qu'une image large et incomplète de la réponse aux stress, la caractérisation des mécanismes post-transcriptionnels et post-traductionnels et leurs interactions est crucial pour une compréhension profonde des mécanismes moléculaires de l'adaptation à l'environnement mais aussi un but pratique pour l'amélioration de la tolérance aux stress (Mazzucotelli et *al.*, 2008).

### 1- Les marqueurs Moléculaires, Définition

Un marqueur moléculaire se définit comme étant un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte, ainsi il correspond au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. Les marqueurs moléculaires doivent réunir les caractéristiques idéales suivantes : être des caractères mendéliens à hérédité simple ; avoir plusieurs allèles ; être co-dominants ; ne pas avoir d'effet pléiotropique ou épistatique ; ne pas être liés entre eux ; être stables à tous les stades du développement ; ne pas avoir d'effet sur la croissance ou la reproduction sexuée ; être sélectivement neutres ; l'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à tout le génome, traduit ou pas en protéines et est indépendante des conditions de l'environnement ; être dispersés le long du génome ; facilement observables et sans ambiguïté (Bretting & Widrlechner, 1995 ; Najimi et *al.*, 2003). En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN (Najimi et *al.*, 2003).

### 2- Différents types de marqueurs

L'intérêt des marqueurs moléculaires dans diverses applications a conduit à un essor important dans le développement de variétés de marqueurs (Kalia et *al.*, 2011). Le choix du marqueur dépend en premier lieu de l'objectif de l'étude, vue que chacun a ses points forts et négatifs (Santoni, et *al.*, 2000 ; Carriero et *al.*, 2002). Les marqueurs moléculaires sont classés en (Kalia et *al.*, 2011) : Marqueurs à base d'hybridation et ceux à base de technique PCR.

#### 2-1 Marqueurs à base d'hybridation ou les marqueurs RFLP

Les enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites spécifiques comprenant, en général, un nombre pair de bases (4, 6 ou 8). La spécificité est telle que le remplacement d'une seule base dans un site suffit à empêcher la coupure de l'ADN par l'enzyme utilisée. C'est cette spécificité qui est exploitée pour la mise en évidence du polymorphisme : une présence/absence de site de restriction entraîne un polymorphisme de longueur des fragments. Les marqueurs RFLPs ont l'avantage d'être reproductibles, co-dominants et possèdent une spécificité de locus, cependant leur utilisation en sélection assistée par marqueur est limitée par l'utilisation de radio-isotopes, des quantités importantes d'ADN et la lourdeur de la technique (Hernández et *al.*, 2001), qui la rend non adaptable à de grands échantillons (Kalia et *al.*, 2011).

### 2-2 Marqueurs à base de technique PCR

Les techniques ayant comme base la PCR, sont plus simples à mettre en œuvre et nécessitent moins de quantité d'ADN (Hernández et *al.*, 2001). Une variété de marqueurs sont répertoriés AFLPs, ISSRs, SNPs, RAPD et SSR (Kalia et *al.*, 2011) dont les deux derniers sont décrits :

#### 2-2-1 Technique RAPD

Le principe des RAPD consiste à réaliser une réaction PCR sur l'ADN de l'individu étudié en utilisant une amorce courte, de 10 nucléotides en général, de séquence arbitraire. L'amorce va s'hybrider chaque fois que se trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire (ou comportant un nombre limité de mésappariements). Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (à moins de 3 000 pb) et en direction opposée, c'est-à-dire dans une configuration permettant la PCR, l'amplification aura lieu. Si un de ces deux sites est absent dans un autre individu, il n'y aura pas d'amplification et un polymorphisme de présence/absence sera observé. Les homozygotes pour l'allèle « absence de bande » sont repérés sans ambiguïté, tandis que la présence de bande ne permet pas de trancher entre l'hétérozygote et l'homozygote pour l'allèle « présence de bande ». Ces marqueurs sont donc qualifiés de type « dominants » (Hernández et *al.*, 2001).

Ces marqueurs sont facilement produits mais leur application dans la cartographie est limitée par le fait qu'ils sont dominants ainsi que leur distribution non randomisée à travers les cartes génétiques), encore plus, ils ne sont pas suffisamment reproductibles (Hernández et *al.*, 2001 ; Kalia et *al.*, 2011).

#### 2-2-2 Marqueurs microsatellites

Les séquences microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) sont constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétranucléotidiques. Les plus courantes sont (A)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (GT)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, etc., la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Les microsatellites sont parmi les marqueurs les plus puissants pour révéler du polymorphisme. Ce polymorphisme concerne le nombre des unités de répétition qui constituent la séquence microsatellite (Santoni, et *al.*, 2000 ; Kalia et *al.*, 2011).

## Synthèse bibliographique : IV- Les marqueurs Moléculaires

---

### a- Les microsatellites dans les génomes

Les microsatellites sont très abondants, uniformément répartis dans le génome et présents dans les régions codantes et non codantes (Schlötterer, 2000 ; Dreisigacker et *al.*, 2004 ; Kalia et *al.*, 2011). Ces séquences présentent une variation significative entre les génomes. Elles sont moins fréquentes dans les génomes procaryotes (Schlotterer, in Hoelzel, 1998).

Chez les végétaux supérieurs, les premières estimations indiquent qu'il y aurait en moyenne un microsatellite dinucléotidique tous les 30 à 100 kb. Ils sont aussi présents dans les génomes chloroplastiques et mitochondriaux (Santoni, et *al.*, 2000 ; Gupta & Varshney, 2000). Les motifs AA/TT et AT/TA sont les plus communs (Schlotterer, in Hoelzel, 1998), notamment chez *Arabidopsis thaliana* ainsi que chez les levures (Gupta & Varshney, 2000). Chez les plantes cultivées les motifs (AC)<sub>n</sub> et (GA)<sub>n</sub> ont été aussi reportés, ceux trinuéotidiques et tétranuéotidiques sont aussi retrouvés dans les génomes des plantes, les plus fréquents sont (AAG)<sub>n</sub>, and (AAT)<sub>n</sub> (Schlötterer, 2000 ; Kalia et *al.*, 2011 ). Chez les céréales le motif trinuéotidique le plus fréquent est (CCG)<sub>n</sub>, qui caractérise les monocotylédones (Kalia et *al.*, 2011). Wang et *al.*, (1994) ont rapporté que les séquences plus abondantes sont (AT)<sub>n</sub> suivies par (AAT)<sub>n</sub>, (AAC)<sub>n</sub>, (AGC)<sub>n</sub>, (AAG)<sub>n</sub>, (AATT)<sub>n</sub>, (AAAT)<sub>n</sub> et (AC)<sub>n</sub> dans une étude de 54 espèces végétales.

Chez les humains, les données affichent 10 fois plus de microsatellites que ceux des génomes des plantes (Gupta & Varshney, 2000). Les répétitions trinuéotidiques ont été associées à des maladies neuro-dégénérantes (le X fragile, la maladie de Huntington). Alors que chez les mammifères et la *Drosophile* les microsatellites GT sont les plus abondants. Les microsatellites GA qui ont par contre la plus faible fréquence chez toutes les espèces citées en haut, présentent cependant chez *Caenorhabditis elegans* une dominance d'expression (Gupta & Varshney, 2000).

## Synthèse bibliographique : IV- Les marqueurs Moléculaires

---

La genèse des microsatellites est un mécanisme évolutif complexe. Les variations dans les SRR induisant une diminution ou une augmentation des motifs de répétitions sont associées aux taux de mutations.

Les explications possibles de la genèse des microsatellites incluent : les erreurs dues au « glissement » de la polymérase lors de la réplication des chromosomes ; l'efficacité du système de réparation des *mismatch* de l'ADN double brin ; la recombinaison d'ADN double brin (*crossing over* inégaux, conversion de gènes) et la rétrotransposition ( Kalia et *al.*, 2011 ; Joukhadar & Jighly, 2012). Il a été estimé que le taux de mutation des microsatellites varie de  $10^{-6}$  à  $10^{-2}$  par génération, ce taux apparaît plus élevé que celui de substitution de bases (Santoni, et *al.*, 2000 ; Schlotterer, 2000).

### **b- Les amorces de marqueurs SSR :**

Afin d'amplifier un locus microsatellite, il faut au préalable avoir des informations concernant les séquences d'ADN flanquant le marqueur pour désigner les amorces spécifiques (Schlotterer, in Hoelzel, 1998). Ces amorces ont une longueur de 20 à 25 bases bordant spécifiquement le microsatellite. Des bases de données à l'instar de EMBL et GenBank, ont été créées pour certaines espèces modèles contenant des informations numérisées de microsatellites et leurs séquences flanquantes (Schlotterer, in Hoelzel, 1998).

Les méthodes conventionnelles, basées sur l'isolement et le séquençage de sondes génomiques, permettent un isolement aléatoire des marqueurs SSR sans avoir des informations sur leurs localisations chromosomiques. Dans certains domaines d'application, notamment celles de l'écologie ceci n'influence en rien ses études.

Dans d'autres champs d'application, il est au contraire plus conséquent d'étudier le polymorphisme des SSR d'une région bien connue. Les clones P1 ou des Cosmides, sont les plus utilisés dans les projets génomiques et permettent une accessibilité rapide à une région génomique bien définie (Schlotterer, in Hoelzel, 1998 ; Dreisigacker et *al.*, 2004). Une méthode nouvelle de création des SSR est réalisée par le criblage de bases de données EST. Cette approche récente permet aux chercheurs de passer de l'utilisation de marqueurs anonymes dont les effets sont inconnus sur le phénotype à des marqueurs physiquement associés à des régions codantes, ce qui peut permettre de mieux refléter les effets de la sélection, aussi bien naturelle qu'artificielle (Dreisigacker et *al.*, 2004).

### 3-Applications diverses des Microsatellites

Les marqueurs moléculaires sont utilisés pour décrire la variabilité génétique et sa répartition au sein de populations et d'espèces, ils servent aussi à préciser les mécanismes évolutifs des populations (Santoni, *et al.*, 2000), notamment la différenciation génétique due à la sélection, et les empreintes génétiques pour l'étude de populations de collection, étude de changement temporaire de la diversité (Dreisigacker *et al.*, 2004).

Parmi tous les marqueurs, ceux SSRs sont devenus des outils de choix dans tous les domaines d'applications de la génétique et de l'amélioration des plantes, car ils sont spécifiques, de type co-dominants, reproductible, ils présentent une grande variabilité et une dispersion tout au long du génome. Ce sont de puissants marqueurs génétiques utilisés aussi bien en matière d'identification que d'analyse de diversité et de recherche de paternité (Hernández *et al.*, 2001).

#### 3-1 L'étude de flux de gènes et d'introgression

Le flux de gènes est estimé sur les sous-populations par l'appréciation, en partie, du taux d'allofécondation, lui-même apprécié sur des dizaines de loci polymorphes, neutres et de préférentiellement co-dominants, ainsi les marqueurs comme des RFLP, des STS et des microsatellites sont donc intéressants (Santoni, *et al.*, 2000). Dans les années récentes, les marqueurs microsatellites ont prouvés leur efficacité pour l'estimation de la diversité génétique (variation dans les séquences nucléotidiques, structure des gènes, chromosomes et les génomes entiers) et les relations phylogénétiques et taxonomiques des espèces selon les séquences conservatrices (Kalia *et al.*, 2011).

L'introgression interspécifique naturelle est observée dans de nombreux groupes d'espèces végétales. Artificiellement, les croisements interspécifiques visent à introduire dans des variétés cultivées, des gènes d'intérêt d'espèces relatives. Une autre application importante des microsatellites est la détermination des hybrides, où la nature co-dominante des microsatellites joue un rôle clé et permet de détecter la contribution allélique de chaque parent dans les hybrides somatiques ou ceux formés par sexualité (Santoni, *et al.*, 2000, Kalia *et al.*, 2011). Les marqueurs SSRs spécifiques des parents sauvages permettent de suivre l'intégration des chromosomes dans les premières générations de rétrocroisements et la détection précise de substitution ou d'addition entre les chromosomes des deux parents (Peil *et al.*, 1998).

### 3-2 Recherche de parenté

La recherche de paternité permet de retrouver les sources de pollen et de décrire le flux de pollen effectif. Les marqueurs utilisés doivent être co-dominants et posséder de nombreuses formes alléliques pour différencier un maximum d'individus. Les locus microsatellites sont ceux qui ont le plus fort pouvoir d'exclusion grâce au nombre élevé d'allèles par locus (Santoni, et *al.*, 2000).

Le développement de marqueur spécifique d'organelles (SSRcp et SSRmt) a eu un impact important sur la détermination de la structure et la variation à l'intérieur d'une population naturelle ainsi que les relations phylogénétiques. Le mode de transmission uniparental, la conservation de l'ordre de gènes et l'absence d'hétéroplasmie et la recombinaison des génomes des organelles, fait d'eux un outil attractif pour les études d'évolution, les principaux modes de migration, l'histoire de populations et les degrés de différenciation (Santoni, et *al.*, 2000, Kalia et *al.*, 2011). Bien que dans ce domaine les EST sont aussi utilisés pour de tels études car elles visent l'évolution fonctionnelle des gènes (Kalia et *al.*, 2011).

### 3-3 Déterminisme du sexe de plantes commerciales

Des marqueurs SSRs liés au sexe ont été décrits et sont utilisés pour identifier les plantes femelles des espèces commerciales dioïques, mises en valeur pour la production de graines et de fruits, à n'importe qu'elle stade de développement palliant ainsi au problème de dimorphisme sexuel qui ne peut être observé que quelques mois jusqu'à plusieurs années après floraison (Kalia et *al.*, 2011).

### 3-4 Diversité génétique des collections de germplasm

Les microsatellites sont très intéressants dans l'identification des cultivars et sont avantageux dans les analyses de pedigree du fait qu'il présente un déterminisme à un seul locus. Le multiallélisme de ce type de marqueur facilite la détection comparative de la variabilité allélique dans une grande collection de germplasm, afin de faire le bon choix des parents pour les croisements (amélioration par croisement), ainsi que l'évaluation de la diversité génétique de lignées en sélection (substitution inter-variétale, lignées d'addition), des informations qui sont d'autant importantes pour la conservation d'accessions et les études taxonomiques et phylogénétiques.

## Synthèse bibliographique : IV- Les marqueurs Moléculaires

---

L'évaluation de la diversité génétique et les relations phylogénétiques a permis de reclasser des accessions mal classées au départ, ce qui n'est pas négligeable pour le choix de lignées parentales pour les programmes d'amélioration, la classification d'accessions de germplasm, la curation et l'acquisition de nouveaux plants d'accessions de germplasm (Korzun et *al.*, 1997 ; Bertin et *al.*, 2001 ; Stachel et *al.*, 2000 ; Roder et *al.*, 2002 ; Dreisigacker et *al.*, 2004 ; Ijaz & Khan, 2009 ; Kalia et *al.*, 2011).

### **3-5 Cartographie et recherche associées de gènes d'intérêt**

Les marqueurs SSRs ont été efficacement employés dans la détermination de région génomique spécifique responsable de l'expression d'importants traits physiologiques et agronomiques. Plus loin encore, ils peuvent être utilisés dans l'analyse de QTLs qui peuvent mener à l'identification de gènes candidats de traits d'intérêt vital pour un programme d'amélioration ; à l'instar du rendement, résistance aux maladies, la tolérance aux stress et la qualité des graines et fruits. Bien que les marqueurs EST-SSRs peuvent contribuer à la sélection directe d'allèle, car ils ont des fonctions connues ou putatives et peuvent être associé à des traits désirés (Santoni et *al.*, 2000 ; Kalia et *al.*, 2011).

La cartographie des génomes est aussi un champ d'application des marqueurs SSR où ils ont prouvé leur efficacité, elle englobe la construction de cartes génétique et physique, la cartographie comparée et celle associée. Durant les récentes années les cartes génétiques ont été préparées pour plusieurs espèces de plantes dont le riz, le blé, l'orge, le coton, le seigle. La cartographie associée, signifiant l'association significative entre un marqueur moléculaire et un trait phénotypique, est spécialement utile pour l'intégration de la MAS pour les traits quantitatifs dans les programmes d'amélioration des plantes. Ainsi, la corrélation entre un marqueur SSR et la taille du caryopse du blé a été détectée par la cartographie associée en utilisant un germplasm élite (Santoni et *al.*, 2000; Breseghello & Sorrells, 2006; Kalia et *al.*, 2011).

### 4- Sélection assistée par marqueurs MAS

La sélection assistée par marqueur MAS inclue les protéines de réserves des graines, les isozymes et les marqueurs moléculaires d'ADN dans les programmes de sélection (Howes et *al.*, 1998). Les marqueurs moléculaires peuvent être utilisés pour cribler les germplasm à la recherche d'allèles intéressants dans des lignées cultivées ou dans des espèces apparentées. Les analyses de ségrégation associée aux QTLs, sont les plus utilisées et offrent des résultats plus précis que les analyses classiques de recombinaison génétiques. Couramment, les marqueurs moléculaires type PCR sont plus utilisés que ceux de RFLPs (Cattiveli et *al.*, 2008).

L'un des avantages de la MAS est la caractérisation, du matériel végétal, dans des stades et des générations plus avancées (Howes et *al.*, 1998), l'identification des descendants, de lignées prometteuses, au cours des programmes d'amélioration. Lors des backcross assistés par marqueur (MABC), ceux dominants ou co-dominants peuvent accélérer l'introgession de gènes dans les cultivars adaptées ou les lignées avancées (Howes et *al.*, 1998 ; Kalia et *al.*, 2011). Permettant de réduire par conséquent, la durée des programmes de sélection et de contourner les problèmes rencontrés lors d'une sélection directe, générés par l'interaction de l'environnement avec le génotype (Cattiveli et *al.*, 2008).

La MAS est particulièrement avantageuse dans le cas de l'amélioration des résistances aux maladies et aux insectes (Yencho et *al.*, 2000 ; Langridge et *al.*, 2001). Elle peut se faire sans avoir recours aux tests d'inoculation, permettant ainsi d'éviter les erreurs associées à l'utilisation de ces procédures et de mener l'amélioration de la résistance même dans les aires où le pathogène n'existe pas (Najimi et *al.*, 2003). Les approches transgéniques peuvent être aussi explorés en combinaison avec la MAS pour de tels objectifs (Kalia et *al.*, 2011). Les marqueurs moléculaires permettent le cumul rapide de plusieurs gènes dans une seule variété élite en vue d'une résistance plus efficace. La maîtrise de la taille des fragments chromosomiques introduits par rétrocroisements, permet d'éliminer les effets défavorables susceptibles d'être transmis avec les gènes cibles introgressés (Najimi et *al.*, 2003). Ainsi, les schémas de sélection seront accélérés puisque les sélectionneurs peuvent inférer la présence du gène par la présence du marqueur avant même l'expression du phénotype.

## Synthèse bibliographique : IV- Les marqueurs Moléculaires

---

Cette sélection assistée par marqueurs est donc d'un intérêt certain pour le sélectionneur puisqu'elle offre l'avantage d'une sélection efficace, rapide et précoce, et devient alors un complément nécessaire aux méthodes traditionnelles d'amélioration génétique des céréales (Najimi et *al.*, 2003), ou au contraire, pour d'autres cultures remplacer complètement les méthodes anciennes (Kalia et *al.*, 2011).

### 5- MAS et la sécheresse

A l'instar de la tolérance aux stress abiotiques, la majorité des traits physiologiques associés à la tolérance à la sécheresse sont de nature quantitative (Cattiveli et *al.*, 2008). L'accomplissement réalisé pour l'amélioration de la sécheresse de plusieurs plantes cultivées, a été obtenu par l'intégration de techniques conventionnelles d'amélioration, de la MAB et les approches transgéniques (Ashraf, 2010).

La variation génétique naturelle d'une culture peut être exploitée soit par une sélection directe sous conditions de stress ou par la stimulation d'un stress ou naturellement par la cartographie de QTL (polygènes) et en conséquence une sélection assistée par marqueur (Ashraf et *al.*, 2008). La cartographie des QTL permet de connaître les localisations, les nombres, les magnitudes des effets du phénotype. Le rôle des polygènes dans le contrôle d'un trait a été largement étudié par les moyens traditionnels. Cependant, l'utilisation de marqueurs d'ADN et la cartographie des QTL ont permis de disséquer de manière convaincante un trait complexe (Ashraf, 2010), à l'instar de la méthode complémentaire de la cartographie associée par la corrélation d'un gène/marqueur avec un trait intéressant (Kallia et *al.*, 2011 ; Bousba et *al.*, 2013). Chez le blé, les lignées d'haploïdes doublés sont parmi les moyens utilisés, pour les études génétiques et la cartographie de loci de traits qualitatifs et quantitatifs pour les caractères agronomiques importants (Picard et *al.*, 1994 ; Nachit, 1997).

Cependant, la cartographie de QTLs reste un challenge pour la majorité des traits physiologiques potentiellement associés à l'amélioration de la tolérance à la sécheresse (Kalia et *al.*, 2011), notamment chez le blé, à cause de la taille de son génome et de sa polyploïdie (El Jaafari et *al.*, 2001). La génomique comparée chez les Graminées, a permis d'établir des relations de colinéarité entre les différents génomes des céréales et d'enrichir les cartes génétiques en utilisant le riz comme espèce modèle dans cette famille. Néanmoins, les réarrangements qu'ont subis les grands génomes (maïs, blé) ont rendu, parfois, difficile, l'identification de séquences génomiques orthologues (Feuillet, 2004).

## Synthèse bibliographique : IV- Les marqueurs Moléculaires

---

Chez le blé, la position des gènes exhibant un effet significatif sur l'accumulation de l'acide Abscisique en conséquence d'une sécheresse, a été identifiée par l'utilisation de séries de lignées de substitution d'un seul chromosome, ainsi que des populations issues de croisement entre un cultivar produisant une valeur élevée d'ABA « cv.Ciano » et un autre produisant une valeur inférieure d'ABA. Il a été observé que le chromosome 5A porte le(s) gène(s) de l'accumulation d'ABA (Quarrie et *al.*, 1994).

Des informations préliminaires sur une carte génétique et des QTL liés à des caractères de résistance à la sécheresse chez le blé ont été rapportées par Quarrie et *al.*, (1995) et Semikhodskii et *al.*, (1997). En plus de ces QTL, des QTL pour la biomasse racinaire (chromosomes 4BL et 5AL) et pour la discrimination isotopique (chromosomes 1BS et 6BS) ont été caractérisés (Quarrie et *al.*, 1999). Morgan & Tan (1996) ont identifié des marqueurs moléculaires associés à l'ajustement osmotique sur le chromosome 7AS (El Jaafari et *al.*, 2001).

Dans une autre étude Quarrie et *al.*, (2005), ont trouvé que le génome D possède uniquement la moitié des marqueurs des génomes A et B en association avec le rendement ou ses composantes, ainsi que l'identification de 2 autres QTL majeurs du rendement sur les chromosomes 1D et 5A. Parmi les QTLs répertoriés, trois groupes associés au rendement ont coïncidé avec le gène de nanisme *Rht-B1* sur 4BS et les gènes de vernalisation *Vrn-A1* on 5AL et *Vrn-D1* sur 5DL.

La régénération d'ESTs est une ressource de transcrits de haute qualité pour la découverte de gènes et le développement de marqueurs associés aux stress abiotiques (Kalia et *al.*, 2011). Ainsi, Srinivas et *al.*, (2009) ont exploré des loci SSR dans un total de 9892 d'extraits ESTs de sécheresse du sorgho valable dans la banque de gènes NCBI dbESTs et ont suggéré qu'ils peuvent être appliqué dans les analyses de QTL pour la sécheresse. Dans une autre étude, Varshney et *al.*, (2009) ont régénéré un total de 20162 ESTs en réponse à la sécheresse et à la salinité de 10 sondes d'ADNc de tissus différents des racines de pois chiches.

**MATERIEL**

**ET**

**METHODES**

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

### I- Première partie : Caractérisation des géniteurs pour leur tolérance à la sécheresse.

#### I-1-Matériel végétal

Deux espèces sauvages du genre *Aegilops* (*Aegilops geniculata* ROTH. et *Aegilops triuncialis* L.) ainsi que trois variétés de blé dur cultivées (Oued Zenati, Hoggar et Waha) (tableau 04) ont fait l'objet de cette étude afin d'évaluer leur tolérants aux stress hydrique, les graines nous ont été aimablement fournies par la station expérimentale de l'ITGC d 'El Khroub (Institut Technique des Grandes Cultures, Constantine, Algérie), les graines d'*Aegilops geniculata* constituent une collection naturelle locale (Constantine).

**Tableau 04 :** Caractéristiques principales des espèces *Aegilops* et des variétés de blé dur (ITGC, 1996 ; Van Slageren, 1994 ; Benbelkacem & Kellou, 2000).

Espèces	Origine, Pedigree	Caractéristiques
<i>Triticum durum</i> Desf.		
Variété Oued Zenati 368 (O.Z.)	Sélectionnée dans la population locale des Bidis d'Oued Zenati. Station Guelma, 1936.	Adapté aux plaines antérieures, son épi est blanc, compact à barbes noirs et longues, sa paille est haute. Le grain est ambré, gros et peu allongé, le PMG est élevé. C'est une variété tardive dont le tallage est moyen, tolérante à la septoriose, sensible aux rouilles brunes et jaunes et à la fusariose.
Variété Hoggar (Hog.) Ex. Vitron	Produite par CYMMIT Sélection ITGC/Tiaret, 1986.	C'est une variété précoce dont l'épi est demi-lâche et blanc. Le grain moyen est ambré, le PMG est élevé. La paille ainsi que le tallage sont moyens. Elle est peu sensible à l'helminthosporiose et moyennement tolérante aux rouilles, tolérantes à la verse. Elle est adaptée aux Hauts

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

		Plateaux.
Variété Waha (Wa.)	Produite au Mexique par CIMMYT, reconnue par l'ICARDA, puis sélectionnée par l'ITGC/ Constantine.	Elle présente un épi demi-lâche à compact, roussâtre, la paille est courte et demie pleine. Le grain est moyen, clair ambré à roux. Le PMG est moyen. C'est une variété précoce, le tallage est moyen à fort avec une très bonne productivité. Elle est modérément tolérante aux rouilles, à la fusariose et à la septoriose, sensible au piétin-échaudage. Tolérante au froid, sensible à la sécheresse et aux gelées printanières. Elle est adaptée aux hauts plateaux et aux plaines antérieures.
<b>Espèces du genre</b> <i>Aegilops</i>		
<i>Aegilops geniculata</i> Roth. ( <i>Ae.gen.</i> ) (syn. <i>Ae.ovata</i> L.)	Elle pousse dans la région méditerranéenne, le Moyen Orient et les parties Sud de la Russie et de l'Ukraine.	Espèce annuelle, allotétraploïde ( $2n = 4x = 28$ ), sa formule génomique est UUMM .
<i>Aegilops triuncialis</i> L. ( <i>Ae.tri.</i> )	Elle pousse dans la région méditerranéenne,	Espèce annuelle, amphiploïde tétraploïde, ( $2n = 4x = 28$ ). Pousse dans la région méditerranéenne

### I-2-Dispositif expérimental

#### I-2-1-Pré-germination

Les graines des cinq génotypes ont été stérilisées dans l'alcool à 70% pendant 10 secondes, rincées puis désinfectées une deuxième fois dans l'eau de Javel pendant 10 mn, puis, avec 3 rinçages successifs. Les graines sont ensuite disposées dans des boîtes de Pétri et mises à l'obscurité pendant 72h. Après la sortie des racines et du coléoptile, elles sont transférées dans des pots qui contiennent un mélange de 3 volumes de terre et un volume de sable. L'étape de pré-germination est nécessaire pour éviter les pourritures des graines et augmenter ainsi le nombre de plantes pour l'essai. Les pots sont installés en serre, et arrosés périodiquement à leur capacité au champ.

#### 1-2-2- Installation de l'essai

Au stade d'épiaison, afin de comparer les conditions normales aux conditions de stress, trois traitements ont été appliqués comme suit :

- **Le groupe de témoin (T)** : où les plantes ont été arrosées de façon périodique.
- **Niveau 1 de stress hydrique (N1)** : correspond à un arrêt d'arrosage pendant 7 jours (une semaine), du 20 au 26 Avril 2010.
- **Niveau 2 de stress hydrique (N2)** : les plantes ont été privées d'eau pendant 15 jours (deux semaines). Ce niveau a été appliqué une semaine avant celui du N1 (du 13 au 26 Avril 2010), afin de procéder aux prélèvements et aux mesures en même temps pour les trois traitements, qui ont été réalisés le 27 Avril 2010.

### I-3 – Paramètres étudiés

L'étude a concerné plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques, dont la littérature évoque leur pertinence dans la détermination du degré de tolérance au stress hydrique. Pour toutes les mesures réalisées, trois répétitions par traitement et par variété ont été effectuées.

### I-3-1- Paramètres physiologiques

#### I-3-1-1- La teneur relative en eau TRE « % »

Cette méthode se base sur la détermination des poids frais, turgescent et sec des feuilles étendards. La teneur relative en eau est exprimée par la formule de (Clarck et Mc Caing, 1982) :

$$\text{TRE (\%)} = [(\text{PF}-\text{PS}) / (\text{PT}- \text{PS})].100 \quad \text{où :}$$

**PF : Poids frais**, déterminé par la pesée de la feuille étendard immédiatement après sa coupure à la base du limbe ;

**PT : Poids de turgescence**, obtenu par l'hydratation des feuilles dans l'eau distillée à l'obscurité dans un endroit frais pendant 24h. Les feuilles sont ensuite retirées, séchées à l'aide de papier buvard afin d'éliminer l'eau en surface, puis pesées.

**PS : Poids sec**, déterminé après passage des feuilles à l'étuve à une température de 80°C pendant 48h, puis pesées.

#### I-3-1-2 Mesure de la résistance stomatique (Rs « m2.s/mol »)

La résistance stomatique à la diffusion de vapeur d'eau, est mesurée à l'aide d'un Poromètre à diffusion type Delta Devices MK3. Après étalonnage de l'appareil, la feuille est insérée dans sa pince, les résultats sont ensuite transférés sur ordinateur pour le traitement.

#### I-3-1-3 Mesure de la teneur en chlorophylle totale (TCT « unités SPAD »)

Le taux de chlorophylle est un paramètre important car il permet de donner une estimation des capacités photosynthétiques de la plante. Il a été mesuré sur l'avant dernière feuille, où quatre mesures par feuille ont été effectuées, par un chlorophylle mètre SPAD 502 de Minolta. SPAD pour « *Soil Plant Analysis Development* », qui utilise le ratio de l'absorbance optique de deux longueurs d'ondes, l'une rouge et l'autre au voisinage de l'infrarouge (Minolta Co. Ltd 1989 in : Li & Zhao, 2009), afin de prendre considération de la transmission de la chlorophylle et de l'épaisseur de la feuille, respectivement (Dumont, 2013).

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

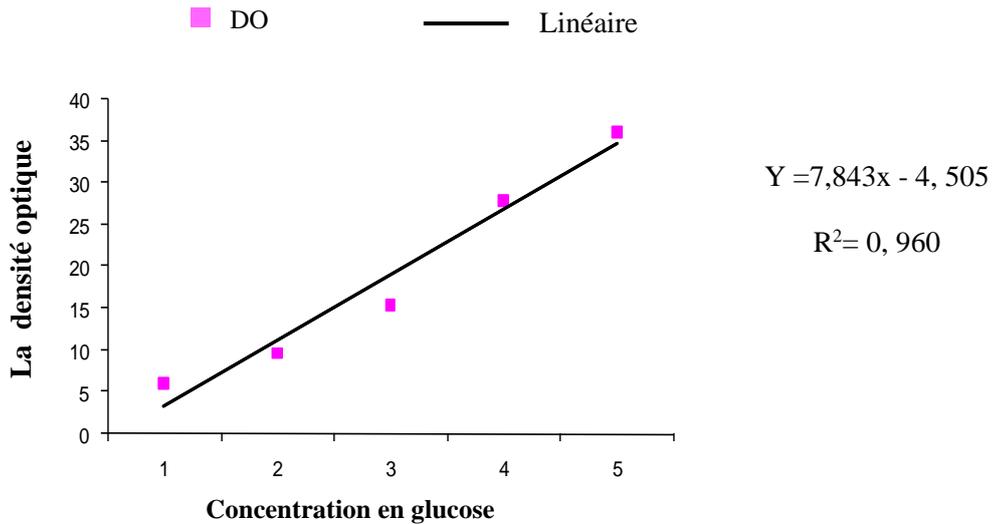
---

### I-3-2- Paramètres biochimiques

#### I-3-2-1- Dosage de la teneur en sucres solubles (TSS) « $\mu\text{g}/100\text{mg MF}$ »

Les sucres solubles totaux (saccharose, glucose, fructose, leurs dérivés méthyles et les polysaccharides) sont dosés par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique de (Dubois *et al.*, 1956). Cette méthode est réalisée sur des feuilles fraîches, elle se déroule comme suit :

- 100mg de matière fraîche sont introduite dans des tubes à essai ;
- 3ml d'éthanol à 80% sont ensuite ajouté à chaque tube, afin d'extraire les sucres ;
- Les tubes sont ainsi placés à l'obscurité et à température ambiante pendant 48h ;
- Ce temps écoulé, les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C afin d'évaporer l'alcool ;
- 20 ml d'eau distillée sont rajoutées à l'extrait, ceci constitue la solution à analyser ;
- De cette solution, 2ml sont introduits dans de nouveaux tubes à essai propres ;
- Auxquels, 1ml de phénol à 5% est rajouté (le phénol est dilué dans de l'eau distillée);
- Rapidement, 5ml d'acide sulfurique concentré 96% sont ajoutés soigneusement afin de ne pas toucher les parois du tube, le résultat est une solution orange-jaune à la surface ;
- Cette solution est homogénéisée au vortex ;
- Après 10 min de repos, les tubes sont placés au bain-marie de 10 à 20 min à une température de 30°C.
- Ainsi, les échantillons sont prêts pour les mesures d'absorbance, effectuées à une longueur d'ondes de 485 nm par un photospectromètre. Les résultats des densités optiques sont rapportés sur une courbe étalon (fig.) des sucres solubles exprimés en glucose (fig.04).



**Figure 04 :** Courbe étalon du dosage des sucres solubles

### I-3-2-2- Dosage de l'activité antioxydante de la peroxydase et de la catalase

#### a- Principe

La catalase permet elle de détoxifier directement le peroxyde d'hydrogène sans la présence d'un autre substrat, cependant son affinité pour lui est très faible et donc la détoxification ne peut se faire qu'à concentration en peroxyde élevé (plusieurs millimoles) contrairement aux peroxydases.

#### b- Extraction

Les extraits enzymatiques sont obtenus à partir de feuilles fraîches, à cet effet, 0,500mg de feuilles sont broyées dans une solution tampon phosphate (50mmol/l, pH 7), afin de conserver l'activité enzymatique. Le broyat est récupéré et centrifugé. Le surnageant récupéré est filtré, il constitue ainsi l'extrait enzymatique. Il sera conservé dans la glace durant toutes les manipulations, afin d'éviter la dégradation des enzymes.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

---

### **c-Activité Peroxydase POX (*donor* : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidoreductase, EC 1.11.1.7.)**

L'activité Peroxydase est déterminée par la méthode de Cakmak & Marschner, 1992. Lors du dosage, un témoin est préparé avec 1ml de tampon ; 1ml d'eau oxygénée et 1ml de gaïacol. Ce témoin sans extrait enzymatique permet de visualiser l'oxydation chimique du gaïacol. Pour les autres échantillons, dans un tube à spectrophotométrie 1ml d'eau oxygénée (0,01N), 1ml de gaïacol, 1ml d'extrait enzymatique sont introduits, puis mélangés par retournement du tube avec du parafilm.

La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'ondes de 470nm, toutes les 20 secondes durant 2 minutes. Le rapport de l'absorbance par unité de temps  $\Delta A/\Delta t$  est mesuré avec le coefficient directeur de la droite de tendance. L'activité est alors déterminée par la formule suivante :

$$\text{POX} = (4 \times \Delta A/\Delta t \times \text{VR} \times \text{VD} \times \text{VE}) / \epsilon \times e \times \text{PE2} \times \text{PE1} \times \text{MF}. \text{ Où}$$

**VR:** Volume réactionnel: 3 ml;

**VD:** Volume de dilution: 10ml;

**VE:** Volume de l'extrait brut: 25 ml;

$\epsilon$  : Coefficient d'extinction du gaïacol: 26.6 cm<sup>2</sup>/μmol;

**e:** Epaisseur du tube: 1 cm;

**PE2:** Volume d'extrait dilué: 1 ml;

**PE1:** Volume d'extrait brut utilisé dans la dilution: 1 ml;

**MF:** Masse de matière fraîche: 0.500 g.

Les résultats sont exprimés en μkat où: μkat (Micro-Katal) correspond à la disparition d'une μmole de substrat par seconde.

### **d-Activité Catalase CAT (Hydrogen-peroxide : hydrogenperoxide oxidoreductase, EC 1.11.1.6.)**

L'activité de la catalase est aussi déterminée par la méthode décrite par Cakmak & Marschner, 1992, avec la même formule suivant les étapes décrites plus haut, sauf que lors du dosage, 1ml du tampon phosphate est ajouté à la place du gaïacol. Les lectures d'absorbances à 240nm, sont enregistrées toutes les 15 secondes durant 2 minutes. Le coefficient d'extinction est de 39.4 cm<sup>2</sup>/μmol.

### **I-4 Traitement et analyses statistiques des résultats**

Tous les résultats de cette partie d'étude ont été traités à l'aide du logiciel d'analyse et de traitement statistique des données Minitab version 17.1.0. Les méthodes statistiques univariées ont concernés : la moyenne Arithmétique ; l'écart-type ; les valeurs minimales ( $X_{\min}$ ) et maximales ( $X_{\max}$ ) ; l'analyse de variance (facteur génotype, facteur traitement et leur interaction) ; la comparaison des moyennes et l'établissement des groupes homogènes par la méthode Tukey. La méthode statistique bivariée s'est basée sur le calcul du coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson entre les variables prises deux à deux. Les méthodes statistiques multivariées reposées sur : le test d'analyse de la variance multivariée MANOVA, pour la comparaison des cinq génotypes, entre eux, pour l'ensemble des paramètres physiologiques et biochimiques, en utilisant trois tests statistiques qui sont : Wilk's lambda, Lawley-Hotteling et Pillai's trace ; et la recherche de classes de génotypes homogènes par analyse (ou classification) hiérarchique agglomérative qui utilise la procédure du lien simple et la distance carré de Pearson.

### II- Deuxième Partie : Croisements interspécifiques et obtention d'hybrides

#### II-1 Matériel Végétal

Les hybridations ont concerné les mêmes espèces et variétés, retenues dans l'étude de la tolérance à la sécheresse (tableau 04), à savoir les espèces sauvages *Aegilops geniculata* ; *Aegilops triuncialis* ; les trois variétés de blé dur ; Oued zenati ; Hoggar et Waha. Notons que l'étude de la tolérance à la sécheresse a été réalisée simultanément avec la première année de croisement, le faible taux d'hybridation de Waha avec les espèces d'*Aegilops* a conduit à son exclusion dès la deuxième année des croisements.

#### II-2 Conduite de l'essai

##### II-2-1 Installation de l'essai

###### a- Pré-germination des graines

Les graines des géniteurs ( impliqués dans les hybridations) ont été désinfectées dans l'éthanol à 70% pendant 30 secondes, rincées puis désinfectées une deuxième fois dans une solution d'hypochlorite de sodium à 12° diluée 2 fois pendant 15 min, suivi de 3 rinçages successives à l'eau distillée.

Elles ont été placées, à l'obscurité, dans des boîtes de pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau pendant 72h, durée correspondante à la sortie des racines et du coléoptile. Le but de cette étape est d'optimiser le nombre de plantes atteignant l'âge de reproduction pour la réalisation des croisements.

###### b- Mise en culture sous serre

Après germination, les plantules ont été transférées dans des pots de 5kg contenant un mélange de sol et de sable (3V/1V) respectivement à raison de 3 plantules par pot et ce pour assurer une bonne croissance. Afin de synchroniser la floraison des parents, plusieurs dates de semis ont été effectuées à un intervalle allant d'une semaine à quinze jours.

Les pots ont été installés dans une serre en verre et arrosés périodiquement.

### II-2-2 Déroulement des croisements

La réalisation des croisements est menée à la phase d'épiaison qui se manifeste par le dégagement de l'épi de la gaine, elle coïncide, généralement, au mois d'Avril. Les croisements se réalisent sur deux grandes étapes :

#### a- La castration ou l'émasculatation des épis des *Aegilops*

Cette étape consiste en l'enlèvement des étamines des fleurs. Les épis sont raccourcis d'un quart (1/4) depuis le sommet pour ne pas abimer les stigmates et les anthères. Ensuite, délicatement les trois étamines sont enlevées afin d'éviter la libération du pollen et une fécondation éventuelle. L'épi est recouvert d'un sachet en papier sulfurisé afin de garder une humidité favorable à la pollinisation (Suenaga & Nakajima, 1989) et d'éviter une pollinisation accidentelle. Le sachet est maintenu attaché à l'épi. Préalablement sur celui-ci, le nom de l'espèce ainsi que la date de castration sont indiqués.

Pour le blé, les épis à castrer sont ceux qui viennent juste de sortir de la graine (anonyme, 2006), c'est aussi le cas des épis d'*Aegilops*. Cependant sous certaines conditions, notamment de température élevée, il a été observé que les étamines des deux espèces d'*Aegilops* présentent des étamines jaunes donc matures lors du dégagement des épis, ce qui a mené à une émasculatation délicate précocement au dégagement de la gaine.

A noter que dans notre cas (*Aegilops* parent femelle), nous n'avons pas pu enlever les fleurs centrales de l'épi, cela est dû au nombre réduit des épis par rapport au blé, surtout pour l'espèce *Aegilops geniculata* Roth où l'épi contient de 3 à 5 épillets seulement.

#### b- La pollinisation

Par définition, la pollinisation est le transport du pollen des anthères productrices aux stigmates récepteurs (Vaissière, 2002). Ainsi lors de l'anthèse ; les anthères et grains de pollen des variétés de blé dur, ont été collectés et à l'aide d'un pinceau, ils ont été mis en contact avec les fleurs femelles (fig.05).

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

---

Afin de maximiser les chances de contact direct entre pollen fécond et les stigmates récepteurs, des épis de blé avec ceux émasculés d'*Aegilops* ont aussi été rassemblés et refermés par les sachets de croisements. En effet, les grains de pollen du blé retiennent leur viabilité durant 30min depuis l'anthèse, sous les conditions optimales (20°C, 60% d'humidité relative) (De Vries, 1971).



**Figure 05 :** Pollinisation des fleurs d'un épi d'*Ae.triuncialis*, préalablement castrées.

### II-3 Traitement des résultats

Les résultats concernant les paramètres de croisements et le pourcentage de croisabilité pour chaque croisement ainsi que pour le total des cinq années, ont été calculés par le logiciel Excel, 2007.

### III- Troisième partie : Régénération d'hybrides *in-vitro* et étude cytogénétique

#### III-1 Développement des hybrides et caractérisation morphologique

Une culture d'embryons mature des hybrides a été entreprise afin de lever la dormance de ces graines, observée dans des essais de germination en conditions naturelles.

##### III-1-1 Matériel végétal

Le matériel végétal de ce travail est constitué de 15 caryopses d'hybrides interspécifiques F1, entre deux variétés de blé dur algériennes (Oued zenati et Hoggar) et deux espèces tétraploïdes du genre *Aegilops* : *Aegilops geniculata* ROTH et *Aegilops triuncialis* L.

##### III-1-2 Culture *in-vitro* des embryons matures

Les caryopses hybrides ont été désinfectés en premier lieu dans de l'éthanol à 70% pendant 30 secondes, rincés à l'eau distillé stérile et stérilisés dans une solution d'hypochlorure de sodium à 12% 2 fois diluée, pendant 15 min, suivi de 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile, sous hotte à flux laminaires.

Les caryopses ainsi désinfectés sont placés dans des boîtes de pétri stériles tapissées de papier absorbant stérilisé, ils sont imbibés d'eau distillée stérile.

Après 24h d'imbibition, les graines ont gonflés ce qui facilite le prélèvement des embryons mature sous binoculaire et sous hotte à flux laminaires.

A l'aide d'un scalpel, une petite incision horizontale est effectuée dans la partie dorsale du caryopse ce qui facilite le détachement du scutellum avec l'embryon, qui sont portés sur le bout du scalpel et transférés sur milieu de culture MS (tableau 05) coulé dans des boîtes de pétri stériles.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

**Tableau 05:** Constitution du Milieu Murashige et Skoog (MS), 1962.

Constituant	Solution mère (mg/l)	Volume à ajouter (ml/l)	Concentration finale (mg/l)
<b>Macro-éléments 20X</b>		50 ml	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33 000		1 650
KNO <sub>3</sub>	38 000		1 900
CaCl <sub>2</sub> - 2 H <sub>2</sub> O	8 800		440
MgSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	7 400		370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 400		170
<b>Micro-éléments 100X</b>		10ml	
MnSO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O	2 230		22.3
ZnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	860		8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620		6.2
KI	83		0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 2 H <sub>2</sub> O	25		0.25
CuSO <sub>4</sub> - 5 H <sub>2</sub> O	2.5		0.025
CoCl <sub>2</sub> - 6 H <sub>2</sub> O	2.5		0.025
<b>Fer 100 X</b>		10ml	
Na <sub>2</sub> EDTA	3 730		37.3
FeSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	2 780		27.8
<b>Acides aminée et vitamines 10 X</b>		10 ml	
Glycine	20 mg pour 100 ml		2.0
Ac. Nicotinique	5 mg pour 100 ml		0.5
Pyridoxine -HCl	5 mg pour 100 ml		0.5
Thiamine -HCl	1 mg pour 100 ml		0.1
<b>Sucres</b>			
Myo-inositol			100
Sucrose			30 000
<b>Agar</b>			10 000

### III-2 Etude cytogénétique : Dénombrement chromosomique

#### III-2-1 Matériel végétal

Le dénombrement chromosomique a été conduit simultanément avec la culture des embryons hybrides *in-vitro*, ainsi une pointe racinaire a été prélevée sur les six hybrides régénérés *in-vitro*, lors du premier repiquage sur tube en verre. En plus des racines des hybrides pour lesquels des anomalies de développement ont été enregistrées, à savoir ceux albinos et ceux n'ayant pas développé de coléoptiles.

#### III-2-2 Etapes de préparation de plaques métaphasiques

La technique de dénombrement chromosomique utilisée est celle décrite par (Cauderon et Gay in : Jahier et *al.*, 1992) avec quelques différences concernant les durées de certaines étapes qui se déroulent comme suit :

- **Le prélèvement**

Les pointes racinaires des hybrides ont été prélevées selon des temps aléatoires.

- **Prétraitement**

Afin de bloquer les divisions mitotiques au stade métaphase, les tissus en division sont trempés dans un agent mitoclasique.

A cet effet, les extrémités racinaires ont été plongées dans une solution de colchicine à 0,05% dans un intervalle de 5h à 5 h 45min à 5°C et à l'obscurité.

Différents temps de prétraitement ont été essayés : 5h45 min pour les deux plantules et 6h pour les extrémités racinaires.

- **Fixation**

Le rôle du fixateur est de détruire toute vie cellulaire, son action rapide bloque toute évolution des divisions cellulaires et permet de conserver l'intégrité structurale des chromosomes. Dans une solution 3V :1V d'éthanol et d'acide acétique respectivement. Au minimum 2 jours.

- **Hydrolyse Hcl**

Le but de cette étape est le ramollissement des tissus pour obtenir ultérieurement un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelles.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

---

L'acide chlorhydrique est fréquemment utilisé à cet effet, il libère les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucres de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose.

Les racines sont ainsi trempées dans HCl 1M à 60°C pendant 8min.

- **Coloration**

Le colorant le plus utilisé est le réactif de Schiff, préparé à partir de la fuchine basique, qui se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes. Elle est aussi appelée technique Feulgen.

Les racines ont été mises dans le réactif de Schiff à l'obscurité pendant 20 min environ.

- **Montage**

La zone méristématique hydrolysée et colorée est isolée et déposée sur lame, dans une goutte de carmin acétique de Belling à 1%, puis écrasée entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules.

- **Observation**

Les cellules en division sont repérées rapidement au microscope photonique à l'aide d'un objectif de faible grossissement (G) (G=10 généralement). L'observation des chromosomes est effectuée à un grossissement supérieur (G=40).

Les photos de cellules en division ont été prises à l'aide d'un microscope optique Leica DM 4000 B LED avec le logiciel Leica MM AF 2.1.

### IV- Quatrième partie : Caractérisation des hybrides interspécifiques par les marqueurs SSR

#### IV-1 Matériel végétal

Cette étude a concerné les parents impliqués dans les croisements, les parents diploïdes d'*Ae.gen.* (*Ae.comosa* et *Ae.umbellulata*), les hybrides (tableau 06). En plus d'un Hybride *Ae.gen./Semito* et son parent blé dur *Semito* qui proviennent d'une toute autre étude et dont la pollinisation, de ce dernier, a coïncidé avec la période de nos croisements à l'université de Skikda. Les chiffres pour les hybrides ayant les mêmes parents désignent qu'ils sont traités en tant que lignées.

**Tableau 06:** Liste des parents et des hybrides caractérisés par les marqueurs microsatellites

Nature de l'individu	Nom
Parent blé dur	Hog. O.Z. Semito (Sem.)
Parent <i>Aegilops</i>	<i>Ae.tri.</i> <i>Ae.gen.</i>
Ancêtres diploïdes d' <i>Ae.gen.</i>	<i>Ae.umb.</i> <i>Ae.com.</i>
Hybrides	(1) <i>Ae.gen./O.Z.</i> (2) <i>Ae.gen./Hog.</i> (3) <i>Ae.gen./O.Z.</i> (4) <i>Ae.gen./Hog.</i> (5) <i>Ae.tri./O.Z.</i> (6) <i>Ae.gen./O.Z.</i> (7) <i>Ae.tri./Hog.</i> (8) <i>Ae.gen./Sem.</i> <i>Ae.gen./O.Z.</i> (2) <i>Ae.gen./O.Z.</i> (4) <i>Ae.gen./O.Z.</i> (5) <i>Ae.tri./O.Z.</i> (1) <i>Ae.tri./O.Z.</i> (2) <i>Ae.tri./O.Z.</i> (3)

### IV-2 Extraction d'ADN génomique

L'extraction est réalisée selon la méthode CTAB, quelques modifications mineures ont été apportées. Pour les sept premiers hybrides interspécifiques (tableau 06), l'extraction a été réalisée à partir des plantules mortes conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , qui auparavant ont été régénérées par culture d'embryons matures. Pour les parents Hog, Semito, *Ae.tri* et les autres hybrides, l'extraction a été achevée à partir des graines. Pour O.Z, *Ae.gen*, *Ae.com* et *Ae.umb* elle a été réalisée à partir des feuilles.

#### IV-2-1 Principe de la Méthode

Elle consiste en le broyage du matériel végétal dans l'azote liquide pour éclater les tissus et libérer les noyaux, l'ajout d'une solution aqueuse fortement saline pour éclater les noyaux et solubiliser les acides nucléiques, élimination de l'ARN par action de la Ribonucléase, purification par extraction des protéines et des polysaccharides, précipitation sélective de l'ADN en présence d'alcool et des sels, et récupération de l'ADN.

#### IV-2-2 Protocole

- Le matériel végétal est broyé dans un mortier (stérilisé à l'autoclave) avec l'azote liquide jusqu'à sa réduction en poudre.
- Le broyat est récupéré à l'aide d'une spatule (stérilisé à l'autoclave) dans un tube eppendorf, et plongé dans l'azote liquide ;
- 900  $\mu\text{l}$  de tampon CTAB 2x additionné de Beta-mercaptoéthanol, préalablement chauffé dans un bain-marie (Julabo® SW 22) à  $65^{\circ}\text{C}$ , ont été rajoutés à chaque tube d'échantillon ;
- Puis le mélange est homogénéisé au vortex (TechnoKartell® 3S);
- Et les tubes ont été incubés 60 min dans un bain-marie à  $65^{\circ}\text{C}$  avec agitation ;
- Après l'incubation, les échantillons ont été centrifugés 15 min à 10000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$  (eppendorf® centrifuge 5415 R) ;
- Ensuite, le surnageant est récupéré dans de nouveaux tubes eppendorff de 2ml (le culot est stocké à  $4^{\circ}\text{C}$  à l'abri pour servir à une éventuelle autre extraction) ;
- Au surnageant, 800  $\mu\text{l}$  de solution Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1) ont été ajoutés ;

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

---

- Puis, les échantillons sont agités pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une tablette d'agitation (Stuart® rotator SB3) ;
- Une fois les 45 min passées, les échantillons sont centrifugés 15 min à 10000 rpm à 4°C ;
- Après centrifugation, une phase aqueuse supérieure apparaît, elle est récupérée à l'aide d'une micropipette (P1000) (Eppendorf®) dans un nouveau tube Eppendorf ;
- Ensuite, on procède à une deuxième centrifugation pendant 15 min à 10000 rpm à 4°C ;
- Et la phase supérieure aqueuse est récupérée soigneusement à l'aide d'une micropipette (P1000) dans un nouveau tube Eppendorf ;
- Par la suite, 3 à 5 µl de ARNase (10mg/ml) sont ajoutées, à l'aide d'une micropipette P10 (Eppendorf®), les tubes sont agités par inversion et incubés 30 min à 37°C ;
- L'hydrolyse des ARN est suivie par la précipitation de l'ADN par l'ajout de 540 µl d'Isopropanol froid (-20°C) ;
- Les tubes sont doucement inversés jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche, puis laissés pendant 5 à 10 min à -20°C pour la précipitation de l'ADN ;
- Une fois ce temps écoulé, les tubes sont centrifugés 10 min à 10000 rpm à 4°C.
- Le surnageant résultant de cette centrifugation est éliminé délicatement ;
- Une première solution de lavage (solution de lavage 1) est ajoutée au culot à raison de 500 µl par tube ;
- Par la suite, les échantillons sont incubés 15 min à température ambiante ;
- Puis, centrifugés 5 min à 10000 rpm à 4°C ;
- Le surnageant est éliminé et 500 µl de solution de lavage 2 sont ajoutés ;
- Les échantillons sont incubés 4 min à température ambiante ;
- Puis centrifugés 5 min à 10000 rpm à 4°C ;
- Le surnageant est éliminé et l'ADN est séché à l'air libre pendant 10 à 20 min ;
- Par la suite, le culot d'ADN est suspendu dans 30µl d'eau ultra pure ;
- Et l'ADN est ainsi stocké une nuit à 4°C avant dosage.

### IV-2-3 Dosage de l'ADN

Le dosage de la quantité d'ADN ainsi que l'estimation de sa qualité ont été réalisés grâce à un spectrophotomètre NanoDrop (Thermoscientific® 2000). Le principe est que les propriétés d'absorption des acides nucléiques peuvent être utilisées pour la détection, la quantification et l'évaluation de la pureté. La pureté approximative des préparations d'ADN double brin peut être estimée par le rapport d'absorption à 260 et 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ).

L'ADN double brin possède un  $A_{260}/A_{280} = 1,8$ , celui de l'ARN pur avoisine 2. La protéine avec un  $\lambda_{\max} = 280\text{nm}$  possède un rapport  $260/280 < 1$ . Ainsi, si un échantillon d'ADN possède un  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  ceci évoque une éventuelle contamination par l'ARN. En revanche, une valeur  $< 1,8$  évoque la présence de protéine dans l'échantillon (Turner et *al.*, 2000).

### IV-3 Réaction PCR

#### IV-3-1 Marqueurs microsatellites utilisés

Cette étude a été entreprise avec 11 amorces de microsatellites (tableau 07), localisées sur les génomes A et B du blé dur. Certains loci sont localisés sur le même chromosome, à l'instar de *Xwms* 124 et *Xwmc* 44 porté par le chromosome 1B. Les loci *Xwms* 257 et *Xwmc*25, sont tous les deux localisés sur le bras court du chromosome 2B.

Pour des raisons de temps, les réactions PCR ont été divisées et conduites au niveau de notre laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales GBBV (pour les amorces **wmc 25**, **wmc 44**, **barc 174**, **wmc 177**, **wms 135** et **wms 257**) et au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire du CRBT (Centre National de Recherche en Biotechnologie) (pour les amorces **wmc 488**, **wms 124**, **wms 332**, **wmc 161**, **wms 493**, ), de ce fait les protocoles sont différents et seront présentés séparément.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

**Tableau 07 :** Liste des marqueurs microsatellites utilisés et leurs séquences.

Locus	Localisation chromosomique	Séquence de l'amorce 5'-3'
<i>Xbarc 174</i>	7A, 1B, 7M	<b>F</b> TGGCATT TTTCTAGCACCAATACAT <b>R</b> GCGAACTGGACCAGCCTTCTATCTGTTC
<i>Xwmc 25</i>	2B, 2D	<b>F</b> TAAGATACATAGATCCAACACC' <b>R</b> 5'GGTCTTCTGGGTTTGATCCTG
<i>Xwms ou Xgwm 135</i>	1AL	<b>F</b> TGTCAACATCGTTTTGAAAAGG <b>R</b> ACACTGTCAACCTGGCAATG
<i>Xwmc 177</i>	2A	<b>F</b> AGGGCTCTCTTTAATTCTTGCT <b>R</b> GGTCTATCGTAATCCACCTGTA
<i>Xwmc 44</i>	1B	<b>F</b> GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG <b>R</b> TGTTGCTAGGGACCCGTAGTGG
<i>Xwms 257</i>	2B	<b>F</b> AGAGTGCATGGTGGGACG <b>R</b> CCAAGACGATGCTGAAGTCA
<i>Xwmc 161</i>	4A	<b>F</b> ACCTTCTTTGGGATGGAAGTAA <b>R</b> GTACTGAACCACTTGTAACGCA
<i>Xgwm 493</i>	3B	<b>F</b> TTCCATAACTAAAACCGCG <b>R</b> GGAACATCATTCTGGACTTTG

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

<i>Xwms 332</i>	2B	<b>F</b> CATTTACAAAGCGCATGAAGCC <b>R</b> GAAAACTTTGGGAACAAGAGCA
<i>Xwmc 488</i>	7A	<b>F</b> AAAGCAACCAGTTATGCCAC <b>R</b> GAACCATAGTCACATATCACGAGG
<i>Xwms 124</i>	1B	<b>F</b> GCCATGGCTATCACCCAG <b>R</b> ACTGTTCGGTGCAATTTGAG

### IV-3-2 Conduite des réactions PCR

#### IV-3-2-1 Réaction PCR au niveau du laboratoire GBBV

Le mélange réactionnel de la PCR a été préparé dans un volume final de 10µm dont la composition est présentée dans le tableau 08. Il est à noter que pour certains hybrides dont l'extraction a été réalisée à partir de la graine, que les quantités d'ADN qui se sont révélées insuffisantes ont été ajustées pour permettre une amplification, ainsi la quantité d'eau ajoutée a été aussi modifiée. L'amplification a été réalisée dans des plaques de 96 puits.

**Tableau 08:** Composition du mélange de la réaction PCR.

Composition du mélange réactionnel PCR	Volume
GoTaq Master Mix 2X	5µl
ADN matrice	1,5µl
Amorce	1µl
H <sub>2</sub> O Ultra pure	2,5 µl

### a- Programmes PCR

Plusieurs programmes PCR ont été élaborés afin de réussir l'amplification des marqueurs microsatellites (tableau 09), dont certains ont été amplifiés selon le même programme mais à des températures d'hybridation différentes.

**Tableau 09:** Les différents programmes PCR utilisés pour l'amplification des marqueurs microsatellites.

<b>Programme PCR</b>	<b>Nombre de cycle</b>	<b>Amorces</b>
3min à 94°C 1min at 94°C 1min at 60°C 2min à 72°C 10 min à 72°C	45 cycles	Xwmc 177 Xwms 257
3min à 94°C 30 sec à 94°C 30 sec à 51°C 30 sec à 72°C 7 min à 72° C	40 cycles	Xwmc25 XBARC 174 Xwmc 44
3min à 94°C 30 sec à 94°C 45 sec à 61°C 1min à 72°C 10 min à 72°C	45 cycles	Xwms 135

### b- Révélation des amplifications PCR par électrophorèse

La visualisation des résultats de l'amplification PCR a été réalisée sur gel d'agarose à 3% (P/V) par électrophorèse horizontale où :

- 3g d'agarose sont dissous dans 100ml de tampon TBE 1X et portés à ébullition dans un four à micro ondes.
- Quand la solution est moins chaude, 12µl de BET sont ajoutés, qui est un agent intercalaire avec l'ADN pour permettre la visualisation des bandes d'ADN sous UV.
- La solution est versée dans le support de la cuve de l'électrophorèse.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

- Après solidification du gel, le support est placé dans l'appareil et il est rempli de tampon TBE.
- Dans chaque puits, 10 µl de produit PCR est déposé, un marqueur de taille de 50pb (Biomatik®) a été utilisé pour permettre de calculer la taille de bandes amplifiées.
- La migration des produits PCR est effectuée sous 130V.

### c- Exploitation des résultats

Le traitement des images des gels ainsi que le calcul des tailles des bandes amplifiées en référence au marqueur de taille, à été réalisé par le logiciel *PhotoCapt 8*.

### IV-3-2-2 Réaction PCR au niveau du laboratoire du CRBT

La réaction PCR a été conduite dans un volume final de 20µl dont la composition est présentée dans le tableau 10, dans des plaques de 96 puits. L'ADN provenant de l'extraction à partir des caryopses a été dilué à 10 ng<sup>-1</sup>.µl dans un tampon TE modifié (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA).

**Tableau 10** : Mélange réactionnel de PCR au CRBT

Composition du mélange réactionnel PCR	Volume
Tampon 10X	2µl
dNTP	0,2µl
MgCl <sub>2</sub>	0,8µl
ADN matrice 100 ng	2µl
Amorce	0,8µl
Taq	0,2µl
H <sub>2</sub> O Ultra pure	q.s.p 18 µl

### a- Programme PCR :

Un seul programme à été adopté pour les cinq amorces. Cependant, les températures d'hybridations diffèrent d'une amorce à une autre, comme il est présenté dans le tableau 11. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur *I-cycler* de Bio-Rad®.

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

**Tableau 11** : Programme PCR au niveau du CRBT avec les températures d'hybridation

Programme PCR	Nombre de cycle	Amorces
5 min à 95°C	35 cycles	Xwmc161 à 61°C
30 sec à 95°C		Xgws 493 à 52°C
45sec à T° d'hybridation		Xwms 332 à 61°C
1min à 72°C		Xwms 488 à 61°C
7min at 72°		Xwms 124 à 60°C

### b- Révélation des amplifications PCR par électrophorèse

Les amplifications des réactions PCR ont été visualisées sur gel d'acrylamide à 10 % par la technique de coloration au nitrate d'argent décrite par Benbouza et *al.*, (2006). Un marqueur de taille (*Invitrogen*®) de 10pb a été utilisé pour la détermination des tailles des bandes amplifiées.

### c- Exploitation des Résultats

Le traitement des images, la détection de bande et la détermination de leurs tailles ont été réalisés par le logiciel Image lab.5.1

Le calcul de l'indice de Jacard ainsi que les analyses hiérarchiques des parents et hybrides des deux essais ont été réalisés par le logiciel NTSyspc version 97.xls. Les matrices de présence-absence de bandes préalablement élaborée ont été construites par le logiciel excel, 2007 où la présence de bandes est assignée par 1, l'absence par 0.

**RESULTATS**

**ET**

**DISCUSSION**

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### I- Caractérisation des géniteurs pour leur tolérance à la sécheresse

Nous avons entrepris dans cette partie du travail, la caractérisation de la tolérance à la sécheresse de parents impliqués dans les croisements interspécifiques ; dont trois variétés de blé dur (Waha, Oued Zenati et Hoggar) ainsi que deux espèces du genre *Aegilops* (*Aegilops geniculata* et *Aegilops triuncialis*).

#### I-1 Paramètres physiologiques

L'application d'un stress hydrique en comparaison avec des plantes témoins a permis d'enregistrer les moyennes des génotypes, pour les paramètres physiologiques récapitulées dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Moyennes des génotypes étudiés sous trois régimes hydriques, pour les paramètres physiologiques.

Génotypes		TRE	RS	TCT
<i>Ae.gen.</i>	T	87,9 ± 5,37 (A,B) (a)	23,93 ± 6,02 A (c)	39,13 ± 7,25 B (a)
	N1	88,84 ± 4,75(A,B) (a)	131,0 ± 27,4 A (b)	35,667 ± 1,680 B (a)
	N2	79,67±10,11(A,B) (b)	175,0 ± 23,8 A (a)	38,70 ± 4,97 B (a)
<i>Ae.tri.</i>	T	90,27 ± 1,90 B (a)	27,97 ± 3,96 B (c)	47,67 ± 7,98 A (a)
	N1	81,81 ± 3,79 B (a)	81,33 ± 16,56 B (b)	41,60 ± 2,65 A (a)
	N2	60,9 ± 19,1 B (b)	126,0 ± 21,7 B (a)	44,10 ± 2,27 A (a)
<b>O.Z.</b>	T	98,08 ± 56,8A (a)	8,167 ± 1,069 (B, C) (c)	36,07 ± 4,14 (A,B) (a)
	N1	94,11 ± 2,37A (a)	43,67 ± 11,59 (B, C) (b)	40,867 ± 1,650 (A,B)(a)
	N2	87,15 ± 4,96 A (b)	122,0 ± 32,4 (B, C) (a)	44,27 ± 5,40 (A,B) (a)
<b>Hog.</b>	T	96,83 ± 5,43 A (a)	1,887 ± 0,219 C (c)	41,267 ± 0,551 A (a)
	N1	87,38 ± 6,43 A (a)	36,7 ± 17,7 C (b)	45,90 ± 3,74 A (a)
	N2	84,05 ± 3,98 A (b)	81,0 ± 39,7 C (a)	45,13 ± 3,35 A (a)
<b>Wa.</b>	T	92,73 ± 4,44 A (a)	2,237 ± 1,108 C (c)	45,40 ± 2,04 A (a)
	N1	93,02 ± 7,20 A (a)	4,27 ± 2,47 C (b)	46,47 ± 2,21 A (a)
	N2	85,54 ± 4,62 A (b)	121,5 ± 29,5 C (a)	43,767 ± 0,896 A (a)
<b>Moyennes</b>		87,22	65,78	42,4

**A,B,C** : Indices de séparation des groupes homogènes pour le facteur génotype selon la méthode Tukey ;

**(a), (b), (c)** : Indices de séparation des groupes homogènes pour le facteur traitement (niveau de stress) ;

**T** : Plantes témoins ; **N1** : Niveau 1 de stress ; **N2** : Niveau 2 de stress. ***Ae.gen.*** : *Aegilops geniculata* ; ***Ae.tri.*** : *Aegilops triuncialis* ; **O.Z.** : Oued Zenati ; **Wa**: Waha. **Hog**: Hoggar. **TRE** : Teneur relative en eau ; **RS** : Résistance Stomatique ; **TCT** : Teneur en Chlorophylle totale.

### a- Teneur relative en eau

Les résultats ont révélé que la teneur relative en eau diminue avec l'intensité du stress (fig. 06a) ; les valeurs sont importantes pour les plantes témoins (T) elles varient entre 87,90% pour *Ae.gen.* à 98,08% pour O.Z. Elles diminuent légèrement pour le niveau 1 du stress (N1) de 81,81 à 94, 11% (respectivement, pour *Ae.tri.* et O.Z.), pour l'espèce *Ae. gen.* ainsi que pour la variété Waha, la TRE est très proche entre T et N1. Au deuxième niveau de stress (N2) les valeurs des TRE diminuent encore dont la plus marquée est de 60,90% pour *Ae.tri.* La plus haute valeur de TRE enregistrée au N2 est de 87,15%, chez O.Z.

L'analyse de variance a montré des différences très hautement significative entre les génotypes ainsi que pour les traitements au seuil  $\alpha = 0,001$ , l'interaction génotype X traitement, c'est révélée non significatif.

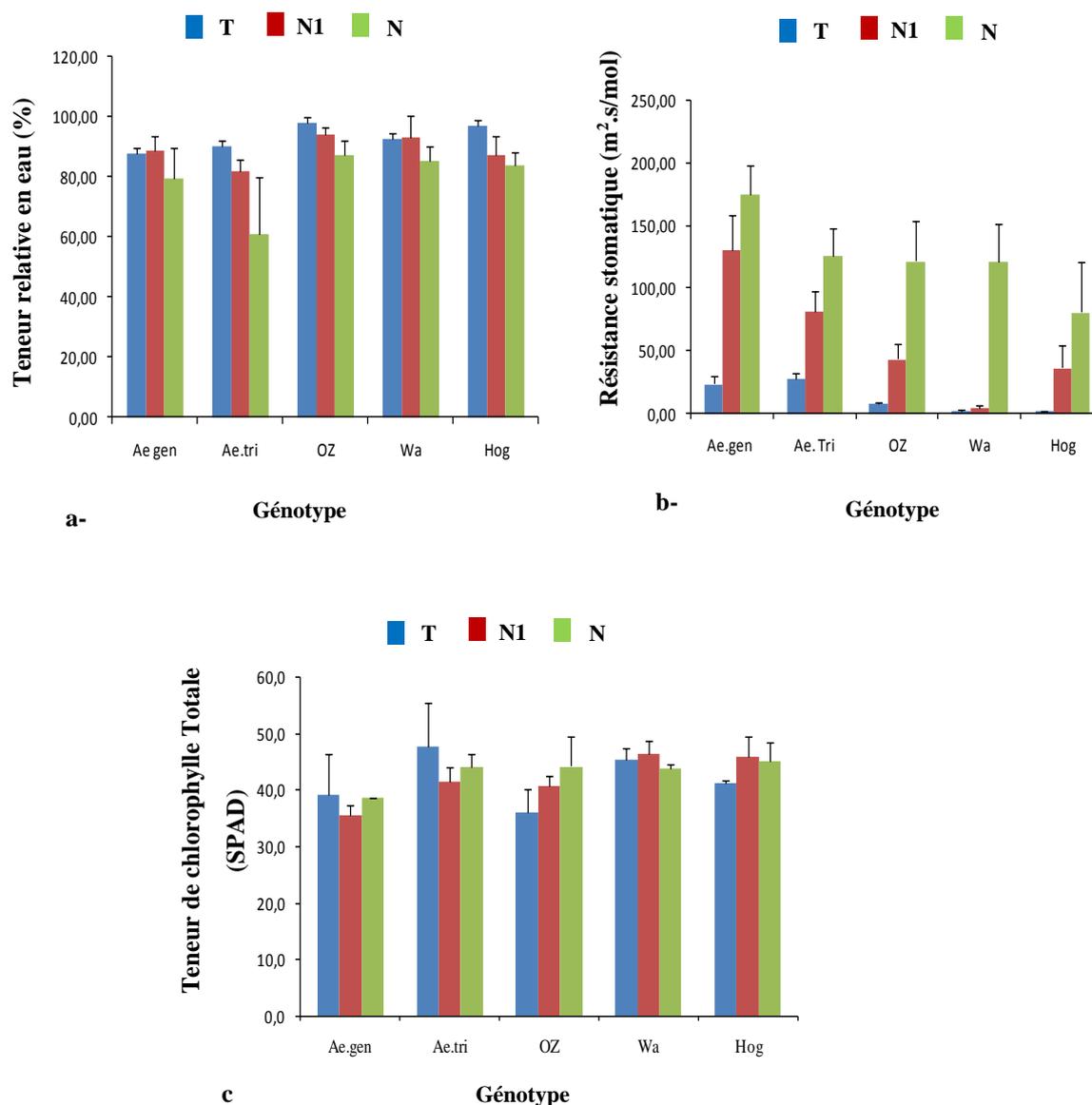
La méthode de Tukey a révélé deux groupes homogènes pour le facteur génotype ; le groupe **A** formé par O.Z, Wa, Hog et *Ae.gen.* ; le groupe **B** est formé par *Ae.gen.* et *Ae.tri.*, avec un chevauchement entre les deux groupes pour *Ae.gen.* Pour le facteur traitement, deux groupes sont dégagés le premier (**a**) formé par les plantes témoins et celles du N1, le deuxième (**b**) est formé par les plantes du niveau 2 (N2) de stress.

Ceci est la traduction de la différence du comportement entre variétés de blé et *Aegilops*, face au stress. La diminution de la teneur relative en eau a été le plus marquée pour le N2, mais considérable pour *Aegilops triuncialis*, parmi les génotypes étudiés.

### b-La résistance stomatique

Pour tous les génotypes étudiés, la résistance stomatique augmente avec la sévérité du stress (fig.06b), elle est très faible pour les témoins de l'ordre de 1, 89 m<sup>2</sup>/s/mol pour Hog. à 27,97 m<sup>2</sup>/s/mol pour *Ae.tri.* La RS augmente chez les plantes stressées du niveau 1 (4,27 à 131 m<sup>2</sup>/s/mol, chez Wa et *Ae.gen.*, respectivement) mais elle atteint des valeurs importantes pour le niveau 2 de stress (81 m<sup>2</sup>/s/mol pour Hog. à 175 m<sup>2</sup>/s/mol chez *Ae.gen.*).

L'analyse de variance des génotypes et des niveaux de stress s'est révélée très hautement significative, l'interaction génotype x traitement quant à elle s'est révélée hautement significatif. La méthode de Tukey a révélé trois groupes homogènes pour le facteur génotype ; le groupe **A** constitué d'*Ae.gen.* ; **B** représenté par *Ae.tri.*, le groupe **C** représenté par Wa. et Hog. Toutefois, un chevauchement se manifeste par la présence de la variété O. Z. dans les deux groupes **B** et **C**.



**Figure 06 :** Effet du stress hydrique sur les paramètres physiologique : **a-** Teneur relative en eau ; **b-** Résistance stomatique ; **c-** Teneur de chlorophylle totale.

T : Plantes témoins ; N1 : Niveau 1 de stress ; N2 : Niveau 2 de stress.

*Ae.gen.* : *Aegilops geniculata* ; *Ae.tri.*: *Aegilops triuncialis*; **O.Z.**: Oued Zenati; **Wa**: Waha ;

**Hog**: Hoggar.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Pour le facteur traitement, trois groupes homogènes sont révélés : **(a)**, est constitué du N2 de stress ; **(b)** par le N1 de stress et le groupe **(c)** constitué par les témoins.

Ceci montre clairement la différence de réponse des deux espèces face au stress, pour ce paramètre, où les *Aegilops* ont affiché des moyennes de résistance élevées et une réponse rapide dès l'installation du stress au N1 (surtout pour *A.gen*) en comparaison avec les blés durs où la résistance ne s'est avérée importante qu'au N2.

### **c- La teneur en chlorophylle totale**

Des réponses différentes aux stress pour ce paramètre ont été enregistrées entre les espèces d'*Aegilops* et les variétés de blés durs. (fig.06c). En effet, *Ae. gen.* et *Ae. tri.* présentent des valeurs importantes de la teneur en chlorophylle pour les plantes témoins (39,1 et 47,7 SPAD, respectivement) puis une diminution au N1 (35,7 et 41,6 SPAD, respectivement) mais une augmentation au N2 (38,7 et 44,1 SPAD, respectivement). Inversement pour Hog. et Wa., le TCT augmente au N1 à 45,9 et 46,5 SPAD, respectivement (contre 41,3 et 45,4 pour les T). Mais diminue au N2 surtout pour Wa à 43,8 SPAD. Alors que chez O.Z. le TCT augmente avec la sévérité du stress (36,1 SPAD pour T, 40,9 SPAD au N1 et 44,3 SPAD au N2).

Ainsi, l'analyse de variance a révélé une différence hautement significative entre les 5 génotypes étudiés, alors que les niveaux de stress ainsi que l'interaction génotype x traitement (niveau de stress) se sont révélés non significatif.

La méthode de Tukey a révélé 2 groupes homogènes pour le facteur génotype ; le groupe **A** constitué de Wa., *Ae. tri.* et Hog. ; **B** représenté par *Ae. gen.* La variété O. Z. est présente à la fois au groupe **A** et **B**. Pour le facteur traitement la méthode a révélé un seul groupe **(a)** rassemblant les témoins, N1 et N2 de stress.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### I-2 Les paramètres biochimiques

Le Tableau 13 regroupe les moyennes calculées pour les paramètres biochimiques des cinq géotypes étudiés.

**Tableau 13:** Moyennes des géotypes étudiés sous trois régimes hydriques, pour les paramètres biochimiques

Géotypes		TSS	POX	CAT
<i>Ae.gen.</i>	T	0,76500 ± 0,00265 A (a)	1,617 ± 0,318 (A,B) (a)	0,1193 ± 0,0506 A (a)
	N1	0,7930 ± 0,0493 A (a)	2,820 ± 0,423 (A,B) (a)	0,1343 ± 0,0352 A (a)
	N2	0,7903 ± 0,0684 A (a)	2,978 ± 0,784 (A,B) (a)	0,1473 ± 0,0266 A (a)
<i>Ae.tri.</i>	T	0,81333 ± 0,00462 A (a)	3,436 ± 1,153 A (a)	0,1347 ± 0,0309 A (a)
	N1	0,8640 ± 0,0489 A (a)	3,51 ± 2,27 A (a)	0,08600 ± 0,00866 A (a)
	N2	0,7560 ± 0,0505 A (a)	4,81 ± 2,91 A (a)	0,1320 ± 0,0266 A (a)
<b>O.Z.</b>	T	0,8633 ± 0,0515 A (a)	0,959 ± 0,521 A (a)	0,09633 ± 0,00462 A (a)
	N1	0,8393 ± 0,0664 A (a)	1,399 ± 0,507 A (a)	0,0990 ± 0,0609 A (a)
	N2	0,8827 ± 0,0210 A (a)	0,699 ± 0,233 A (a)	0,1447 ± 0,0200 A (a)
<b>Hog.</b>	T	0,9800 ± 0,0400 A (a)	2,447 ± 1,328 A (a)	0,1570 ± 0,0308 A (a)
	N1	0,7993 ± 0,0703 A (a)	1,132 ± 0,412 A (a)	0,0940 ± 0,0246 A (a)
	N2	0,7990 ± 0,0799 A (a)	2,098 ± 1,032 A (a)	0,1803 ± 0,0761 A (a)
<b>Wa.</b>	T	0,9233 ± 0,1387 A (a)	1,444 ± 1,037 A (a)	0,1297 ± 0,0266 A (a)
	N1	0,7777 ± 0,0517 A (a)	1,248 ± 0,648 A (a)	0,1297 ± 0,0273 A (a)
	N2	0,8590 ± 0,0834 A (a)	1,147 ± 0,468 A (a)	0,1017 ± 0,0488 A (a)
<b>Moyennes</b>		0,834	2,116	0,126

**A,B,C** : Indices de séparation des groupes homogènes pour le facteur géotype selon la méthode Tukey ;

**(a), (b), (c)** : Indices de séparation des groupes homogènes pour le facteur traitement (niveau de stress) ;

**T** : Plantes témoins ; **N1** : Niveau 1 de stress ; **N2** : Niveau 2 de stress. ; ***Ae.gen.*** : *Aegilops geniculata* ; ***Ae.tri.*** : *Aegilops triuncialis* ; **O.Z.** : Oued Zenati ; **Wa** : Waha ; **Hog** : Hoggar. **TSS** : Teneur en sucres solubles ; **POX** : Activité Peroxydase ; **CAT** : Activité Catalase.

### a- La teneur en sucres solubles

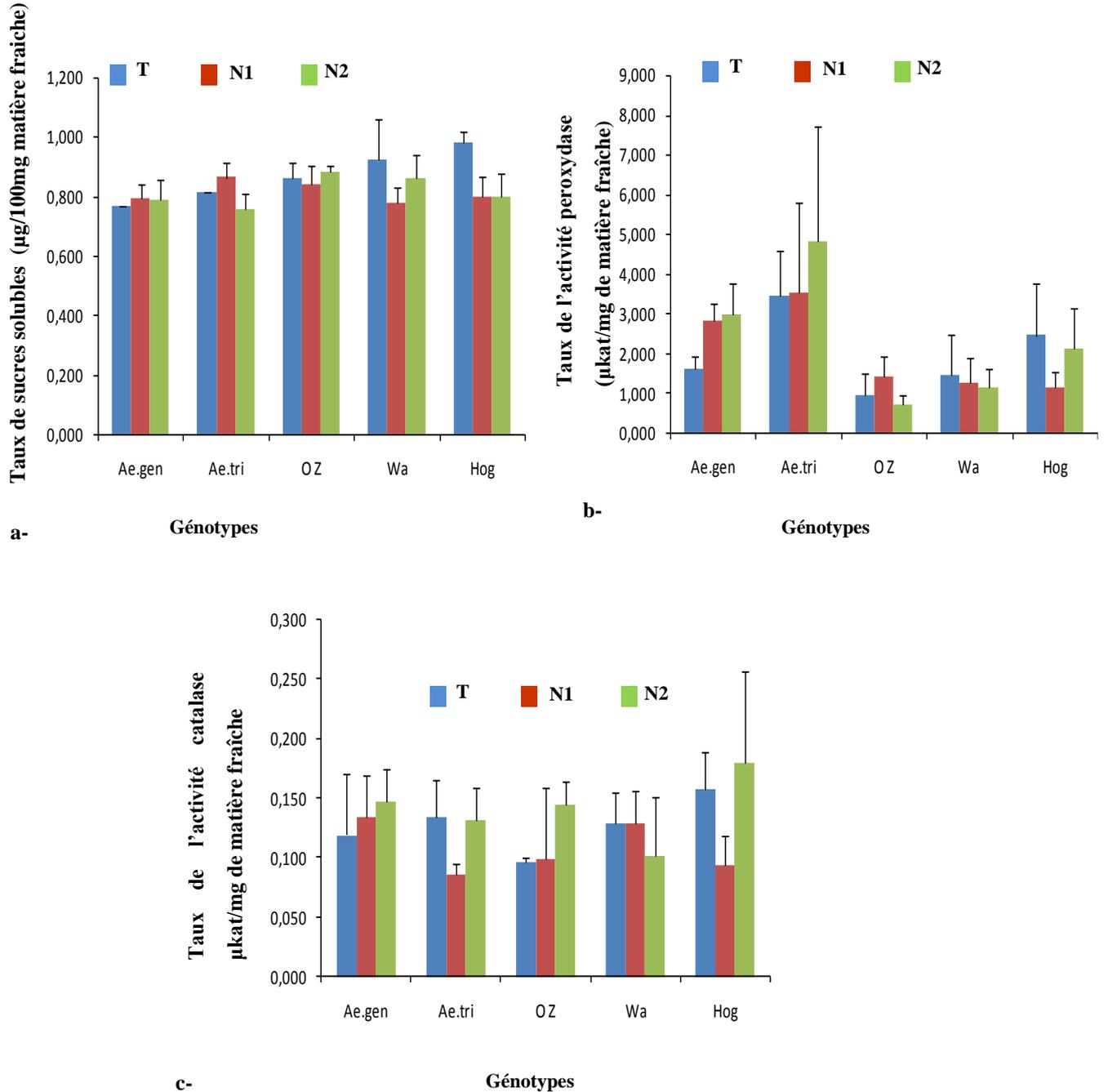
Les comportements face au stress ont été très variables entre les génotypes étudiés (fig.07a). Ainsi, chez *Ae. gen.* et *Ae. tri.* une accumulation des sucres solubles chez les plantes stressées est observée (0,765 et 0,813 µg/100g de MF pour T, 0,793 et 0,864 µg au N1, 0,790 et 0,756 au N2, respectivement) mais avec une diminution chez *Ae. tri.* au deuxième niveau de stress.

Pour O.Z. et Wa. une diminution du TSS chez les plantes stressées N1 est enregistrée (0,839 et 0,778 µg, respectivement contre 0,863 et 0,923 µg pour T). Mais une augmentation du TSS au deuxième niveau de stress N2 est constatée de 0,883 et 0,859 µg, respectivement. Alors que la variété Hog. présente une teneur très élevée pour les plantes témoins (0,989 µg) qui diminue au N1 à 0,799 µg mais reste stable à cette valeur au N2.

L'analyse de variance révèle, ainsi, des différences significatives entre les 5 génotypes, les niveaux de stress ainsi que l'interaction génotype x traitement. La méthode de Tukey a révélé un seul groupe homogène A pour le facteur génotype (regroupant les 5 génotypes étudiés) ainsi que pour le facteur traitement (a), rassemblant témoins N1 et N2 de stress.

### b-Dosage de l'activité peroxydase

Des comportements différents des génotypes étudiés (fig.07b) pour l'activité de la peroxydase POX ont été enregistrés. Ainsi, *Ae. gen.* et *Ae. tri.* présentent une augmentation de l'activité POX chez les plantes stressées, avec des valeurs plus élevées pour *Ae. tri.* (2,820 et 3,511 µkat/mg de MF au N1 ; 2,977 et 4,808 µkat au N2, contre 1,617 et 3,436 µkat pour T, respectivement). Inversement, la variété Wa présente une déclinaison de l'activité POX suivant la sévérité du stress (1,444 µkat pour T ; 1,248 µkat au N1 et 1,147 µkat au N2). Pour la variété O.Z l'activité POX affiche une augmentation au N1 1,398 µkat contre 0,959 µkat pour T, puis une diminution au N2 à une valeur de 0,699 µkat. Contrairement, chez Hog. L'activité POX enregistre une diminution au N1 (1,132 µkat) mais augmente à 2,098 µkat au N2, néanmoins, cette augmentation reste inférieure à la valeur enregistrée pour T de 2,447 µkat.



**Figure 07:** Influence du stress hydrique sur les paramètres biochimiques :

**a-** Teneur en sucres solubles ; **b-** Activité peroxydase ; **c-** Activité catalase.

**T** : Plantes témoins ; **N1** : Niveau 1 de stress ; **N2** : Niveau 2 de stress.

**Ae.gen.** : *Aegilops geniculat* ; **Ae.tri.** : *Aegilops triuncialis* ; **O.Z.** : Oued Zenati ;

**Wa** : Waha ; **Hog** : Hoggar.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

L'analyse de variance s'est révélée très hautement significative entre les différents génotypes, alors que les traitements ainsi que l'interaction génotype x traitement se sont révélés non significatifs. La méthode de Tukey a révélé deux groupes homogènes pour le facteur génotype ; le groupe **A** constitué d'*Ae.tri.* ; le groupe **B** rassemble Hog., Wa. et O.Z. Un chevauchement entre les deux groupes est constaté où *Ae.gen* est représentée dans les deux groupes.

Pour le facteur traitement, un seul groupe homogène (**a**) est révélé, regroupant témoins N1 et N2 de stress.

### **c-Dosage de l'activité catalase**

L'activité Catalase CAT présente des différences entre les génotypes étudiés (fig.07c). Ainsi, *Ae. tri.* et Hog. enregistrent une diminution puis une augmentation de l'activité catalase chez les plantes stressées (0,086  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  et 0,094  $\mu\text{kat}$  au N1 ; 0,132 et 0,180  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  au N2, respectivement), contre 0,135 et 0,157  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  pour les plantes témoins. Pour *Aeg. gen* et O.Z., l'activité enzymatique augmente avec le niveau de stress, de 0,119 et 0,096  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  pour T, respectivement, à 0,135 et 0,099  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  au N1, puis à 0,147 et 0,145  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  au N2. La variété Wa. présente une constante activité lors de la première semaine de stress (0,129  $\mu\text{kat}/\text{mg}$  pour T et N1) mais qui diminue au cours de la deuxième semaine de stress à 0,102  $\mu\text{kat}/\text{mg}$ .

Pour ce paramètre, les génotypes, les traitements ainsi que leurs interactions se sont révélés non significatives.

La méthode de Tukey a révélé un seul groupe homogène **A** pour le facteur génotype (regroupant 5 génotypes étudiés) ainsi que pour le facteur traitement (**a**) (témoins N1 et N2 de stress).

### **I-3 Recherche de corrélation entre les paramètres physiologiques et biochimiques : La méthode statistique bivariée**

L'établissement d'une matrice (tableau 14) basée sur le calcul du coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson entre les paramètres physiologiques et biochimiques pris deux à deux, montre l'existence de corrélations positives et d'autres négatives. Cependant, deux corrélations significatives positives sont enregistrées au seuil ( $\alpha = 0,05$ ) ; l'une entre l'activité peroxydase (POX) et la résistance stomatique (RS) (0,103\*), résultant

## Chapitre III : Résultats et Discussion

d'une intime augmentation de ces deux paramètres avec la sévérité du stress, notamment pour les *Aegilops* (fig. 07b et fig. 06b, respectivement) ; l'autre entre la TRE et TSS (0,319\*). En revanche une corrélation significative négative au seuil ( $\alpha = 0,05$ ), est enregistrée entre TRE et POX (-0,295\*). Alors qu'une corrélation très hautement significative au seuil ( $\alpha = 0,01$ ) est constatée entre TRE et RS (-0,487\*\*\*).

**Tableau 14:** Matrice des corrélations linéaires des paramètres physiologiques et biochimiques

	TCT	TSS	CAT	POX	RS
TSS	0,030				
CAT	0,176	0,030			
POX	0,068	-0,121	0,152		
RS	-0,154	-0,247	0,088	0,301*	
TRE	-0,082	0,319*	-0,137	-0,295*	-0,487***

**TRE:** Teneur relative en eau ; **RS :** Résistance stomatique ; **TCT :** Teneur en chlorophylle totale ; **TSS :** Teneur en sucres solubles ; **CAT :** Activité catalase ; **POX :** Activité Peroxydase

### I-4 Comparaison des comportements des génotypes face au stress hydrique : Test d'analyse multivariée

Le test d'analyse de la variance multivariée (MANOVA) a été réalisé par trois tests, celui de Wilk's, de Lawley-Hotelling et de Pillai's (tableau 15) pour les cinq génotypes étudiés, en fonction des paramètres physiologiques et biochimiques mesurés. Ces tests ont révélé des différences très hautement significative pour les génotypes ainsi que pour les traitements, alors que l'interaction génotype X traitement c'est révélée juste significative pour les tests Wilk's et Lawley-Hotelling et non significative pour le test de Pillai's. Ceci indique clairement les différences de réponses entre les blés et les *Aegilops* face au stress hydrique.

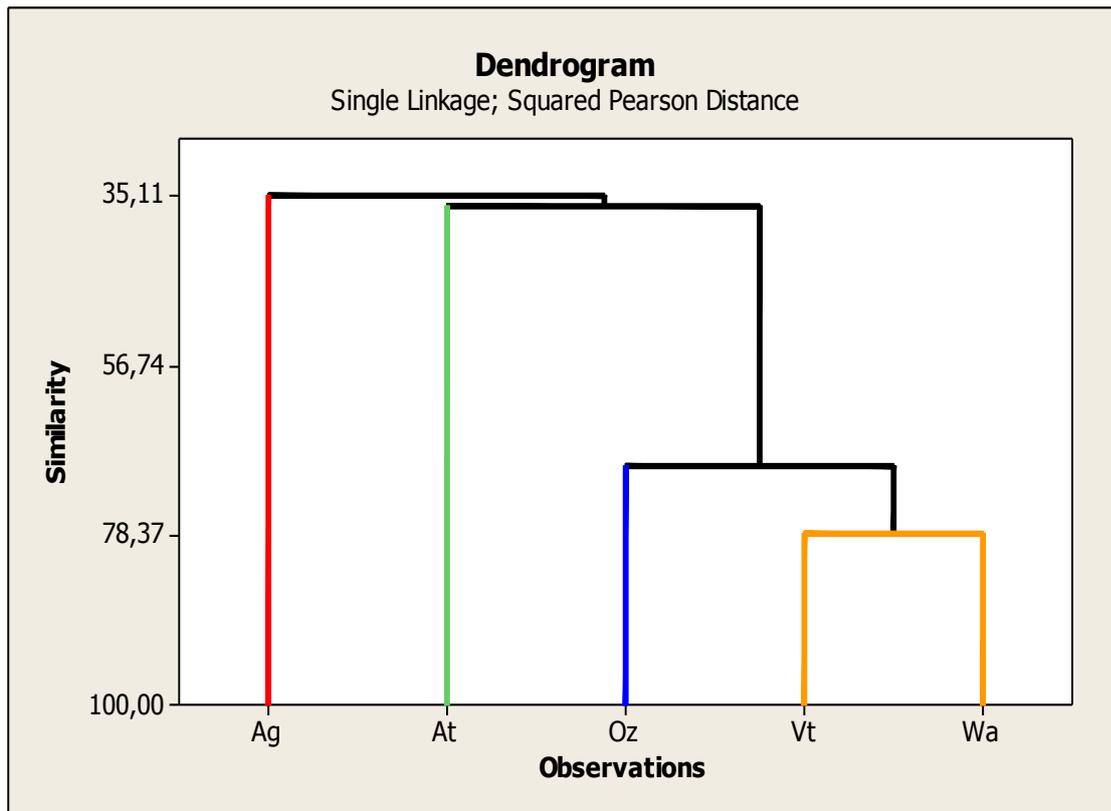
**Tableau 15:** Tests d'analyses multivariées des cinq génotypes pour les paramètres mesurés

Test	Valeur observée du test	F obs	P
Wilks'	0,10653	4,041	0,000***
Lawley-Hotelling	3,29823	4,931	0,000***
Pillai's	1,64592	3,075	0,000***

$p \leq \alpha = : (***)$  différences très hautement significatives.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

Le regroupement des 5 génotypes, au moyen d'un dendrogramme à l'aide du lien simple et de la distance carrée de Pearson et pour un niveau de similarité minimale de 80 % (fig.08) permet de dégager quatre groupes homogènes distincts qui sont les suivants : le premier groupe constitué d'*Ae.gen.*, le deuxième d'*Ae. tri.*, le troisième constitué d'O.Z. et le quatrième groupe de Hog. et Wa.



**Figure 08 :** Dendrogrammes de regroupement des génotypes étudiés par la distance carrée de Pearson. **Ag:** *Aegilops geniculata* ; **AT:** *Aegilops triuncialis*; **O.Z. :** Oued Zenati ; **Vt :** Hoggar (ex. Vitron); **Wa:** Waha.

### I-5 Discussion

L'étude de la tolérance au stress hydrique confirme, le haut potentiel des espèces d'*Aegilops* à tolérer le stress hydrique notamment celui d'*Ae. gen.*, ce qui corrobore avec les travaux de (Rekika et al., 1998; Zaharieva et al., 2001; Baalbaki et al. 2006) et l'adaptation de la variété O.Z. au type de stress méditerranéen (Ali Dib et al., 1992; Meziani et al., 1993). Toutes les variétés ont affiché des valeurs élevées de TRE, même en condition de stress, à l'exception d'*Ae.tri*. En effet, la capacité de maintenir des TRE élevées en présence de stress hydrique est reliée à la capacité d'ajustement osmotique ou à une grande élasticité des tissus de la plante (Bousbaa et al., 2013). L'ouverture ou la fermeture des stomates, sensibles aux concentrations de l'acide abscissique produit par les racines, est l'élément le plus affecté par le stress hydrique de tous ceux en relation avec l'eau de la plante (Anjum et al., 2011 ; Shang et al., 2016). En fermant ses stomates, la plante économise l'eau disponible et préserve ainsi l'intégrité cellulaire, constituant de ce fait, l'une des meilleures stratégies de tolérance au stress hydrique (Djekoun & Ykhlef, 1996; Ykhlef et al., 2000 ; Bousbaa et al., 2013; Shang et al., 2016).

La fermeture des stomates conduit, par conséquent, à une baisse de la photosynthèse (Maurino & Peterhansel, 2010; Gallais, 2015) et à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène où la peroxydase joue un rôle important dans leur élimination, notamment en conditions de stress hydrique (Anjum et al., 2011).

### I-6 Conclusion

La caractérisation des géniteurs pour leur tolérance au stress hydrique durant la période de croisement, confirme notre choix des géniteurs où nous avons observé la supériorité de la tolérance du stress hydrique des *Aegilops* par rapport aux blés et l'adaptation des variétés de blés dur au climat des zones céréaliennes algériennes.

La durée de stress hydrique appliquée semble moyenne, de ce fait, à court terme les plantes ont répondu par une fermeture rapide des stomates, qui a remédié à la perte d'eau par transpiration, maintenant ainsi une TRE élevée favorable au bon fonctionnement cellulaire.

### II- Croisements interspécifiques et obtention d'hybrides

L'étude physiologique et biochimique des paramètres du stress hydrique nous a permis de retenir les deux espèces du genre *Aegilops* (*Aegilops geniculata* et *Aegilops triuncialis*) et deux variétés de blé durs (Oued Zenati et Hoggar) comme les géniteurs potentiels pour l'obtention d'hybrides interspécifiques, étape primordiale, des programmes de l'introgression génétique des gènes de tolérances depuis les espèces apparentées.

Le tableau 16 représente la croisabilité des deux espèces du genre *Aegilops* avec les deux variétés de blé dur, qui est exprimé en pourcentage de nombre d'hybrides obtenus par rapport au nombre de fleurs pollinisées. La variété Waha n'a été utilisée que durant l'année 2010, même année de la réalisation de l'étude du stress hydrique.

81 hybrides ont été obtenus sur un total de 2077 fleurs pollinisées durant cinq années, ce qui reflète un taux faible de croisabilité de 3,9 %. Le nombre d'hybrides ainsi que le pourcentage de croisabilité diffèrent d'une année à une autre mais aussi d'un croisement à un autre, combinant des parents différents. Le nombre élevé d'hybrides obtenus a été enregistré durant l'année 2012 avec 51 graines, soit un taux de croisabilité de 13,28%. Par contre, celui le plus faible a été enregistré durant l'année 2013 avec seulement 3 hybrides, et donc un taux de 0,85% de croisabilité, alors que ce dernier varie de 0,95% à 4,76% pour les autres années.

La combinaison des parents *Aegilops geniculata* avec le parent mâle Oued Zenati a donné 40 graines hybrides durant l'année 2012 (soit un taux de croisabilité de 23,95%), 10 dans l'année 2015, 3 au cours de l'année 2013, 1 au cours de l'année 2011 et 0 au cours de l'année 2010.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

**Tableau 16** : Résultats des croisements de 5 années entre les espèces d'*Aegilops* et les variétés de blé dur.

	Croisement	NE	NEP	NFP	NN	NHYBRIDE	% Croisabilité
<b>Année 2010</b>							
	<i>Ae.gen/W</i>	9	24	51	45	0	0
	<i>Ae.gen /OZ</i>	9	17	44	34	1	2,27
	<i>Ae.tri /OZ</i>	6	21	41	31	1	2,44
	<i>Ae.gen/ H</i>	2	6	12	10	0	0
	<i>Ae.tri/H</i>	8	26	52	33	3	5,77
	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>94</b>	<b>200</b>	<b>153</b>	<b>5</b>	<b>2,5</b>
<b>Année 2011</b>							
	<i>Ae.gen/O.Z</i>	7	23	44	35	0	0
	<i>Ae.tri/O.Z</i>	11	41	82	61	6	7,32
	<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>64</b>	<b>126</b>	<b>96</b>	<b>6</b>	<b>4,76</b>
<b>Année 2012</b>							
	<i>Ae.gen/O.Z</i>	35	83	167	79	40	23,95
	<i>Ae.tri/O.Z</i>	32	109	217	173	11	5,07
	<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>192</b>	<b>384</b>	<b>252</b>	<b>51</b>	<b>13,28</b>
<b>Année 2013</b>							
	<i>Ae.gen/O.Z</i>	4	13	26	14	3	11,53
	<i>Ae.gen/H</i>	23	55	110	95	0	0

### Chapitre III : Résultats et Discussion

	<i>Ae.tri</i> /H	27	97	194	160	0	0
	<i>Ae.tri</i> /O.Z	4	12	24	23	0	0
	<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>177</b>	<b>354</b>	<b>292</b>	<b>3</b>	<b>0,85</b>
<b>Année 2015</b>							
<b>Constantine</b>	<i>Ae.gen</i> /H	7	19	38	31	0	0
	<i>Ae.gen</i> /O.Z	84	248	486	317	5	1,02
	<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>267</b>	<b>524</b>	<b>348</b>	<b>5</b>	<b>0,95</b>
<b>Skikda</b>	<i>Ae.gen</i> /O.Z	53	140	265	235	5	1,89
	<i>Ae. Gen</i> /H	6	17	34	21	4	11,76
	<i>Ae.tri</i> /O.Z	13	54	100	73	0	0
	<i>Ae.tri</i> /H	12	48	90	76	2	2,22
	<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>259</b>	<b>489</b>	<b>405</b>	<b>11</b>	<b>2,25</b>
	<b>Total 5 ans</b>	<b>352</b>	<b>1053</b>	<b>2077</b>	<b>1546</b>	<b>81</b>	<b>3,9</b>

**NE** : Nombre d'épis pollinisés ; **NEP** : Nombre d'épillets pollinisés ; **NFP** : Nombre de fleurs pollinisés ; **NN** : Nombre de nouaisons ;  
**NHYBRIDE** : Nombre d'hybrides obtenus.

### II-1 Affinité de croisement entre les parents

Le tableau 17 regroupant les résultats des cinq années selon les quatre combinaisons possibles des croisements, fait ressortir aux mieux les différences d'affinité de croisements entre les géniteurs. Le croisement entre *Aegilops triuncialis* et Oued zenati, vient en deuxième position quant à la production de d'hybrides (18 soit un taux de 3,88%) après la combinaison d'*Aegilops geniculata* et Oued zenati produisant le nombre le plus important d'hybrides (54 soit un taux de 5,23%). Les combinaisons d'*Aegilops geniculata* et de Hoggar ainsi que celle d'*Aegilops triuncialis* et de Hoggar n'ont donné qu'un nombre faible d'hybrides.

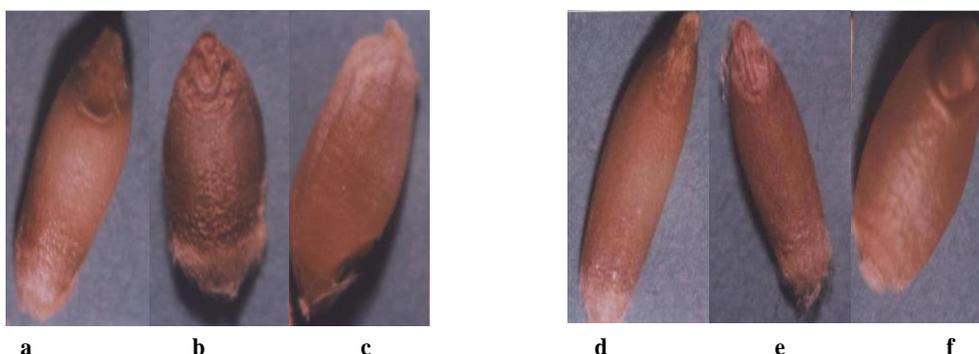
**Tableau 17:** Résultats des croisements selon les combinaisons parentales.

Croisement	NE	NEP	NFP	NN	NHYBRIDE	% Croisabilité
<i>Ae.gen</i> /OZ	192	524	1032	714	54	<b>5,23</b>
<i>Ae.gen</i> / H	38	97	194	157	4	<b>2,06</b>
<i>Ae.tri</i> /OZ	66	237	464	361	18	<b>3,88</b>
<i>Ae.tri</i> /H	47	171	336	269	5	<b>1,49</b>

NE : Nombre d'épis pollinisés ; NEP : Nombre d'épillets pollinisés ; NFP : Nombre de fleurs pollinisés ; NN : Nombre de nouaisons ; NHYBRIDE : Nombre d'hybrides obtenus.

### II-2 Récolte des hybrides

Tous les hybrides ont été récoltés en caryopses ressemblant au parent femelle *Aegilops* (fig.09) de différentes tailles, majoritairement avec un endosperme normal, quelques uns seulement étaient échaudés.



**Figure 09:** Photographies des caryopses hybrides récoltés en comparaisons avec ceux des parents. **a-***Ae.gen.* **b-** Hybride *Ae.gen./Hog.* **c-***Hog.* **d-** *Ae.tri.* **e-** Hybride *Ae.tri./O.Z.* **f-** *O.Z.*

### II-3 Discussion

Les rares travaux dédiés aux croisements interspécifiques où les espèces du genre *Aegilops* sont prises en tant que parent femelle, rapportent la faiblesse d'obtention de tels hybrides, qui semble plus favorable en conditions de champs (Guadagnuolo et al., 2001).

Beaucoup de critères influencent l'obtention d'hybrides fertiles et d'une progéniture backcross pour l'introgession entre deux genres, dont les relations génétiques, le niveau de ploïdie et la direction d'hybridation (Waines & Hegde, 2003). Le succès d'obtention d'hybrides dépend en grande partie des génotypes parentaux impliqués dans les croisements. Les différences d'affinité de croisements des espèces du genre *Aegilops* et les variétés de blé sont très observés (Guadagnuolo et al., 2001; Waines & Hegde, 2003 ; Stone & Peeper, 2004; Hadzhiivanova et al., 2012 ; Ykhlef et al., 2007).

Dans plusieurs travaux, le partage entre le blé tendre et le parent sauvage du génome D a permis l'appariement des chromosomes homéologues et l'obtention ainsi d'hybrides fertiles (Snyder et al., 2000; Schoenenberger et al., 2005; Martins et al., 2015). L'effet du locus *Ph1* est supprimé uniquement, chez quelques espèces diploïdes d'*Aegilops* (Al-Kaff et al., 2007), permettant ainsi l'appariement des chromosomes homéologues chez l'hybride (Waines & Hegde, 2003).

### II-4 Conclusion

L'obtention d'hybrides, même avec un taux faible de 3,9%, indique la possibilité de croisements interspécifiques entre les espèces du genre *Aegilops* et le blé dur, dans le sens où *Aegilops* est le parent femelle. La recherche d'accessions d'*Aegilops* présentant plus de croisabilité permettra de réussir ces croisements.

### III-Régénération d'hybrides *in-vitro* et étude cytogénétique

#### III-1 Développement des hybrides et caractérisation morphologique

Plusieurs traitements par le froid ainsi que la scarification des graines n'ont pas permis la germination des hybrides. Seule, la culture d'embryons matures a permis la germination et la régénération de plantules hybrides (tableau 18). Les embryons prélevés étaient de tailles différentes, quelques uns très petits ne dépassant pas un millimètre de diamètre.

**Tableau 18 :** Germination et régénération de plantules hybrides par culture d'embryons matures.

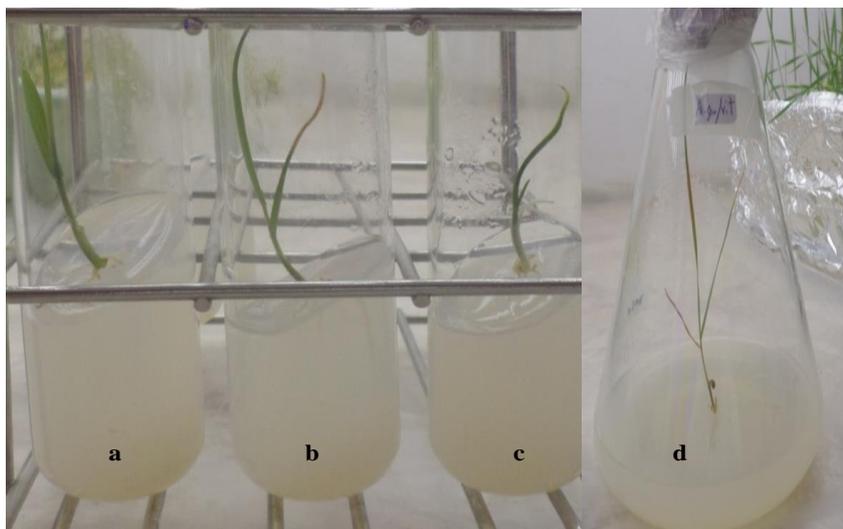
Hybrides	Embryons mis en culture	Taux de germination %	Nombre de plantules régénérées	Nombre de plantes adultes
<i>Ae gen./O.Z</i>	7	100%	2	0
<i>Ae gen/Hog</i>	5	100%	2	0
<i>Ae tri/Hog</i>	2	100%	1	0
<i>Ae tri/O.Z</i>	1	100%	1	0
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>100%</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

A partir de quinze embryons, six plantules ont été régénérées, ce qui se traduit par un taux relativement moyen de régénération de 40%. Cependant, aucune plante adulte n'est obtenue. Après une germination réussie (100%) de tous les hybrides, ceux dont la croissance était normale (fig.10a) ont régénéré les plantules. Alors que pour d'autres, des anomalies ont été détectées conduisant à la mort précoce, il s'agit d'absence d'édification du système racinaire (fig.10.b) ; d'absence de développement du coléoptile (fig.10.c) ; et la régénération de coléoptiles albinos (fig.10.d).

La mort des plantules, à la phase d'acclimatation, survenue à différents stades de croissance (le plus avancé est celui du tallage pour l'hybride *Ae.gen./ Hog.*) est due à la faible croissance des plantules (plantules chétives, feuilles présentant une surface très petite, système racinaire faible) (fig.11). Cependant, les plantules hybrides ont aussi exhibé, dès les premiers stades de développement, des traits morphologiques caractéristiques des parents femelles *Ae.gen.* et *Ae. tri.*, à l'instar d'une préfoliation tordue et de la couleur des feuilles.



**Figure 10:** Photographies d'embryons matures d'hybrides en germination sur milieu MS. **a-** *Ae.tri./O.Z.*, deux semaines de culture. **b-** *Ae.gen./O.Z.*, deux semaines de culture. **c-** *Ae.tri./Hog.*, une semaine de culture. **d-** Un autre hybride *Ae.gen./O.Z.*, quatrième semaine de culture.



**Figure 11:** Plantules hybrides régénérées. **a:** *Ae.gen./O.Z.* **b:** *Ae.tri./Hog.* **c:** *Ae.gen./Hog.* (six semaines de culture). **d-** *Ae.gen./Hog.* (douze semaines de culture).

### III-2 Dénombrement chromosomique

Afin de procéder au dénombrement chromosomique de certains hybrides issus de la culture *in-vitro*, plusieurs essais de traitement des pointes racinaires à la colchicine ont été effectués, et ce, à différents intervalles de temps afin d'optimiser l'obtention de plaques métaphasiques. A défaut de bain réfrigéré, ceci même connaissant dans la pratique que la colchicine ne donne pas de bons résultats pour les céréales.

L'exploration des lames a révélé un autre problème du à la culture *in-vitro* est que dans certaines lames il n'existait pas de pointes racinaires qui se sont collées au milieu de culture. Ceci nous a conduit à diminuer la quantité d'Agar dans le milieu de culture lors des repiquages et faire plus soin lors des prélèvements des plantules.

Pour les hybrides *Ae.gen/Sem.* ; *Ae.tri/O.Z.* ; *Ae.gen./Hog.* aucune pointe racinaire n'a été observée, pour l'hybride *Ae.tri./Hog.* nous avons atteint un temps de 9h de traitement à la colchicine et malgré ceci, toutes les plaques étaient au stade de l'interphase.

Trois plaques métaphasiques ont été obtenues pour l'hybride *Ae.gen/O.Z.* Malheureusement, beaucoup de chevauchements ont été observés rendant le comptage de chromosomes de deux d'entre-elles très improbable. Sur uniquement une seule lame (fig.12) le nombre chromosomique a été établi s'agissant de  $2n=24$ . Malheureusement le chevauchement présent n'a pas permis de réaliser un caryotype ou la constatation d'anomalies chromosomiques.



**Figure 12:** Photo d'une plaque métaphasique de l'hybride *Ae.gen./O.Z.* sous microscope optique. Gx100

### III-3 Discussion

La létalité d'hybrides se manifestant par des anomalies des tissus méristématiques depuis la germination, à une faiblesse de croissance aux stades avancés de développement, sont souvent rapportées dans les croisements interspécifiques, résultant d'incompatibilités entre le génome nucléaire et cytoplasmique, dus à des interactions de complémentarité ou d'épistasie entre les gènes (Tikhenko et *al.*, 2008 ; Matsuoka et *al.*, 2007 ; Mizuno et *al.*, 2010).

Dans le cas des *Poaceae*, une hérédité paternelle de l'ADN chloroplastique n'a jamais été observée (Guadagnuolo et *al.*, 2001), il est donc clair qu'une hérédité maternelle cytoplasmique explique les caractères morphologiques de ressemblance entre les hybrides et le parent femelle *Aegilops* dans notre étude.

Les différences d'établissement de barrières d'hybridation pré ou post zygotique entre les parents se manifestent selon le sens de croisement, pouvant faciliter l'obtention d'hybrides dans l'un des sens (Riesberg & Carney, 1998). A l'instar de nos résultats, les croisements interspécifiques où *Aegilops* est le parent femelle, ont l'avantage d'obtenir les hybrides en caryopses (Guadagnuolo et *al.*, 2001 ; Cifuentes et *al.*, 2006), par rapport au sens réciproque blé dur/*Aegilops* où les hybrides interspécifiques ont été obtenus uniquement par sauvetage d'embryons (Hadzhiivanova et *al.*, 2012 ; Ykhlef et *al.*, 2007).

La restriction de l'appariement des chromosomes homéologues par l'action du gène *Ph1* est bien connue dans l'hybridation interspécifique entre le blé et les espèces apparentées, mais aussi entre espèces dont les génomes sont divergents (Zielinski & Scheid, 2012 ; Combes Gavalda, M-C. 2015). Ainsi les hybrides obtenus sont des allopolyploïdes, où l'appariement des chromosomes est principalement disomique, c'est-à-dire des bivalents se produisent entre les chromosomes homologues et non pas homéologues (Madlung & Wendel, 2013). Les hybrides obtenus entre blé dur et *Ae.gen* sont de ce fait, allotétraploïdes possédant  $2n=4X=28$  chromosomes (David et *al.*, 2004; Ykhlef et *al.*, 2007). Nous avons obtenu un nombre de  $2n=24$ , ce nombre reste incomplet, des pertes et des réarrangements chromosomiques lors de la formation des hybrides peuvent expliquer un nombre inhabituel. En effet, les translocations terminales sont souvent fréquentes, et les fusions centriques se produisent spontanément chez les plantes allopolyploïdes (Molnár et *al.*, 2009).

### III-4 Conclusion

L'obtention de caryopse en très bon état et sans recours au sauvetage d'embryons confirme que des mécanismes génétiques d'isolement postzygotique se sont manifestés dans le sens de croisement où *Aegilops* est considérée parent femelle. L'étude et la compréhension de ces mécanismes ainsi que l'identification des gènes qui y sont responsables permettront de surmonter ces barrières et faciliteront l'obtention d'hybrides

Le nombre de chromosomes obtenu chez l'hybride *Ae.gen./O.Z.* témoigne les changements chromosomiques que peut subir un hybride, conséquence de la divergence de ces chromosomes.

### IV- Caractérisation des hybrides interspécifiques par les marqueurs SSR

Cette étude a pour but la comparaison allélique des hybrides par rapport aux parents. Les marqueurs SSR ont l'avantage d'être co-dominants, permettant ainsi, la détection d'hybrides hétérozygotes pour les loci parentaux.

Dans ce qui suit, l'amplification des parents et hybrides pour chaque marqueur, a été détaillée.

#### IV-1 Résultats de l'amplification des marqueurs SSRs au GBBV

Rappelons que l'extraction d'ADN des hybrides pour ces six premiers marqueurs, a été réalisée à partir de plantules entières, mortes aux stades de développement précoces. Les hybrides ayant les mêmes parents ont été considérés comme des lignées différentes.

Les hybrides (4) *Ae.gen./Hog.* et (7) *Ae.tri./Hog.* n'ont pas présenté une amplification, pour ces amorces, à cause d'une quantité d'ADN insuffisante pour l'amplification, ou dégradée après extraction. Ils ne seront pas présentés dans ce qui suit.

##### IV-1-1 Locus *Xwmc 25*

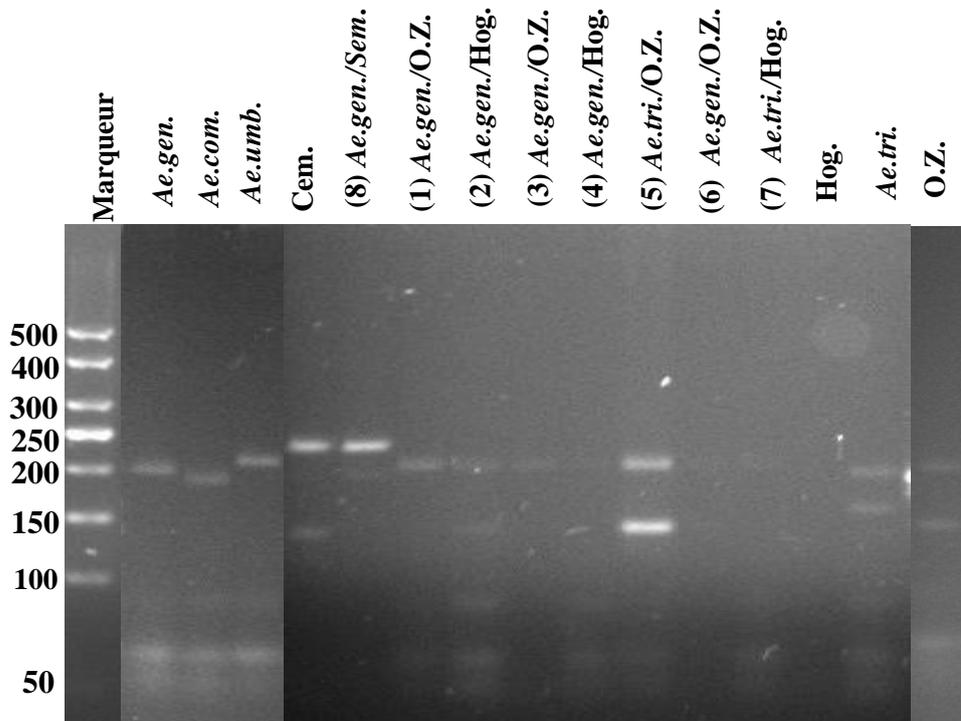
L'amplification de ce marqueur a permis de déceler des profils électrophorétiques différents entre les hybrides et les parents (fig.13). Un premier polymorphisme est constaté entre les espèces d'*Aegilops*, où il est observé qu'*Ae.gen.* et ses deux ancêtres diploïdes *Ae.com.* et *Ae.umb.* n'ont amplifié qu'une seule bande ; de 200 pb chez la première, mais légèrement différente chez les deux dernières (180 et 210pb, respectivement), alors qu'*Ae.tri.* présente deux bandes : la première commune à celle d'*Ae.gen.* (200pb), la deuxième a une taille de 154pb.

Le blé dur O.Z. présente aussi une amplification de deux bandes, la première toujours de 200pb alors que la deuxième est de 135pb. Cette dernière est aussi amplifiée chez le blé dur Italien Cem., mais qui se distingue bien lui et son hybride (8) *Ae.gen./Sem.* d'une bande de 230pb, ce qui indique que, chez ce dernier, l'origine de cette bande provient du parent blé dur.

Un deuxième polymorphisme est constaté entre les hybrides, (2) *Ae.gen./Hog.* présente une amplification de 200pb, bien que non amplifié chez Hog. mais dont la présence de cette bande chez les deux autres blés suggèrent une erreur de manipulation lors de la PCR et que cette bande est héritée d'un des deux parents.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

(1) *Ae.gen./O.Z.* et (3) *Ae.gen./O.Z.* présentent aussi une bande de 200pb, cependant leurs deux parents (*O.Z.* et *Ae.gen.*) sont communément porteurs de cette bande, mais l'absence d'amplification de la deuxième bande de *O.Z.* (135pb) peut suggérer que, l'origine de ce locus chez les hybrides est *Ae.gen.* Seul l'hybride (5) *Ae.tri./O.Z.* présente en plus de la bande de 200 pb une autre bande de 135pb, héritée donc du parent *O.Z.* L'hybride (6) *Ae.gen./O.Z.* ne présente pas une amplification pour ce marqueur, ce qui suggère que les chromosomes porteurs de ce locus ont été exclus de son génome.

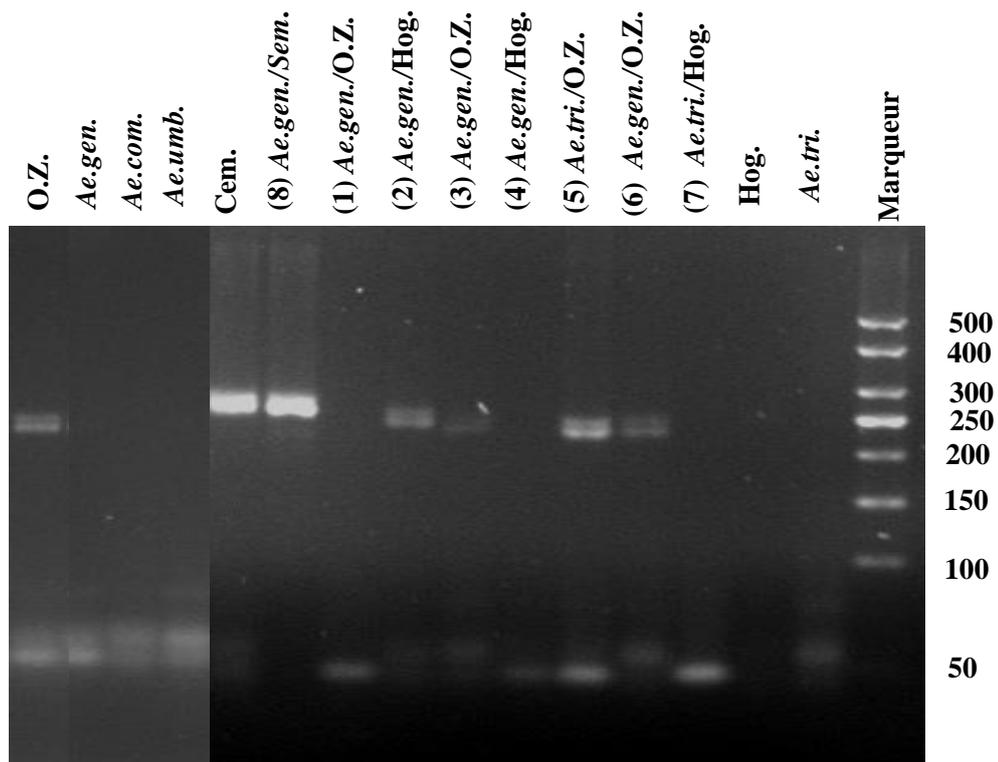


**Figure 13:** Photo des profils électrophorétiques du locus *Xwmc 25*, sur gel d'agarose à 3%.

### IV-1-2 Locus *Xwmc 44*

L'amplification de ce locus révèle qu'il est monomorphe (fig.14). En effet, les profils sont très similaires entre parents blés durs et les hybrides réciproques. *Ae.gen.*, *Ae.tri.*, *Ae.com.* et *Ae.umb.* n'ont pas amplifié ce marqueur, ce locus semble inexistant sur le groupe 1 des chromosomes homéologues de leurs génomes. De ce fait, ce locus a été hérité du parent mâle blé dur.

Cependant, Cem. et son hybride (8) *Ae.gen./Sem.* se distinguent par une bande très intense de 280 pb (qui peut s'agir de deux bandes, pouvant être mieux visualisées par une PAGE). O.Z. présente l'amplification de deux bandes de 251 et 266 pb, retrouvées également chez l'hybride (2) *Ae.gen./Hog.*, ce qui permet de conclure, malgré l'absence d'amplification chez Hog., qu'il présente les mêmes bandes qu'O.Z pour ce marqueur.



**Figure 14 :** Photo des profils électrophoretiques du locus *Xwmc44*, sur gel d'agarose à 3%

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Chez les descendants (3) *Ae.gen./O.Z.*, (5)*Ae.tri./O.Z.* et (6)*Ae.gen./O.Z.*, la bande de 251pb de O.Z. est commune, ils présentent cependant, une deuxième bande mais dont la taille est de 234pb. Contrairement, l'hybride (1) *Ae.gen/O.Z.*, ne présente pas une amplification de ce marqueur.

### IV-1-3 Locus *Xbarc 174*

L'étude de ce marqueur révèle un polymorphisme très important, l'amplification de nombreuses bandes de très grande taille caractérise ce marqueur (fig.15).

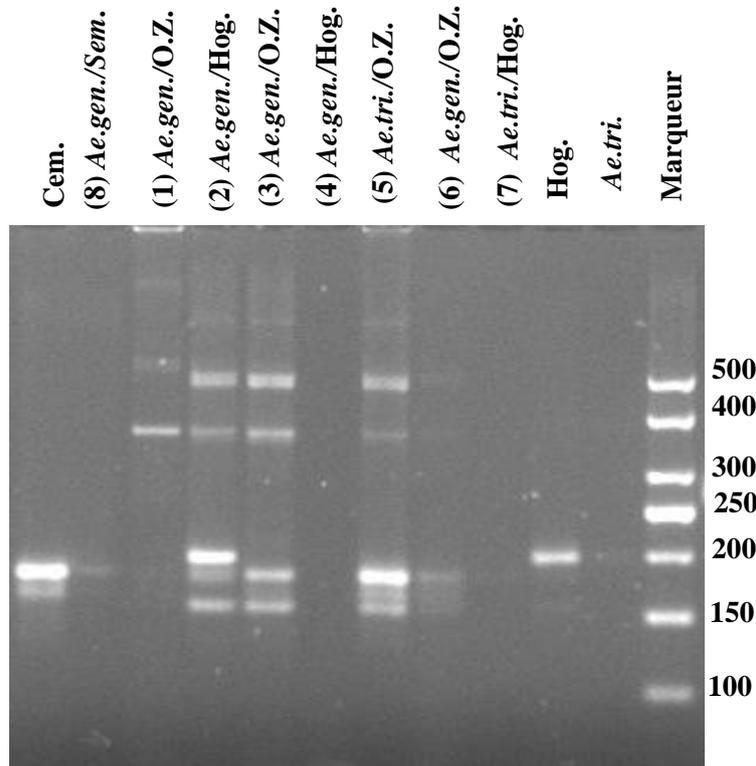
Au sein des *Aegilops* (non représentées sur la photo); *Ae.gen.* présente une amplification d'une seule bande de 381 pb, alors que pour ses ancêtres diploïdes, ce locus semble inexistant dans leurs génomes du fait de l'absence d'une amplification.

Pour ce qui est des blés durs ; le parent Cem. présente deux bandes ; 172 et 184 pb, son descendant (8) *Ae.gen./Sem.* a hérité de lui uniquement la dernière bande. La variété Hog. présente l'amplification d'une seule bande de 198 pb, alors que chez O.Z. (non représentée sur la photo) trois bandes sont caractérisées ayant des tailles de 158, 172 et 511pb.

La comparaison des profils électrophorétiques des hybrides (1) *Ae.gen./O.Z.*, (3) *Ae.gen./O.Z.* et (6) *Ae.gen./O.Z.* révèle, des différences génétiques qui renforcent notre choix de séparer les hybrides ayant les mêmes parents en lignées différentes. L'hybride (1) ne présente qu'une bande de 381pb, ayant donc le même profil que son parent femelle *Ae.gen.* L'hybride (6) *Ae.gen./O.Z* présente aussi une seule bande, mais d'une taille différente de 184pb. Pour ces deux hybrides, il apparaît que le chromosome d'un des parents a été éliminé lors des divisions cellulaires. L'hybride (3) se distingue bien par cinq bandes de 158, 184, 296, 381 et 511p, dont deux bandes sont communes à celle du parent mâle O.Z. (158 et 511pb) et une à celle du parent *Ae.gen.*, indiquant ainsi qu'il est hétérozygote pour ce marqueur.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

L'hybride (5) *Ae.tri./O.Z.* présente aussi 5 bandes (158, 184, 198, 381 et 511pb) dont deux commune à celles du blé dur (158 et 511pb), l'amplification de la bande 381pb caractérisant *Ae.gen.* peut suggérer la présence de la même bande chez *Ae.tri.*, vue le nombre de bandes pour cet individu, il est aussi clair qu'il présente un hétéroduplex pour les chromosomes porteurs de ce locus. Même constatation pour l'hybride (2) *Ae.gen./Hog.*, cumulant l'amplification des bandes des deux parents (381pb d'*Ae.gen.* et 198pb de Hog.). Cependant, deux bandes 158 et 511pb ne sont pas présentes chez Hog., elles sont caractéristiques d'O.Z. en plus de la bande 184pb.



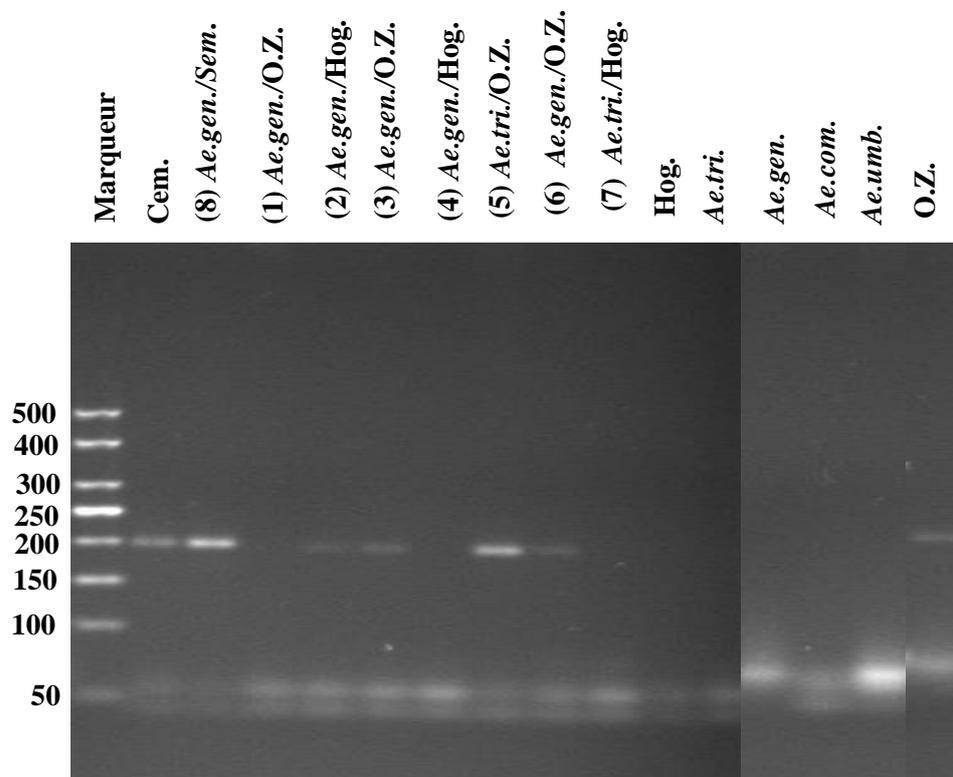
**Figure 15 :** Photo de l'amplification du locus *Xbarc174*, en électrophorèse sur gel d'agarose à 3%

### IV-1-4 Locus *Xwmc 177*

L'obtention de profils électrophorétiques similaires entre l'ensemble d'individus indique que ce locus est monomorphe (fig.16). L'absence de bandes chez les *Aegilops* permet de conclure que, ce locus est inexistant dans leurs génomes. Ainsi, les bandes amplifiées chez les hybrides sont originaire du parent blé dur.

Une bande commune de 198pb est détectée chez O.Z., Cem. et son hybride (8) *Ae.gen./Sem.*, alors qu'une bande de 187 pb est amplifiée chez les hybrides ; (2) *Ae.gen./Hog.*, (5) *Ae.tri./O.Z.*, (3) *Ae.gen./O.Z.* et (6) *Ae.gen./O.Z.* Contrairement à ces deux derniers hybrides, (1) *Ae.gen./O.Z.* ne présente aucune amplification de ce marqueur, suggérant l'élimination du chromosome (ou fragment de chromosome) porteur de ce locus de son génome.

Du fait de l'absence de ce marqueur chez les *Aegilops*, il est clair que la bande amplifié chez (2) *Ae.gen./Hog.* est héritée de Hog.

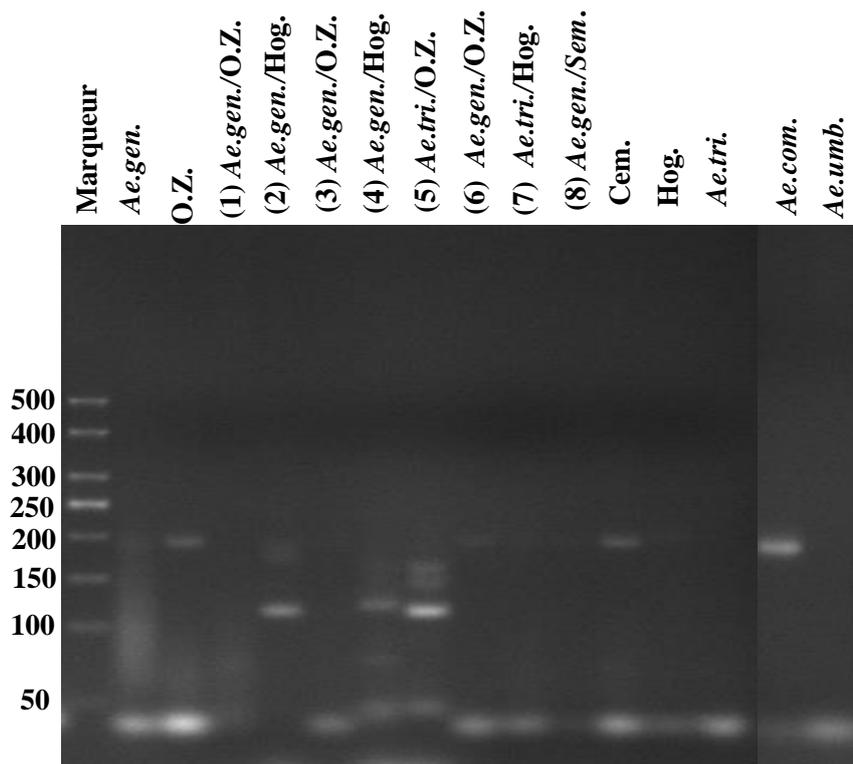


**Figure 16:** Photo de l'amplification du marqueur *Xwmc 177*, par électrophorèse sur gel d'agarose à 3%

### IV-1-5 Locus *Xwms* 135

Les profils d'amplification de ce marqueur sont très différents, entre parents et hybrides pour la taille et le nombre de bandes (fig.17). Les espèces sauvages *Ae.umb.*, *Ae.gen.* et *Ae.tri.* ne possèdent pas le locus de ce marqueur, vue l'absence d'amplification. Contrairement à eux, *Ae.com.* présente une bande de 180pb. Remarquablement, l'hybride (2) *Ae.gen./Hog.* présente aussi cette bande. Cependant, les blés durs O.Z. et Cem. présentent une bande de 195pb. Ce locus est hérité du blé chez l'hybride (6) *Ae.gen./O.Z.* qui a amplifié cette bande. Par contre, l'hybride (5) *Ae.tri./O.Z.* présente, quant à lui, deux bandes de 160 et 150 pb.

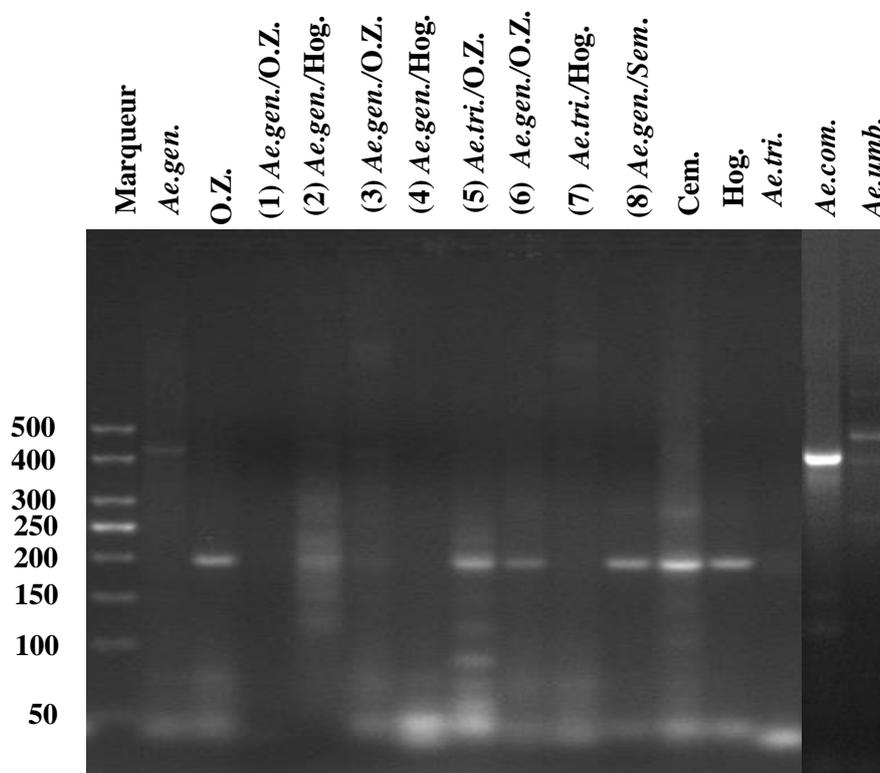
Contrairement, (8) *Ae.gen./Sem.*, (1) *Ae.gen/O.Z.* et (3) *Ae.gen/O.Z.* n'ont pas amplifié ce marqueur, il est probable que le chromosome (ou le fragment) porteur de ce locus a été exclu de leurs génomes.



**Figure 17** : Photo de profils électrophorétiques du locus *Xwms* 135, sur gel d'agarose à 3%

### IV-1-6 Locus *Xwms 257*

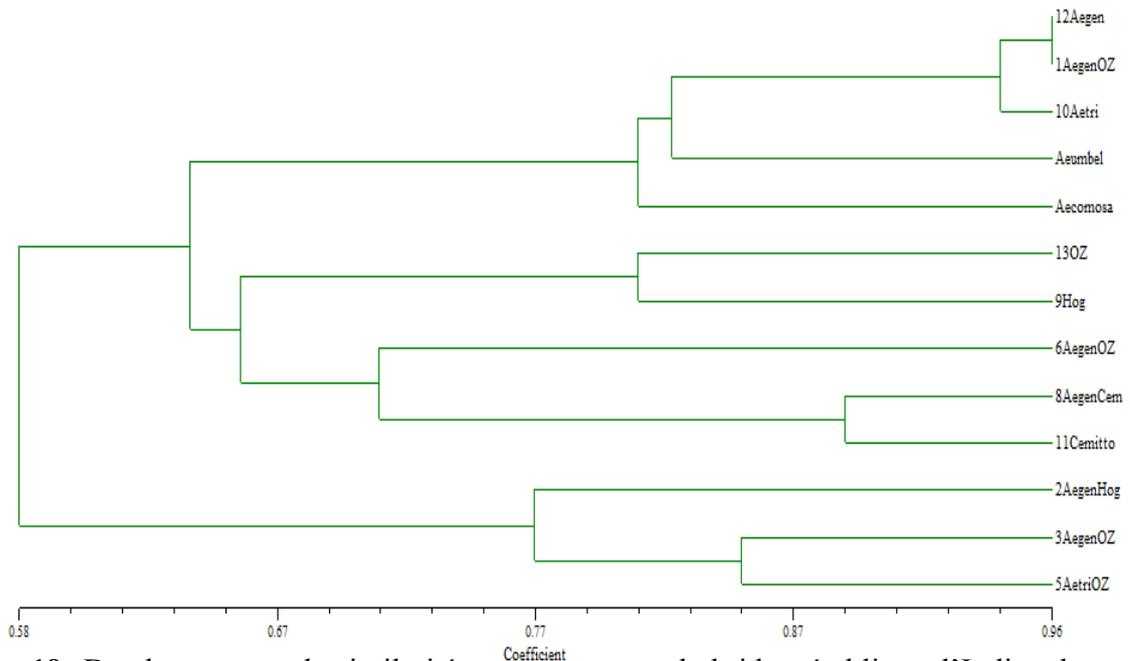
Les profils des amplifications sont très différents entre les *Aegilops* et les blés durs (fig.18) pour ce marqueur. Les blés durs O.Z., Hog. et Cem. ainsi que les hybrides (2) *Ae.gen./Hog.*, (3) *Ae.gen./O.Z.*, (5) *Ae.tri./O.Z.*, (6) *Ae.gen./O.Z.* et (8) *Ae.gen./Sem.* présentent une bande de 200pb. L'hybride (1) *Ae.gen./O.Z.* ne présente pas une amplification pour ce marqueur. Concernant les *Aegilops*; *Ae.gen.* et *Ae.com.* présentent une bande de 420pb, alors que pour *Ae.umb.* elle est de 490 pb. L'amplification, chez les hybrides de la bande caractérisant le blé dur indique qu'ils sont homozygotes pour ce locus et que celui de l'*Aegilops* a été éliminé de leurs génomes.



**Figure 18** : Photo d'amplification du locus *Xwms257*, sur gel d'agarose à 3%

## Chapitre III : Résultats et Discussion

Le dendrogramme (fig.19) représente la similitude entre parents et hybrides calculée par l'indice de JACARD à partir du polymorphisme allélique (présence-absence) des loci *Xwmc25*, *Xwmc44*, *Xbarc174*, *Xwmc177*, *Xwms135*, *Xwms257* (Annexe III).



**Figure 19:** Dendrogramme de similarité entre parents et hybrides, établi par l'Indice de Jaccard des allèles des amorces *Xwmc25*, *Xwmc44*, *Xbarc174*, *wmc177*, *Xwms135* et *Xwms257*.

Deux grands groupes peuvent être distingués à un niveau de similarité de 58%, le premier peut être divisé en deux sous-groupes similaires à 63%. Dans le premier sous-groupe les espèces sauvages sont rassemblées, où la constatation que l'hybride (1) *Ae.gen./O.Z.* est similaire à *Ae.gen.* à 96%, à un taux si élevé de similitude il ne peut s'agir que d'une autofécondation chez *Ae.gen.* Ce dernier présente une similarité de 94% avec *Ae.atri*. Les parents femelles sont similaires à leur ancêtre diploïde *Ae.umb.* à 83%. *Ae.com.* présente une similitude avec tous ces génotypes à 81%. Le deuxième sous-groupe réunit les blés durs ainsi que trois hybrides, présentant plus de similitudes avec eux. Ainsi, d'une part les parents mâles O.Z. et Hog. qui présentent des similitudes à 81% entre eux. D'une autre part, le blé dur Cem. présente avec son hybride (8) *Ae.gen./Sem.* des similitudes à 90%, tous deux sont similaires à l'hybride (6) *Ae.gen./O.Z.* à 71%. Ces trois individus sont similaires à O.Z. et Hog. à 65%.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Le deuxième groupe quant à lui, renferme trois hybrides qui ont amplifié des bandes dont les tailles sont intermédiaires à leurs parents. L'hybride (3) *Ae.gen./O.Z.* et (5) *Ae.tri/O.Z.* sont similaires à 85%, et qui sont similaires à (2) *Ae.gen./Hog.* à 77%.

### IV-2 Résultats de l'amplification des marqueurs SSRs au CRBT

Pour ces cinq marqueurs, l'extraction a été réalisée à partir des graines, mêmes pour les parents blés durs et les *Aegilops* tétraploïdes.

#### IV-2-1 Locus *Xwmc 488*

L'étude de ce marqueur révèle un polymorphisme important concernant le nombre de bandes amplifiées ainsi que leur taille (fig.20). Le blé Italien Cem. n'a pas présenté une amplification, alors que son descendant hybride *Ae.gen./Sem.* présente deux bandes très proches de 166 (non répertoriés chez les blés durs) et 175. Hog. possède quatre bandes (150, 155, 175 et 180 pb), alors que O.Z. a exprimé une seule bande de 175pb. Ainsi l'absence d'amplification chez Cem., n'indique plus que ce locus est absent chez cette variété.

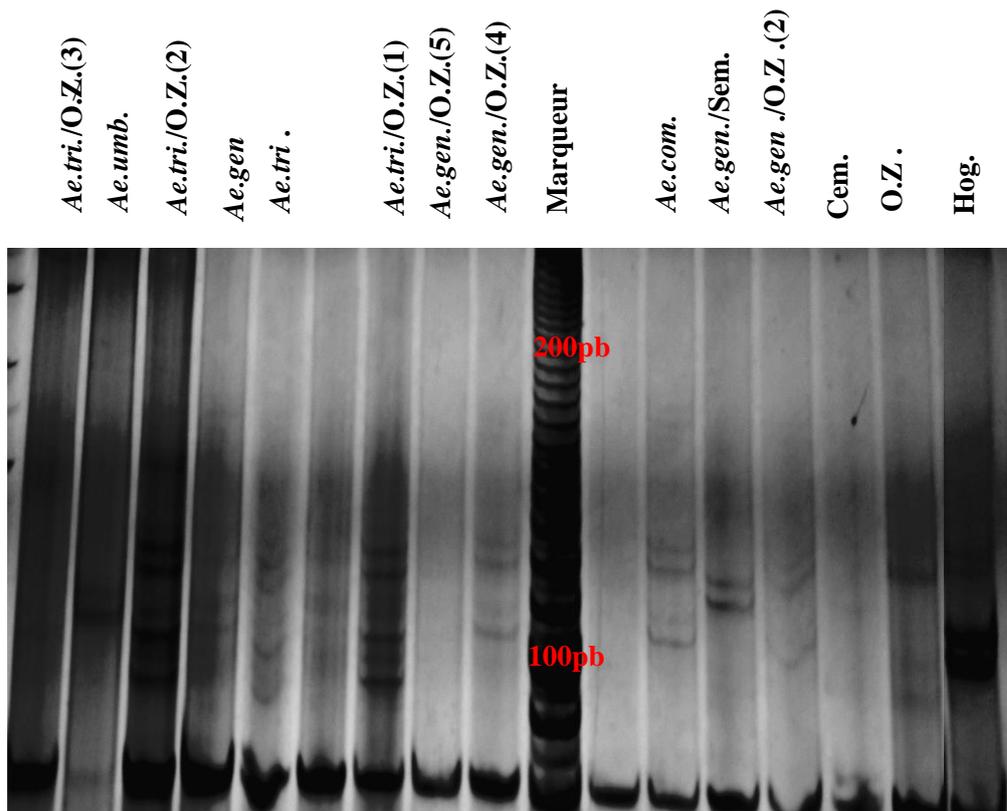
Concernant les *Aegilops*, il est clair que les espèces diploïdes aussi bien que celles tétraploïdes possèdent un locus pour ce marqueur ; chez *Ae.gen.* deux bandes sont amplifiées (155 pb, 175pb), *Ae.com.* présente trois bandes (155 pb, 175pb et 180 pb) ; *Ae.tri.* en plus de ces trois bandes possède une quatrième de 150pb ; *Ae.umb.* présente un profil d'amplification différent constitué de deux bandes très rapprochées (161 et 166 pb).

Les hybrides présentent des profils très différents, aussi bien pour ceux ayant les mêmes parents ; *Ae.tri./O.Z.*(3) présente uniquement une bande de 161pb commune à celle d'*Ae.umb.*, alors que les autres hybrides *Ae.tri./O.Z.*(1) et *Ae.tri./O.Z.*(2) ont un profil de quatre bandes similaire à celui du parent femelle *Ae.tri.*

Les hybrides dont le parent femelle est *Ae.gen.*, ont présenté des amplifications différentes ; chez *Ae.gen./O.Z.*(2) quatre bandes sont amplifiées (150 pb, 155 pb, 175pb et 180 pb), alors que chez *Ae.gen./O.Z.*(4) la bande de 150pb est absente, contrairement à eux, *Ae.gen./O.Z.*(5) ne présente aucune amplification pour ce marqueur, il est probable qu'une élimination simultanée des loci parentaux, se soit produite de son génome.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

La présence commune de la bande 175pb chez la plupart des parents et la différence d'expression chez les blés durs de ce marqueur, ne permettent pas de distinguer les hétérozygotes.



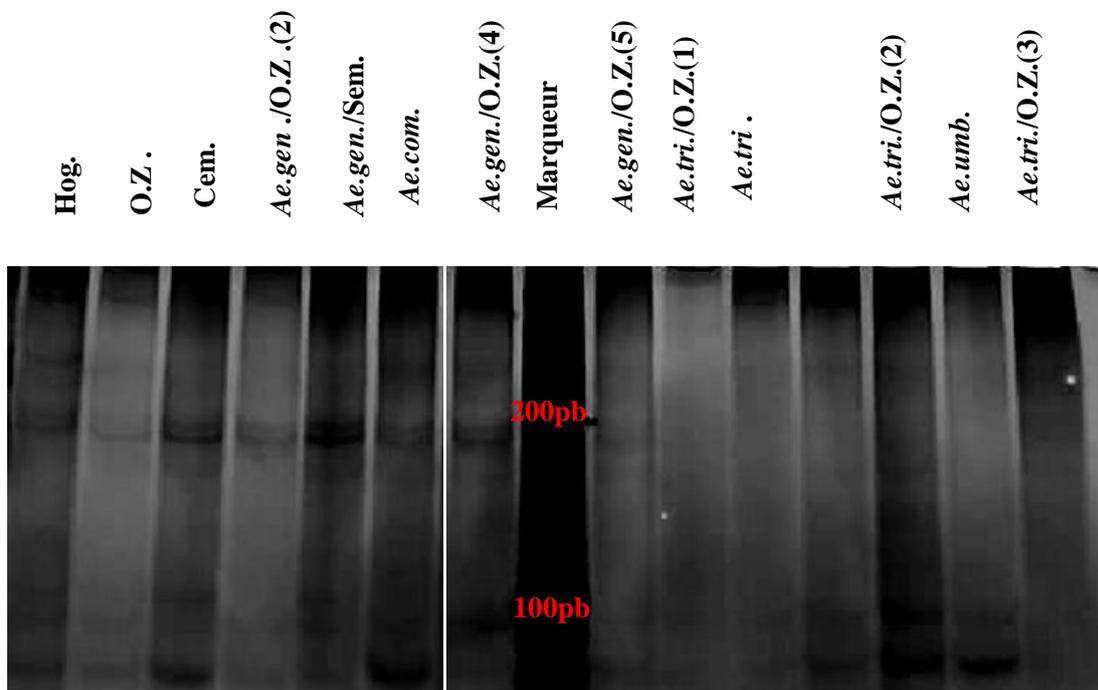
**Figure 20** : Photo d'amplification du locus Xwms 488, sur gel de polyacrylamide à 10%

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### IV-2-2 Locus *Xwms* 124

L'amplification de ce marqueur révèle, pour la plupart des génotypes, des profils de trois bandes dont ; une commune de 105pb ; et deux autres rapprochées mais ayant des tailles différentes entre les individus (fig.21). Ainsi, chez Hog. Elles sont de 105, 196 et 200pb, alors que cette dernière bande est absente chez O.Z. Pour, Cem. et son hybride *Ae.gen./Sem.* ils présentent le même profil d'amplification de 105, 190 et 200 pb.

Malheureusement, la quantité d'ADN insuffisante d'*Ae.gen.* n'a pas permis l'amplification de ce marqueur. *Ae.tri.*, ne présente pas de bandes. Chez les hybrides ; *Ae.gen./O.Z.(2)*, *Ae.gen./O.Z.(5)* et *Ae.tri./O.Z.(2)*, les bandes 190 et 200pb sont amplifiées. *Ae.gen./O.Z.(4)* présente la bande de 190pb, mais la deuxième est de 205pb, cette dernière est uniquement amplifiée chez cet hybride. Cependant, les quatre hybrides diffèrent de leur parent mâle O.Z. Ce même profil (190-200pb) est observé pour *Ae.com.* Ceci n'exclue pas, une modification de l'expression de ce locus entre *Ae.tri.* (et éventuellement, *Ae.gen.*) et ses hybrides cités en haut. Ce fait est aussi constaté par le profil similaire de l'hybride *Ae.tri./O.Z.(1)* et d'*Ae.umb.* présentant une seule bande de 105 pb. Alors que l'hybride *Ae.tri./O.Z.(3)* présente quant à lui, en plus des deux bandes 190 et 200pb, une autre bande de 175pb, uniquement répertoriée chez cet hybride.



**Figure 21** : Photo de profils électrophorétiques du marqueur *Xwms*124, sur gel polyacrylamide 10%.

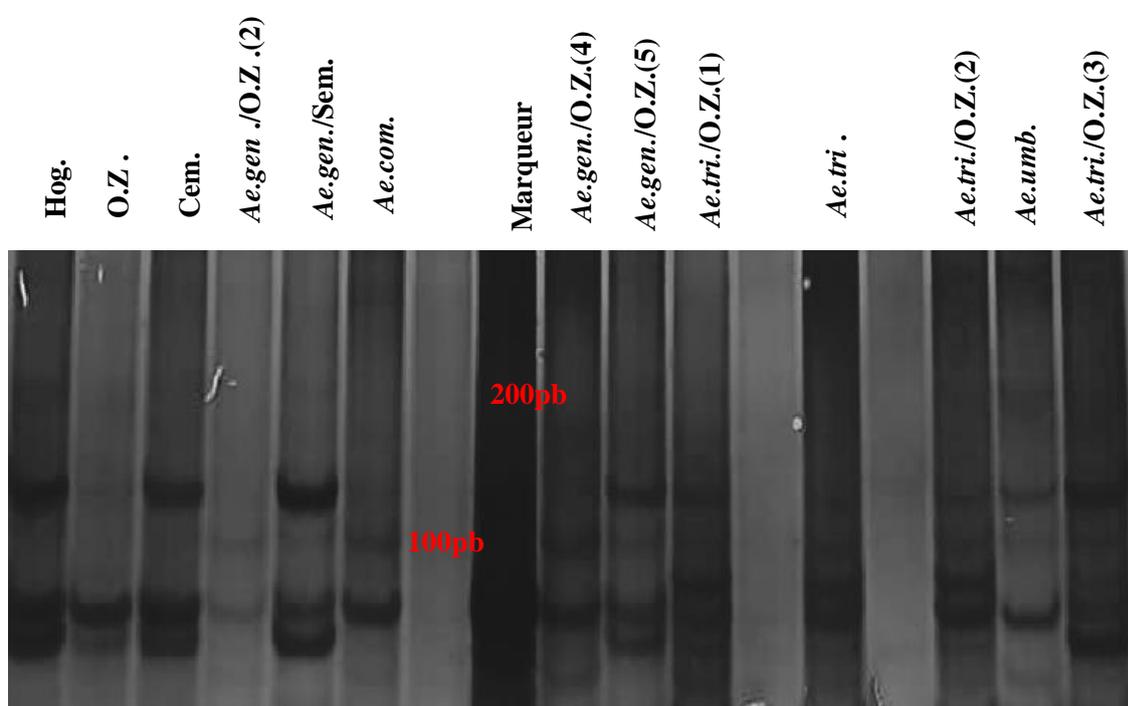
## Chapitre III : Résultats et Discussion

### IV-2-3 Locus *Xwms* 332

Les profils électrophorétiques résultant de l'amplification de ce marqueur révèlent un polymorphisme important de nombre de bande mais aussi de taille (fig.22). *Ae.umb.*, Hog., Cem., son hybride *Ae.gen./Sem.*, *Ae.gen./O.Z.(5)* et *Ae.tri./O.Z.(3)* présentent tous deux bandes de 102 et 145pb. Cependant, O.Z. présente uniquement la bande de 102pb, il est probable qu'une modification du site d'hybridation de l'une des amorces, n'aurait pas permis l'amplification de la bande 145pb.

Malheureusement, la quantité d'ADN insuffisante d'*Ae.gen.* n'a pas permis l'amplification de ce marqueur. Chez *Ae.tri.*, en plus de la bande 102pb, une amplification spécifique de 111pb est obtenue. Chez *Ae.com.*, elle est de 127pb. Les hybrides *Ae.gen./O.Z.(2)* et *Ae.gen./O.Z.(4)* présentent le même profil qu'*Ae.com.*(102 et 127pb) ce qui permet de suggérer, que l'origine de l'allèle de cette bande provient du parent femelle.

Néanmoins, la présence de trois bandes pour les hybrides *Ae.tri./O.Z.(1)* et *Ae.tri./O.Z.(2)* indique qu'ils sont hétérozygotes pour ce locus, la bande de 102 étant commune aux deux parents, celle de 111 est spécifique au parent femelle *Ae.tri.* Chez *Ae.tri./O.Z.(2)* la troisième bande est de 145 pb pouvant être originaire du blé dur, alors que la troisième bande, uniquement amplifiée, chez *Ae.tri./O.Z.(1)* est de 135pb.



**Figure 22:** Photo des profils électrophorétiques du locus *Xwms* 332, sur gel de polyacrylamide à 10%

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

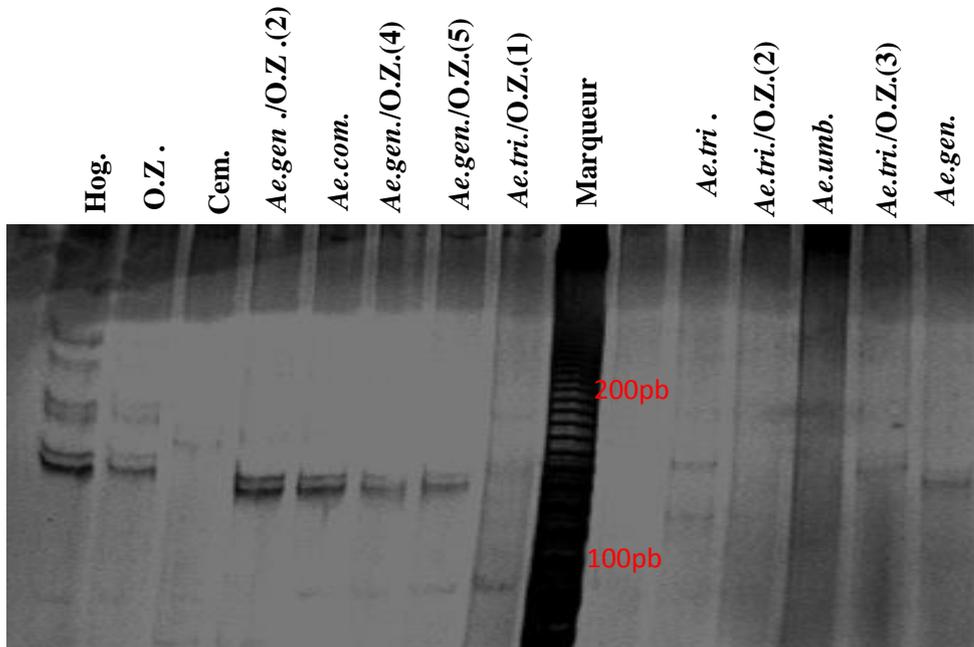
### IV-2-4 Locus *Xwmc 161*

Ce locus présente un polymorphisme important de nombre et de taille des bandes (fig.23). Hog. présente six bandes de 194, 203, 210, 224, 235 et 250 pb. Chez O.Z. quatre bandes ont été amplifiées 194, 203, 224, 235pb alors que Cem. n'a amplifié que deux bandes de 211 et 216 pb. Malheureusement, pour l'hybride *Ae.gen./Sem.*, la quantité d'ADN insuffisante n'a pas permis l'amplification de ce marqueur.

Au sein des *Aegilops*, un polymorphisme de nombre de bandes et de taille est aussi constaté ; *Ae.gen.* présente l'amplification de deux bandes de 189 et 194 pb ; alors qu'*Ae.tri.* présente trois bandes de 189, 194 et 203pb. ; *Ae.com.a* a présenté l'amplification de quatre bandes 182, 189, 211 et 216pb ; alors que pour *Ae.umb.* une absence d'amplification est enregistrée.

Pour les hybrides, les profils d'amplification sont aussi contrastés, *Ae.gen./O.Z.(2)* présente les mêmes bandes qu'*Ae.com.* A l'opposé, *Ae.gen./O.Z.(4)* et *Ae.gen./O.Z.(5)* présentent seulement les deux bandes de 182 et 189pb, pour ces hybrides les loci sont donc portés par les chromosomes d'*Ae. gen.*, mais qui ont subi un changement d'expression.

L'hybride *Ae.tri./O/Z.(1)* présente une amplification de la bande 224pb du blé O.Z., alors que la bande 189pb est spécifique à *Ae.com.* Ainsi, il est probable que la modification du site d'hybridation n'a pas permis l'amplification chez *Ae.umb.* L'hybride *Ae.tri./O/Z.(2)* ne présente que la bande de 168pb d'*Ae.tri.*, alors que chez l'hybride *Ae.tri./O.Z.(3)*, les bandes 194 et 203pb sont amplifiées. Du fait qu'elles sont communes aux deux parents, il n'est pas possible de tirer conclusion quant à leur origine. Mais, il est évident que pour ces trois hybrides, tout en s'appuyant sur le nombre de bandes enregistré pour chaque parent, que des pertes de fragments ou de chromosomes entiers soient survenues lors de la formation de ces hybrides.



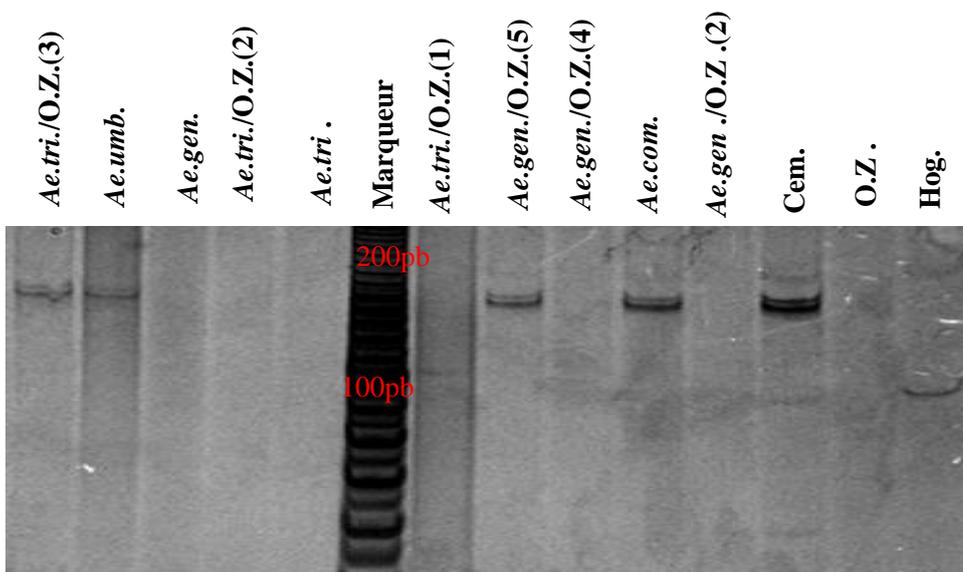
**Figure 23 :** Photo de l'amplification du marqueur *Xwmc161*, sur gel Polyacrylamide 10%

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### IV-2-5 Locus *Xwms* 493

Ce locus présente une amplification monomorphique (fig.24), trois bandes, seulement, sont amplifiées. Le blé Cem. présente ces trois bandes (155-164-179pb), celle de 155pb est amplifiée chez Hog., alors qu'O.Z. ne présente pas d'amplification. Malheureusement, la quantité d'ADN insuffisante d'*Ae.gen./Sem.* n'a pas permis l'amplification de ce marqueur. *Ae.gen.* et *Ae.tri.* ne présentent pas de bandes, alors que leurs ancêtres diploïdes possèdent un locus pour ce marqueur, puisqu'une bande de 155pb est amplifiée chez *Ae.umb.* et deux chez *Ae.com.* de 155 et 164pb.

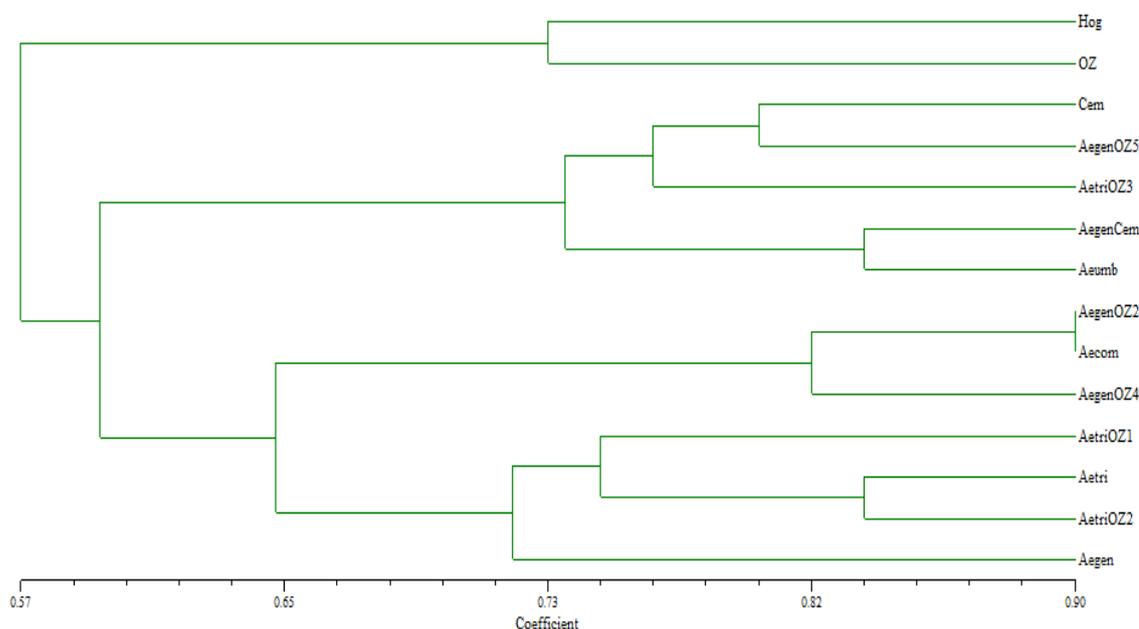
Les hybrides *Ae.gen./O.Z.*(5) et *Ae.tri./O.Z.*(3) présentent le même profil d'amplification d'*Ae.com.* alors qu'*Ae.gen./O.Z.*(4) présente la bande de 155 pb. Les autres hybrides n'ont pas présenté une amplification pour ce marqueur [*Ae.gen./O.Z.*(2), *Ae.tri./O.Z.*(1) et *Ae.tri./O.Z.*(2)].



**Figure 24** : Photo de l'amplification du marqueur *Xwms*493, sur gel Polyacrylamide 10%

## Chapitre III : Résultats et Discussion

Le calcul des indices de similarités de Jaccard, après la construction de la matrice de présence-absence des allèles des cinq loci (*Xwmc* 488, *Xwms*124, *Xwms* 332, *Xwmc*161 et *Xwms* 493) (Annexe IV), a permis l'obtention du dendrogramme présenté dans la figure 25.



**Figure 25:** Dendrogramme de similarité entre parents et hybrides, établi par l'Indice de Jaccard des allèles des amorces *Xwmc* 488, *Xwms*124, *Xwms* 332, *Xwmc*161 et *Xwms* 493.

Deux grands groupes peuvent être dégagés à un niveau de similarité de 60%, le premier rassemblant les blés durs Hog. et O.Z. qui se distinguent nettement des autres génotypes constituant le deuxième grand groupe, dans lequel, à un niveau de similarité de 73%, deux sous-groupes sont différenciés ; le premier sous-groupe rassemble le blé dur Cem. et l'hybride *Ae.gen./O.Z.*(5) similaires entre eux à 81% et avec *Ae.tri./O.Z.*(3) à 77%. L'hybride *Ae.gen./Sem.* est similaire à 84% à *Ae.umb.* mais n'est similaire à son parent Cem. qu'à 73%. Ceci est due au manque d'information sur l'amplification chez cet hybride, des deux marqueurs *Xwmc* 161 et *Xwms* 493. Puisque, pour ceux de *Xwms* 124 et *Xwms* 332, leurs profils sont identiques, à l'exception du marqueur *Xwms* 488 pour le quel la bande amplifiée n'est pas répertoriée pour les blés durs. Le deuxième sous-groupe se distingue à un niveau de similarité de 65%, dans lequel il est remarquable de constater la ressemblance entre *Ae.gen./O.Z.*(2) et *Ae.com.* à 90% et à 82% à *Ae.gen./O.Z.*(4).

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Le parent *Ae.gen.* ne présente des similarités qu'à 60% avec ces derniers et semble présenter plus de profils d'amplifications avec *Ae.tri.* et ses hybrides, où *Ae.tri./O.Z.(2)* est le plus similaire à son parent femelle à 83%. *Ae.tri./O.Z.(1)* n'est similaire à eux qu'à 74%, alors que l'hybride *Ae.tri./O.Z.(3)* est plus distant d'eux et ne présente que 60% de similarité avec eux.

### IV-3 Discussion

Selon la base de données du blé *GrainGenes* (Somers et al., 2004 in : Anonyme a, 2020), le locus *Xwmc25* est porté par le bras court du chromosome 2B et 2D du blé tendre, la taille attendue chez la variété témoin *Chinese Spring* est de 166pb avec une amplification polymorphique. Nous avons aussi obtenu une amplification polymorphique pour ce locus, la taille des bandes pour les blés durs variait de 135 à 230pb. Les espèces d'*Aegilops* possèdent aussi le locus de ce marqueur. Le locus *Xwmc 44* est porté par le bras long du chromosome 1B, chez *Chinese Spring*, la bande attendue est de 242pb, avec une amplification polymorphique. Il est distant de 15cM du gène *Lr46/ Yr 29* (Lan et al., 2014 in : Anonyme a, 2020). Cependant, nous avons obtenu une amplification monomorphique pour ce locus, les tailles chez les blés durs varient de 251 à 280pb, les espèces d'*Aegilops* ne présentent pas une amplification de ce locus. Nos résultats pour ces deux loci, corroborent avec ceux de Sharma et al., (2002) et Schneider et al., (2010), concernant l'amplification de ce marqueur chez les deux espèces tétraploïdes.

Le locus *Xbarc174* est caractérisé, dans notre étude, par l'amplification de bandes de grandes tailles allant de 172pb à 511pb. Selon la base de données (Anonyme a, 2020), il est porté par les chromosomes 1B, 2B et 7A. Schneider et al., (2010), ont aussi détecté une amplification caractéristique d'un grand fragment de 400 pb pour le marqueur *Xbarc184* chez *Ae.biuncialis*, *Ae.gen.* et la lignée d'addition 7U<sup>s</sup> blé-*Ae.gen.*, mais dont la localisation chromosomique reste inconnue chez les *Aegilops*. Les marqueur *Xbarc* sont souvent liés à des gènes, *Xbarc174* est très proche de la régions portant les gènes de résistance (*Sr14*, *Sr18*, et *Lr33*) pour la résistance à la rouille des feuilles, la rouille des tiges et la rouille jaune (Song et al., 2005).

Le locus *Xwmc177* se situe sur le chromosome 2A, l'amplification de ce marqueur chez *Chinese Spring* est de 184pb (Somers et al., 2004 in : Anonyme a, 2020). L'amplification de ce marqueur pour les blés durs a donné une bande de 198pb, alors que les hybrides présentent une bande de 187pb.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Pour le locus *Xwms135*, l'amplification des blés durs a donné une bande de 195pb, seul *Ae.com.* parmi les *Aegilops* a amplifié une bande de 180pb. Korzun et *al.*, (1997) ont aussi obtenu une amplification polymorphique pour ce locus, qu'ils ont attribué au bras long du chromosome 1A.

Le locus *Xwms257* est localisé sur le bras court du chromosome 2B (Röder et *al.*, 1998 *in* : Anonyme a, 2020). Dans notre étude, l'amplification de bandes de grandes tailles chez les *Aegilops* (420-490pb) caractérise ce locus. Une amplification polymorphique chez *Ae.buncialis*, a aussi été observée (Schneider et *al.*, 2010).

Le locus *Xwmc488* est porté par les chromosomes 7A (Somers et *al.*, 2004 *in* : Anonyme a, 2020). Les amplifications dans notre étude, varient de 150 à 180pb.

Le locus *Xwms124* (*Xgwm124*) est porté par le chromosome 1B (Somers et *al.*, 2004 *in* : Anonyme a, 2020). Dans notre étude, les tailles des bandes amplifiées varient entre 105 et 200 pb. Le locus *Xwms332* présente des amplifications dont la taille varie de 102 à 145pb.

Le locus *Xwmc161* est porté par 4A et 5D (Somers et *al.*, 2004 *in* : Anonyme a, 2020). Les bandes amplifiées sont de 189 à 250pb. Le locus *Xwms* (*gwm 493*) est porté par 3BS (Somers et *al.*, 2004 *in* : Anonyme a, 2020) ; il est distant de 3,7cM du gène de résistance *Stb2*, dans la région distal du bras court du chromosome 3B (Adhikari et *al.*, 2004). Dans notre étude, les bandes amplifiées pour ce marqueur varient de 155 à 179pb.

### IV-4 Conclusion

Les résultats ont révélé que huit des onze amorces testées sont polymorphes (72%), des différences très remarquables dans l'expression des loci ont été révélées entre parent femelle *Ae.gen.* (parfois même avec ces ancêtres diploïdes), *Ae.tri.* (parfois différent de son ancêtre diploïde *Ae.umb.*) et parent mâle blé dur, d'une part. D'autre part, des différences très remarquables d'expression dans les profils des hybrides, certains ne présentent pas l'amplification d'un marqueur alors que d'autres l'amplifient, ceci a été constaté aussi pour les hybrides provenant du même parent. Chez ces derniers, ou chez les autres hybrides différents, il a été constaté que les tailles de bandes héritées peuvent être différentes, et non similaires à leurs parents.

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Les loci *Xbarc174* et *Xwms 332* ont permis de détecter les hétérozygotes à cause de l'amplification spécifique de bandes de très grandes tailles avec et des nombres importants. Les loci *Xwmc 44*, *Xwmc 177* ne sont pas amplifiés chez les *Aegilops*, *Xwms135* n'a été amplifié que chez *Ae.com*, ainsi, les chromosomes porteurs de ces marqueurs (2BL, 2A et 1AL, respectivement) chez les hybrides sont originaires des parents blé durs.

Quoique, le pouvoir des marqueurs SSR pour la détermination de polymorphisme intraspécifique est controversé entre chercheurs. Dans notre étude, les marqueurs SSRs ont permis la discrimination des différences entre les blés algériens et celui italien qui présentent des amplifications des marqueurs mais à différence remarquable de taille.

Concernant les six premiers marqueurs, les résultats de l'amplification de la variété Hog. n'ont été obtenus que pour *Xbarc174* et *Xwms257*, pour *Ae.tri*. une amplification a été obtenue uniquement pour le locus *Xwmc25*, impliquant ainsi un manque d'information sur l'existence des autres marqueurs chez cette espèce et qui n'ont pas été amplifiés chez *Ae.gen*. Ceci suggère que l'ADN s'est dégradé après extraction. Pour les cinq derniers marqueurs, l'hybride (8) *Ae.gen/Sem*. n'a pas pu être caractérisé pour les marqueurs *Xwmc161* et *Xwms493*, *Ae.gen*. pour *Xwms332*, *Xwms 124*, à cause d'une quantité insuffisante d'ADN suite à l'extraction à partir de la graine.

### V- Discussion générale

Le but des croisements interspécifiques par les espèces sauvages est l'enrichissement des stocks génétiques, pouvant être exploités dans plusieurs disciplines de l'amélioration génétique du blé (Mujeeb-Kazi et *al.*, 2013), dont la tolérance à la sécheresse constitue l'un des principaux axes. Car s'agissant de la première contrainte limitant la production en agriculture, notamment celle du blé (Rauf et *al.*, 2016). Les *Aegilops*, offrent une impressionnante variabilité génétique à cet effet. Notre choix des parents impliqués dans les croisements interspécifique est justifié par leur performance de tolérance du stress hydrique appliquée, les valeurs de TRE élevées et la résistance stomatique accrue en conditions de stress traduisent leurs capacité d'ajustement osmotique lié à la tolérance (Rauf et *al.*, 2016), surtout pour les espèces d'*Aegilops*. Selon Al hakimi et *al.*, (1998), la teneur relative en eau, est un paramètre promettant pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse, vue qu'il présente une grande héritabilité aussi bien chez les espèces sauvages, que les hybrides qui y sont issus avec le blé. La caractérisation des géniteurs pour le stress hydrique, a permis d'enregistrer une corrélation positive significative entre la résistance stomatique et l'activité peroxydase (0,301\*). En effet, le stress hydrique sévère induit l'inhibition d'enzymes et peut générer les ROS qui peuvent causer une photo-oxydation et des dommages aux protéines, pigments et lipides des membranes photosynthétiques et une désorganisation de la membrane des thylakoïdes (Gill & Tuteja 2010 ; Rauf et *al.*, 2016). Les plantes possèdent des mécanismes non enzymatiques et enzymatiques pour faire face à de telles situations, parmi ces derniers, la catalase qui est indispensable à la dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durant le stress et évite ainsi ces effets néfaste sur la plante, et la peroxydase qui joue un rôle clé dans le piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par la dismutation de O<sub>2</sub><sup>-</sup> par la superoxide dismutase (Delannoy et *al.*, 2004). Beaucoup de travaux ont mis en évidence le rôle des peroxydases et son accumulation dans la réponse de la plante aux stress biotiques (Martinez, 1997) et abiotiques tel que les métaux lourds (Djebali et *al.*, 2002) ainsi que la sécheresse (Anjum et *al.*, 2011). L'aptitude, en cas de déficit hydrique, des populations de blé dur d'Afrique du Nord, bien adaptées à la sécheresse à sauvegarder l'intégrité des processus photosynthétiques est, en particulier, bien connue (Benlaribi et *al.*, 1990). Le maintien de l'activité photosynthétique en condition de sécheresse a aussi été observé chez des accessions d'espèces sauvages du genre *Aegilops* ; *Ae. tauschii*, *Ae. speltoides* et *Ae. biuncialis* (Molnar et *al.*, 2005).

### Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Toutefois, dans les hybridations interspécifiques avec les espèces sauvages, il est préférable de chercher à introduire dans l'espèce cultivée des mécanismes ou des caractères inductibles, à faible coût énergétique (ajustement osmotique par exemple), plutôt que des caractères de résistances pénalisant la production en grain, car pouvant s'agir chez les espèces sauvages, d'un caractère de survie plus que celui assurant le maintien d'une production en grains (El Jaafari *et al.*, 2001 ; Zaharieva *et al.*, 2001). Pour de telles hybridations avec le blé, un faible taux de croisement est souvent enregistré, qui est due au déséquilibre de la balance de nombre dans l'endosperme (Said *et al.*, 2019). L'entrave de l'alimentation des embryons conduisant à leur avortement, dans des hybridations impliquant le parent sauvage autant que parent femelle, a été aussi constatée chez l'haricot *Phaseolus vulgaris*, conséquence de la mise en place de barrières post-zygotique (Barikissou & Baudoin, 2012). Ceci permet d'expliquer le taux faible de croisabilité de 3,9%, que nous avons enregistré entre les espèces sauvages et le blé dur dans notre étude. Les barrières post-zygotique se manifestent aussi par une faiblesse des plantules hybrides, comme il a été constaté pour les hybrides de notre étude. Alors que justement, la germination, l'émergence et l'édification des plantules sont autant des stades critiques dans la survie et le développement des plantes (Hadas, 2004). Nous avons aussi, par la culture *in-vitro*, obtenu des plantules hybrides albinos. L'observation, en androgenèse chez le blé tendre, de plantes albinos, serait due à des délétions très importantes dans leurs génomes chloroplastiques, ou encore à l'action de gènes nucléaires affectant l'aptitude à l'édification et la régénération de structures chlorophylliennes (Picard *et al.*, 1994). En plus, le phénomène d'albinisme est très observé chez le blé dur en culture *in-vitro* (Cherkaoui *et al.*, 2000) réputé d'être le plus récalcitrant des blés à la culture de tissus (Bohorova *et al.*, 2001). Ces constatations morphologiques lors de la culture *in-vitro* traduisent ainsi les incompatibilités nucléaire et cytoplasmique rencontrées chez les hybrides. Conséquence de l'hybridation qui peut aboutir à des changements génomiques incluant : l'altération de l'expression génique ; de la structure chromosomique ; et la taille du génome (Baack & Rieseberg, 2007). Nous avons constaté pour un hybride *Ae.gen./O.Z.* un nombre de 24 chromosomes, la variation du nombre de chromosomes peut aussi être observée dans les générations de *back cross* (Guadagnuolo *et al.*, 2001).

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Les allopolyploïdes avec des génomes parentaux divergents forment souvent uniquement des bivalents (Zielinski & Scheid, 2012). Les hybrides F1 sont souvent stériles, alors que des amphiploïdes naturels fertiles ont été décrits, produits par des gamètes non réduits (David et al., 2004). L'élimination préférentielle de chromosomes d'un des parents sont très reportés dans les hybridations interspécifiques et permettent aussi d'expliquer un nombre inhabituel de chromosomes que nous avons obtenu pour les hybrides. L'absence du *Ph1* chez les diploïdes suggère son émergence par la polyploïdisation. Il contrôle la méiose à différents niveau mais l'appariement télomérique n'est pas affecté (Zielinski & Scheid, 2012). Le génome B du blé, est plus divergent que les génomes A et D présentant plus de similitudes entre eux. Ainsi, pour les hybrides *Ae.gen.*-blé dur, les associations méiotiques impliquent plus d'appariement entre les deux génomes de l'espèce sauvage avec le génome A plus que le génome B (Cifuentis et al., 2006). Les chromosomes homéologues qui ne s'apparient pas chez les hybrides F1 et leurs descendants limitent, ainsi, les transferts par recombinaison. De telles hybridations permettent d'aboutir au transfert d'un chromosome entier, d'un bras de chromosome ou d'un segment chromosomique (Jahier, 2004).

Ces mécanismes de transfert, ont été très étudiés et beaucoup de techniques moléculaires et cytogénétiques ont été élaborées afin de détecter avec plus de précision, l'introgression d'ADN étranger d'espèces sauvages dans les blés cultivés. La caractérisation de germplasm par les microsatellites, se révèle très utile dans les investigations moléculaires des espèces d'*Aegilops* et de leurs hybrides (Prazak & Paczos-Grzeda, 2013). Cependant, peu de marqueurs SSRs spécifiques aux chromosomes U et M ont été décrits, en dépit, de l'intérêt des espèces sauvages du genre *Aegilops*, notamment ceux porteurs des génomes U et M, dans l'amélioration génétique du blé (Schneider et al., 2010). Ainsi, parmi les 11 amorces SSR utilisées, deux d'entre-elles (*wmc44* et *wmc177*) n'ont pas été amplifiées dans les génomes des deux espèces tétraploïdes *Ae.geniculata* et *Ae.triuncialis* et des deux espèces diploïdes *Ae.comosa* et *Ae.umbellulata*. L'amorce *wms135* a été amplifiée uniquement chez *Ae.comosa*. En ce qui concerne les loci amplifiés chez ces espèces sauvages, des profils très différents ont été observés entre les deux espèces tétraploïdes, d'une part, et entre *Ae.gen.* et ces ancêtres diploïdes, entre *Ae.tri.* et son ancêtre donneur du génome U *Ae.umb.*, d'autre part. Majoritairement, ces amplifications ont été aussi différentes de celles des blés durs concernant le nombre et la taille des bandes amplifiées, permettant de distinguer nettement, les hybrides hétérozygotes pour deux loci (*Xbarc174* et *Xwms 332*).

## Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Les différences de tailles des génomes des *Triticées* résident aussi dans les séquences non-codantes et l'ADN répétitives (Caetano-Anollés, 2005). Des différences significatives ont été constatées dans la distribution de séquences satellites et les motifs SSRs GAAn et ACGn pour les mêmes chromosomes d'*Aegilops* apparentées (Molnár et al., 2011a). La variabilité génétique entre les espèces d'*Aegilops* est due à la divergence des génomes au cours de leurs spéciations. Les études attestent la divergence prononcée d'*Ae.geniculata* de ses parents diploïdes en comparaison avec *Ae.biuncialis*, issue des mêmes parents mais dont la spéciation serait plus récente. En plus, le génome M des *Aegilops* diploïdes et tétraploïdes est plus diversifié que celui des espèces possédant le génome U (Nagy et al., 2006 ; Molnár et al., 2011b).

Le marqueur *Xwms* 493 a été amplifié chez les deux espèces diploïdes alors que celles tétraploïdes n'ont pas amplifié ce marqueur. Pour le marqueur *Xwms* 135, *Ae.com* présente une amplification, alors qu'*Ae.gen.* ne présente aucune amplification. Les réarrangements que les allopolyploïdes ont subit après hybridation dont la perte de séquences génétiques (Molnár et al., 2011. a,b), peuvent expliquer l'absence de ces loci chez les parents femelles tétraploïdes.

Contrairement, pour le locus *Xbarc174*, les deux espèces diploïdes n'ont pas présenté une amplification, alors qu'*Ae.gen.* présente une amplification de ce marqueur. Idem, pour le locus *Xwmc161*, non amplifié chez *Ae.umb.* mais amplifié chez *Ae.tri.*

Pour les hybrides, plusieurs situations d'amplifications ont été constatées, dans notre étude. Certains hybrides présentent l'amplification de certains marqueurs et non d'autres, parfois provenant du parent mâle blé dur et d'autres fois du parent femelle *Aegilops*. Ces différences ont été observées, pour les hybrides issus des mêmes parents. L'exemple le plus remarquable est celui des loci *Xwmc25* et *Xwms* 257, situés sur le bras court du chromosome 2B, pour lesquels, respectivement, l'hybride (1) *Ae.gen./O.Z.* présente une amplification pour le premier marqueur et non pour le deuxième. Inversement, l'hybride (6) *Ae.gen./O.Z.*, n'a pas amplifié le premier marqueur, mais présente une amplification pour le deuxième.

### Chapitre III : Résultats et Discussion

---

Une deuxième situation, concerne les hybrides dont l'amplification est non similaire aux parents femelles tétraploïdes, mais plutôt à l'espèce diploïde ancestrale. A titre d'exemples : pour le locus *Xwmc488*, la bande amplifiée chez *Ae.umb.* de 161pb est présente chez *Ae.tri./O.Z.(3)*, alors qu'aucune des bandes d'*Ae.tri.* n'ont été répertoriées chez lui ; celle de 166pb chez l'hybride (8) *Ae.gen./Sem* aussi spécifique à celle d'*Ae.umb.* Pour l'amorce *Xwms 124*, les hybrides *Ae.gen./O.Z.2 4* et *5* et *Ae.tri/O.Z2* présentent les bandes 190 et 200 (205 pour *Ae.gen./O.Z.4*) commune à *Ae.com.* Ainsi que l'hybride *Ae.tri/O.Z.(1)* qui présente le même profil qu'*Ae.umb.* avec une bande de 105pb. *Ae.tri/O.Z.(3)* présente quant à lui, en plus des deux bandes 190 et 200pb, une autre bande de 175pb, uniquement répertoriée chez cet hybride.

La génétique des tétraploïdes est plus compliquée que celle des diploïdes car, chez de tels individus, plus de deux allèles peuvent être présents au même locus. Le dosage d'un allèle peut varier donc de 0 à 4 copies, suite aux appariements préférentiels et les possibilités de recombinaison peuvent se réaliser à des degrés différents (Voorrips & Maliepaard, 2012). En plus, des mécanismes de régulation génétique et épigénétique complexes, gouvernent l'expression génomique spécifique chez les espèces végétales allopolyploïdes (Li et al., 2020). Dans les hybrides allopolyploïdes synthétiques, les changements peuvent être immédiats englobant : les pertes de gènes, inactivation des gènes, changement dans l'expression de gènes et une expression de tissus spécifiques des deux génomes, de copies de mêmes loci (Baack & Rieseberg, 2007). L'allopolyploïdisation induit soit l'inactivation des gènes soit la méthylation des cytosines de certaines séquences d'ADN uniques et répétitives, ce qui peut conduire à une mutation dans le site d'hybridation de l'amorce, et se traduire par un allèle nul (pas d'amplification) (Sharma et al., 2002).

**CONCLUSION**

**GENERALE**

## Conclusion générale

---

Les hybridations interspécifiques jouent un rôle clé dans l'élargissement de la variabilité génétique, les résultats des ségrégations peuvent être spectaculaires se traduisant par des phénotypes inattendus et qui peuvent ouvrir plusieurs possibilités aux généticiens dans les programmes d'amélioration.

Nous avons entrepris dans cette étude, l'hybridation de deux espèces du genre *Aegilops* et trois variétés de blé dur. Le genre *Aegilops* est un réservoir de gènes pour l'amélioration génétique du blé dur, notamment pour le stress hydrique, contrainte majeure de sa production. L'application d'un stress hydrique, sous serre, a remarquablement distingué les *Aegilops* surtout *Ae.geniculata* pour leur tolérance à la sécheresse. La variété Oued Zenati, a affiché sa supériorité de réponse parmi les blés durs étudiés. Ces Résultats justifient, justement, notre choix des géniteurs impliqués dans les croisements interspécifiques dans le but de l'amélioration génétique du blé dur par les espèces sauvages pour la tolérance à la sécheresse.

L'identification de marqueurs moléculaires associés aux mécanismes de tolérance à la sécheresse, aussi bien chez les espèces sauvages que celles cultivées, reste un grand enjeu, qui permettra de préciser les chromosomes et les tailles de fragments chromosomiques à introduire dans le blé. Permettant de maîtriser des caractères à introduire et de faciliter les croisements interspécifiques souvent heurtés aux problèmes d'incompatibilité des génomes et d'homéologie des chromosomes, conséquence de la mise en place de barrières d'isolement post zygotique, au cours de la spéciation entre le blé et les espèces sauvages.

D'où la constatation, dans notre étude, par la réalisation de croisements interspécifiques impliquant les deux espèces tétraploïdes d'*Aegilops* (*Ae.geniculata* et *Ae.triuncialis*) comme parent femelle, d'une hérédité cytoplasmique femelle chez les hybrides, accompagnée de plusieurs problèmes de germination, d'anomalies de développement et de létalité. Bien que, les hybrides ont été récoltés en caryopses en très bon état et sans recours au sauvetage d'embryons.

## Conclusion générale

---

Les marqueurs moléculaires SSRs se sont avérés, un puissant outil pour la caractérisation des hybrides dans des stades très précoces de leur développement, au niveau même de la graine. Ces marqueurs ont permis de détecter les hétérozygotes grâce à leur propriété co-dominante. Les profils d'amplifications remarquablement différents entre hybrides, notamment pour ceux ayant les mêmes parents, témoignent de la complexité génétique chez les hybrides, lors de la rencontre de génomes parentaux divergents. Le nombre de chromosomes incomplet que nous avons obtenu pour un hybride, la révélation de fragmentation des chromosomes et l'élimination différenciée de ses fragments chez des hybrides ayant les mêmes parents, ou encore une élimination complète de chromosomes, attestent les conséquences dramatiques qu'occasionnent, la perte de l'ADN et/ou le changement d'expression de gènes pour le fonctionnement cellulaire.

Les croisement interspécifiques sont donc affectés par plusieurs paramètres dont le génotype des parents impliqués et le degré de parenté sont des critères importants, du fait de l'existence de gènes inhibant les appariements homéologues entre les génomes parentaux ainsi que la mise en place de gènes causant la létalité et la stérilité des hybrides chez certaines espèces, lors de la spéciation. L'étude et la compréhension de ces mécanismes ainsi que l'identification des gènes qui y sont responsables permettront de surmonter ces barrières et faciliteront l'obtention d'hybrides afin de réussir les programmes d'introgession de gènes d'intérêt depuis les espèces sauvages.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références Bibliographiques

---

- Adhikari, T. B., Wallwork, H., & Goodwin, S. B. (2004).** Microsatellite markers linked to the *Stb2* and *Stb3* genes for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Crop Science*, 44(4), 1403-1411.
- Al Hakimi, A., Monneveux, P., & Nachit, M. M. (1998).** Direct and indirect selection for drought tolerance in alien tetraploid wheat x durum wheat crosses. *Euphytica*, 100(1-3), 287-294.
- Ali Dib, T., & Monneveux, P. (1992).** Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I. Caractères morphologiques d'enracinement. *Agronomie*, 12(5), 371-379.
- Ali Dib, T., Monneveux, P., & Araus, J.L. (1992).** Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. II. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie*, EDP Sciences, 12 (5), pp.381-393. fhal-00885484f
- Al-Kaff, N., Knight, E., Bertin, I., Foote, T., Hart, N., Griffiths, S., & Moore, G. (2007).** Detailed dissection of the chromosomal region containing the Ph1 locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling. *Annals of botany*, 101(6), 863-872.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011).** Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032.
- Anonyme a, (2020).** <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>
- Anonyme. (2006).** L'obtention variétale en Algérie. Cas des céréales à paille. Institut National de la recherche Agronomique d'Algérie.
- Ashraf, M. (2010).** Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances*, 28(1), 169-183.
- Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P. J. C., & Kwon, T. R. (2008).** Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in agronomy*, 97, 45-110.
- Attab, S., & Brinis, L. (2012).** Etude comparative de la réponse physiologique de deux variétés de blé dur (*Triticum durum Desf.*) à l'infection par *Blumeria graminis f. sp.*

## Références Bibliographiques

---

- tritici* agent causal de l'oïdium. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 25(1), 82-87.
- Baack, E. J., & Rieseberg, L. H. (2007).** A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current opinion in genetics & development*, 17(6), 513-518.
- Baalbaki, R., Hajj-Hassan, N., & Zurayk, R. (2006).** *Aegilops* Species from semiarid areas of Lebanon: Variation in quantitative attributes under water stress. *Crop science*, 46(2), 799-806.
- Bajji, M., Lutts, S., & Kinet, J. M. (2000).** La résistance au stress hydrique chez le blé dur: Comparaison des comportements au niveau cellulaire et au niveau de la plante entière. *Options Mediterr. Ser. A*, 40, 227-231.
- Bálint, A. F., Kovács, G., Erdei, L., & Sutka, J. (2001).** Comparison of the Cu, Zn, Fe, Ca and Mg contents of the grains of wild, ancient and cultivated wheat species. *Cereal Research Communications*, 375-382.
- Bammoun, A. (1997).** Induction de mutations morphophysologiques chez le blé et l'orge, utilisation pour l'amélioration génétique, de la tolérance à la recherche. *Revue Technique et Scientifique, Céréaliculture*, n°30.ITGC.
- Bandou, H., Rodriguez-Quijano, M., Carrillo, J. M., Branlard, G., Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2009).** Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. *Plant systematics and evolution*, 277(1-2), 85.
- Barikissou, E. & Baudoin, J.P. (2012).** Sauvetage d'embryons chez les légumineuses alimentaires en général et dans le genre *Phaseolus* en particulier (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16. (2) : 203-215
- Belhassen, É., This, D., & Monneveux, P. (1995).** L'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. *Cahiers agricultures*, 4(4), 251-261.
- Ben Abdallah, N., & Ben Salem, M. (1993).** Paramètres morphophysologiques de sélection pour la résistance à la sécheresse des céréales (No. 94-075911. CIMMYT.). Tolérance

## Références Bibliographiques

---

- à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier (France). 15-17 Déc. 1992.
- Benabdelhafid, Z., Bouldjadj, R., Ykhlef, N., & Djekoun, A. (2015).** Selection for salinity tolerance and molecular genetic markers in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). *International Journal of Advanced Research* (2015), 3(10), 397-406.
- Benbelkacem, A., & Kellou, K. (2000).** Évaluation du progrès génétique chez quelques variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) cultivées en Algérie. *Options Mediterr CIHEAM Ser A*, 40, 105-110.
- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., & Mergeai, G. (2006).** Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(2), 77-81.
- Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhlef, N., Djekoun, A., Masmoudi, K., & Bouzerzour, H. (2011).** Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *ISRN Agronomy*, 2012.
- Benlaribi, M., Monneveux, P., & Grignac, P. (1990).** Étude des caractères d'enracinement et de leur rôle dans l'adaptation au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf).
- Bertin, P., Grégoire, D., Massart, S., & De Froidmont, D. (2001).** Genetic diversity among European cultivated spelt revealed by microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 148-156.
- Bohorova, N. E., Pfeiffer, W. H., Mergoum, M., Crossa, J., Pacheco, M., & Estanol, P. (2001).** Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant breeding*, 120(4), 291-295.
- Bouatrous, Y., Bousba, R., Djekoun, A., & Ykhlef, N. (2012).** Evaluation of salinity tolerance of wheat (*Triticum durum* Desf) at the level cellular and plantlet. *Advances in Environmental Biology*, 1381-1392.

## Références Bibliographiques

---

- Bouchemal, K., Bouldjadj, R., Belbekri, M.N, Ykhlef, N., & Djekoun, A. (2018).** Pigments photosynthétiques, enzymes antioxydantes et potentiel osmotique foliaire de dix génotypes de blé dur (*Triticum durum*): effet du stress hydrique. *Phytoprotection*, 98(1), 13-24.
- Bouchemal, K., Bouldjadj, R., Belbekri, M.N., Ykhlef, N., & Djekoun, A. (2017).** Differences in antioxidant enzyme activities and oxidative markers in ten wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes in response to drought, heat and paraquat stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(5), 710-722.
- Bousba, R., Baum, M., Jighy, A., Djekoune, A., Lababidi, S., Benbelkacem, A., Labhilili, D.M., Gaboun, D.F., & Ykhlef, N. (2013).** Association analysis of genotypic and phenotypic traits using SSR marker in Durum wheat. *OIJR*, 3, 60-79.
- Breseghele, F., Sorrells, M.E. (2006).** Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172:1165–1177
- Bretting, P.K., Widrlechner, M.P. (1995).** Genetic markers and plant genetic resource management. In: Janick J, ed. Plant Breeding Reviews, Vol 13. Pp11 -86. John Wiley & Sons Inc. New York, USA.
- Caetano-Anollés, G. 2005.** Evolution of genome size in the grasses. *Crop Science*, 45(5): 1809-1816.
- Cakmak, I., & Marschner, H. 1992.** Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiology*, 98(4), 1222-1227.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., & Giorio, G. (2002).** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3), 301-307.
- Cattivelli, L., Rizza, F., Badeck, F. W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A. & Stanca, A. M. (2008).** Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field crops research*, 105(1-2), 1-14.

## Références Bibliographiques

---

- Ceoloni, C., Signore, G. D., Ercoli, L., & Donini, P. (1992).** Locating the alien chromatin segment in common wheat-*Aegilops longissima* mildew resistant transfers. *Hereditas*, 116, 239-245.
- Chahbar, S. & Belkhodja, M. (2016).** Water deficit effects on morpho-physiological parameters in durum wheat. *J. Fundam. Appl. Sci.*,8(3), 1166-1181.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003).** Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Cherkaoui, S., Lamsaouri, O., Chlyah, B., & Chlyah, H. (2001).** Amélioration de la régénération chlorophyllienne chez le blé dur: utilisation de la culture d'anthères après croisements interspécifiques.
- Cifuentes, M., & Benavente, E. (2009).** Wheat-alien metaphase I pairing of individual wheat genomes and D genome chromosomes in interspecific hybrids between *Triticum aestivum* L. and *Aegilops geniculata* Roth. *Theoretical and applied genetics*, 119(5), 805-813.
- Cifuentes, M., Blein, M., & Benavente, E. (2006).** A cytomolecular approach to assess the potential of gene transfer from a crop (*Triticum turgidum* L.) to a wild relative (*Aegilops geniculata* Roth.). *Theoretical and applied genetics*, 112(4), 657-664.
- Clarck, J. M., & McCaig, T. N. (1982).** Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 62(3), 571-578.
- Combes Gavalda, M-C. (2015).** Polyploidie et adaptation des plantes : caractérisation et variation de l'expression des gènes homoélogues chez le caféier *Coffea arabica*. Biologie végétale. Thèse de doctorat, Université Montpellier, France.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008).** Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.
- David, J. L., Benavente, E., Bres-Patry, C., Dusautoir, J. C., & Echaide, M. (2004).** Are neopolyploids a likely route for a transgene walk to the wild? The *Aegilops ovata* ×

## Références Bibliographiques

---

- Triticum turgidum durum* case. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 503-510.
- De Vries, A.Ph. 1971.** Flowering biology of wheat, particularly in view of hybrid seed production-A review. *Euphytica* **23**: 152-170.
- Delannoy, É., Marmey, P., Penel, C., & Nicole, M. (2004).** Les peroxydases végétales de classe III. *Acta botanica gallica*, 151(4), 353-380.
- Demol, J. (2002).** Amélioration des plantes: Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Presses Agronomiques de Gembloux.
- Djebali, W., Chaïbi, W., & Ghorbel, M. H. (2002).** Croissance, activité peroxydasique et modifications ultrastructurales induites par le cadmium dans la racine de tomate. *Canadian journal of botany*, 80(9), 942-953.
- Djekoun A. & Ykhlef N. (1996).** Déficit hydrique, effets stomatiques et non-stomatiques et activité photosynthétique chez quelques génotypes de blé Tétraploïdes. 3ème Réunion du réseau SEWANA, de blé dur IAV HASSAN II (Maroc).
- Dreisigacker, S., Zhang, P., Warburton, M. L., Van Ginkel, M., Hoisington, D., Bohn, M., & Melchinger, A. E. (2004).** SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different megaenvironments. *Crop science*, 44(2), 381-388.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dumont, J. (2013).** Rôle de la régulation stomatique et de la capacité de détoxification foliaire dans l'estimation d'un seuil de risque à l'ozone pour la végétation. Thèse de Doctorat. Univ. de Lorraine. France.
- El Jaafari, S., Qariani, L., El Hadrami, I., Fagroud, M., & Paul, R. (2001).** Intégration des outils biotechnologiques et agrophysiologiques: le blé, une plante modèle. 517-536.

## Références Bibliographiques

---

- Fernández-Calvín, B., & Orellana, J. (1990).** High molecular weight glutenin subunit variation in the *Sitopsis* section of *Aegilops*. Implications for the origin of the B genome of wheat. *Heredity*, 65(3), 455.
- Feuillet, C. (2004).** **Génomique comparée chez les graminées.** Actes du Séminaire International « La fluidité des génomes et ses conséquences ». Commission du Génie Biomoléculaire. 8-9 Novembre 2004. Pp8-9
- Gallais, A. (2002).** Evolution des concepts, méthodes et outils de l'amélioration des plantes. Colloque « l'amélioration des plantes, continuités et ruptures ». Montpellier, octobre 2002.
- Gallais, A. (2015).** Comprendre l'amélioration des plantes: Enjeux, méthodes, objectifs et critères de sélection. Quae.France.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Guadagnuolo, R., Savova-Bianchi, D., & Felber, F. (2001).** Gene flow from wheat (*Triticum aestivum* L.) to jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.), as revealed by RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and applied Genetics*, 103(1), 1-8.
- Gupta, P. K., & Varshney, R. K. (2000).** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163-185.
- Hadas, A. (2004).** Seedbed preparation: The soil physical environment of germinating seeds. *Handbook of seed physiology: Applications to Agriculture*.
- Hadzhiivanova, B., Bozhanova, V., Dechev, D. (2012).** Interspecific Hybridization Between Durum Wheat and *Aegilops Umbellulata* (Zhuk.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 18(5): 713-721.

## Références Bibliographiques

---

- Hafsi, M., Monneveux, P., Merah, O., & Djekoune, A. (2001).** Discrimination isotopique du carbone et rendement du blé dur dans les hautes plaines sétifiennes, Algérie. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 12(1), 37-43.
- Hamla, C., Brini, F., Ayadi, M., Masmoudi, K., Djekoun, A., & Ykhlef, N. (2014).** Drought stress response in two Algerian durum wheat genotypes: physiological and molecular analysis of two stress responsive genes. *International Journal*, 2(10), 330-338.
- Harrison, R. G. (1990).** Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford surveys in evolutionary biology*, 7, 69-128.
- Hassani A ; Dellal A ; Belkhodja M & Kaid-Harche M. (2008).** Effets de la salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum vulgare*). *European journal of Scientific Research*. Vol. 23, N°1, pp. 61-69.
- Henchi, B. (1987).** Effet des contraintes hydriques sur l'écologie et l'écophysiologie de *Plantago albicans*. Thèse de doctorat d'État. Univ. Tunis, Tunisie. p360.
- Hernández, P., Dorado, G., Laurie, D. A., Martin, A., & Snape, J. W. (2001).** Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop Miscanthus. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(4), 616-622.
- Hogg, N., & Kalyanaraman, B. (1999).** Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1411(2-3), 378-384.
- Houasli C., Nasserlhaq, N., Elbouhmadi, K., Mahboub, S., Sripada, U. (2014).** Effet du stress hydrique sur les critères physiologiques et biochimiques chez neuf génotypes de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Nature & Technologie. B-Sciences Agronomiques et Biologiques*, 11 : 08-16.
- Howes, N. K., Woods, S. M., & Townley-Smith, T. F. (1998).** Simulations and practical problems of applying multiple marker assisted selection and doubled haploids to wheat breeding programs. *Euphytica*, 100(1-3), 225-230.

## Références Bibliographiques

---

- Ijaz, S., & Khan, I. A. (2009).** Molecular characterization of wheat germplasm using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 8(3), 809-815.
- Institut Technique des Grandes Cultures. (1996).** Les principales variétés de céréales cultivées en Algérie.
- Jahier, J. (2004).** Hybridation interspécifique et introgression chez les blés : Intérêt et conséquence au niveau des génomes. Actes du Séminaire International « La fluidité des génomes et ses conséquences. Commission du Génie Biomoléculaire. 8-9 Novembre 2004. Pp 20-21
- Jahier, J., Chalhoub, B., & Charcosset, A. (2006).** La domestication des plantes: de la cueillette à la post-génomique. *Biofutur*, 266, 28.
- Jahier, J., Chevre, A.M., Eber, F., Delourme, R., Tanguy, A.M et le groupe de travail INRA « Cytologie et Cytogénétique ».(1992).** Techniques de cytogénétique végétale. INRA edition. Paris p183.
- Jatoi, W. A., Baloch, M. J., Khan, N. U., Munir, M., Khakwani, A. A., Vessar, N. F., Panhwar, S. A. & Gul, S. (2014).** Heterosis for yield and physiological traits in wheat under water stress conditions. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(1), 252-61.
- Jauhar, P. P., & Peterson, T. S. (1996).** **Thinopyrum and Lophopyrum as sources of genes for wheat improvement.** *Cereal Research Communications*, vol.24 No 1 : 15-21.
- Joukhadar, R. & Jighly, A. (2012).** Microsatellites grant more stable flanking genes. *BMC Research Notes* 5: 556.
- Kacem, N. S., Delporte, F., Muhovski, Y., Djekoun, A., & Watillon, B. (2017).** In vitro screening of durum wheat against water-stress mediated through polyethylene glycol. *Journal of genetic engineering and biotechnology*, 15(1), 239-247.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A.K. (2011).** Microsatellite Markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.

## Références Bibliographiques

---

- Kameli, A., & Lösel, D. M. (1995).** Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water stress. *Journal of plant physiology*, 145(3), 363-366.
- Keller, B., & Feuillet, C. (2000).** Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends in plant science*, 5(6), 246-251.
- Kerber, E. R., & Dyck, P. L. (1990).** Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* × *Triticum monococcum*. *Genome*, 33(4), 530-537.
- Khazaei, H., Mohammady, S. D., Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2009).** Carbon isotope discrimination and water use efficiency in Iranian diploid, tetraploid and hexaploid wheats grown under well-watered conditions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(1), 105-114.
- Kihara, H. (1937).** Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops* VII. Kurze übersicht über die Ergebnisse der Jahre 1934-36. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.*, 41, 1-61. In : **Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2006).** Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Science*, 46(2), 512-527.
- Korzun, V., Börner, A., Worland, A. J., Law, C. N., & Röder, M. S. (1997).** Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 95(2), 149-155.
- Kosová, K., Vítámvás, P., & Prášil, I. T. (2014).** Proteomics of stress responses in wheat and barley. Search for potential protein markers of stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 5, 711.
- Lan, C., Rosewarne, G. M., Singh, R. P., Herrera-Foessel, S. A., Huerta-Espino, J., Basnet, B. R., Zhang, Y. & Yang, E. (2014).** QTL characterization of resistance to leaf rust and stripe rust in the spring wheat line Francolin# 1. *Molecular breeding*, 34(3), 789-803. In : **Anonyme a, (2020).** <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>

## Références Bibliographiques

---

- Langridge, P., Lagudah, E. S., Holton, T. A., Appels, R., Sharp, P. J., & Chalmers, K. J. (2001).** Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(12), 1043-1077.
- Levitt, J. (1980).** *Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses* (No. Ed. 2). Academic Press.
- Li, J., WAN, H. S., & YANG, W. Y. (2014).** Synthetic hexaploid wheat enhances variation and adaptive evolution of bread wheat in breeding processes. *Journal of Systematics and Evolution*, 52(6), 735-742.
- Li, M., Wang, R., Wu, X., & Wang, J. (2020).** Homoeolog expression bias and expression level dominance (ELD) in four tissues of natural allotetraploid *Brassica napus*. *BMC genomics*, 21, 1-15.
- Louali, Y., Belbekri, N., Bouldje, R., Ykhlef, N., & Djekoun, A. (2015).** Effect of gamma irradiation on morphological, biochemical, physiological character and cytological studies, of durum wheat mutants. *International Journal of Advanced Research*, 3(10), 246-256.
- Lyons, K. G., Shapiro, A. M., & Schwartz, M. W. (2010).** Distribution and ecotypic variation of the invasive annual barb goatgrass (*Aegilops triuncialis*) on serpentine soil. *Invasive Plant Science and Management*, 3(4), 376-389.
- Madlung, A., & Wendel, J. F. (2013).** Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants. *Cytogenetic and genome research*, 140(2-4), 270-285.
- Makkouk, K. M., Ghulam, W., & Comeau, A. (1994).** Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species. *Canadian journal of plant science*, 74(3), 631-634.
- Martinez, C. (1997).** Rôle des peroxydases dans la résistance du cotonnier à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*. Thèse de doctorat. Univ. Montpellier 2, France.
- Martins, B. A., Sun, L., & Mallory-Smith, C. (2015).** Resistance allele movement between imazamox-resistant wheat and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) in eastern Oregon wheat fields. *Weed Science*, 63(4), 855-863.

## Références Bibliographiques

---

- Marty, J. T., Sweet, S. B., & Buck-Diaz, J. J. (2015).** Burning controls barb goatgrass (*Aegilops triuncialis*) in California grasslands for at least 7 years. *Invasive Plant Science and Management*, 8(3), 317-322.
- Masoomi-Aladizgeh, F., Aalami, A., Esfahani, M., Aghaei, M. J., & Mozaffari, K. (2015).** Identification of CBF14 and NAC2 genes in *Aegilops tauschii* associated with resistance to freezing stress. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(4), 1059-1070.
- Matsuoka, Y., Takumi, S., & Kawahara, T. (2007).** Natural variation for fertile triploid F 1 hybrid formation in allohexaploid wheat speciation. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(4), 509-518.
- Maurino, V. G., & Peterhansel, C. (2010).** Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Current opinion in plant biology*, 13(3), 248-255.
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A. M., & Cattivelli, L. (2008).** Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science*, 174(4), 420-431.
- McIntosh, R. A. (1991).** Alien sources of disease resistance in bread wheats. In *Proceedings of Dr H. Kihara Memorial International Symposium on Cytoplasmic Engineering in Wheat* (pp. 3-6).
- Meziani, L., Bammoun, A., Hamou, M., Brinis, L., & Monneveux, P. (1993).** Essai de définition des caractères d'adaptation du blé dur dans différentes zones agroclimatiques de l'Algérie (No. 94-075912. CIMMYT.). Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier (France). 15-17 Dec 1992.
- Minolta Co. Ltd 1989 In : Li, D., & Zhao, C. (Eds.). (2009).** Computer and Computing Technologies in Agriculture II, Volume 1: The Second IFIP International Conference on Computer and Computing Technologies in Agriculture (CCTA2008), October 18-20, 2008, Beijing, China (Vol. 293). Springer.

## Références Bibliographiques

---

- Mizuno, N., Hosogi, N., Park, P., & Takumi, S. (2010).** Hypersensitive response-like reaction is associated with hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. *PLoS One*, 5(6), e11326.
- Molnár, I., Benavente, E., & Molnar-Lang, M. (2009).** Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum*–*Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic in situ hybridization. *Genome*, 52(2), 156-165.
- Molnár, I., Cifuentes, M., Schneider, A., Benavente, E., & Molnár-Láng, M. (2011) a.** Association between simple sequence repeat-rich chromosome regions and intergenomic translocation breakpoints in natural populations of allopolyploid wild wheats. *Annals of Botany*, 107(1), 65-76.
- Molnár, I., Dulai, S., Csernák, Á., Prónay, J., & Molnár-Láng, M. (2005).** Photosynthetic responses to drought stress in different *Aegilops* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), 141-142.
- Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M., & Galiba, G. (2004).** Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31(12), 1149-1159.
- Molnár, I., Kubaláková, M., Šimková, H., Cseh, A., Molnár-Láng, M., & Doležel, J. (2011) b.** Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata*. *PLoS One*, 6(11), e27708.
- Monneveux, P., & Nemmar, M. (1986).** Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, EDP Sciences, 6 (6), pp.583-590. hal-00884913.
- Monneveux, P., & This, D. (1997).** La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse: espoirs et difficultés. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 8(1), 29-37.

## Références Bibliographiques

---

- Morgan, J. M., & Tan, M. K. (1996).** Chromosomal location of a wheat osmoregulation gene using RFLP analysis. *Functional Plant Biology*, 23(6), 803-806.
- Morgan, J.M. (1984).** Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35 : 299-550
- Mouellef, A., Bousba, R., Djekoun, A., & Ykhlef, N. (2018).** Influence of water stress on some biochemical markers pigment contents and osmotic adjustment of durum wheat leaves induced by PEG 6000. *International Journal of Biosciences Vol. 12*, No. 5, p. 21-31.
- Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A. G., Dundas, I., Rasheed, A., Ogbonnaya, F., Kishii, M., Bonnett, D., Wang, R.R-C., Xu, S., Chen, P., Mahmood, T., Bux, H Farrakh, S.(2013).** Genetic diversity for wheat improvement as a conduit to food security. In *Advances in agronomy* (Vol. 122, pp. 179-257). Academic Press.
- Munir, A., Akram, Z., Munir, M. & Rauf, M. (2006).** Physio-morphic response of wheat genotypes under rainfed conditions. *Pakistan Journal of Boanyt.* 38:1697-1702.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nachit, M. M. (1997).** Network for integrated research to improve durum wheat productivity in the Mediterranean region. In *Wheat: Prospects for Global Improvement* (pp. 561-570). Springer, Dordrecht.
- Najimi, B., El Jaafari, S., Jlibène, M., & Jacquemin, J. M. (2003).** Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 7(1), 17-35.
- Nazco, R., Villegas, D., Ammar, K., Pena, R. J., Moragues, M., & Royo, C. (2012).** Can Mediterranean durum wheat landraces contribute to improved grain quality attributes in modern cultivars?. *Euphytica*, 185(1), 1-17.

## Références Bibliographiques

---

- Outlaw, W. H., Manchester, J., DiCamelli, C. A., Randall, D. D., Rapp, B., & Veith, G. M. (1979).** Photosynthetic carbon reduction pathway is absent in chloroplasts of *Vicia faba* guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(12), 6371-6375.
- Peil, A., Korzun, V., Schubert, V., Schumann, E., Weber, W. E., & Röder, M. S. (1998).** The application of wheat microsatellites to identify disomic *Triticum aestivum*-*Aegilops markgrafii* addition lines. *Theoretical and applied genetics*, 96(1), 138-146.
- Perrino P., Laghetti G., Cifarelli S., Volpe N., Spagnoletti-Chichester PL., Zeuli UK. 1993.** Wild wheats in southern Italy. In: *Damania AB (ed) Biodiversity and wheat improvement*. Wiley, Chichester, pp 361–368.
- Picard, E., Crambes, E., & Mihamou-Ziyyat, A. (1994).** L'haplodiploïdisation: Un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed: AUPELF-UREF.
- Prazak, R., & Paczos-Grzeda, E. (2013).** Characterization of *Aegilops kotschy* Boiss. x *Triticum aestivum* L. hybrid lines. *Acta Agrobotanica*, 66(4), 109–120.
- Quarrie S.A., Steed, A., Pekic', S., Lazic'-Janc'ic', V., Semikhodsky, A., Tuberosa, R., Calestani, C. (1995).** Molecular marker technology and stomatal conductance in drought-stressed maize. Crop to study the role of abscisic acid. In: *Proceedings of BIOFOSP Science 34*, 1557–1563. 1995, Ljubljana, 69–76.
- Quarrie, S. A., Lazić-Jančić, V., Kovačević, D., Steed, A., & Pekić, S. (1999).** Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of experimental botany*, 50(337), 1299-1306.
- Quarrie, S.A., Gulli, M., Calestani, C., Steed, A., Marmioli N. (1994).** Location of a gene regulating drought-induced abscisic acid production on the long arm of chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 89:794–800.
- Quarrie, S.A., Steed, A., Calestani, C., Semikhodskii, A., Lebreton, C., Chinoy, C., Steele, N., Pljevljakusić, D., Waterman, E., Weyen, J., Schondelmaier, J., Habash, D.Z., Farmer, P., Saker, L., Clarkson, D.T., Abugalieva, A.,**

## Références Bibliographiques

---

- Yessimbekova, M., Turuspekov, Y., Abugalieva, S., Tuberosa, R., Sanguineti, M-C., Hollington, P. A., Aragués, R., Royo, A., & Dodig, D. (2005). A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring× SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5), 865-880.
- Rakszegi, M., Molnár, I., Lovegrove, A., Darkó, É., Farkas, A., Láng, L., Bedo", Z., Doležel, J., Molnár-Láng, M. & Shewry, P. (2017). Addition of *Aegilops* U and M chromosomes affects protein and dietary fiber content of wholemeal wheat flour. *Frontiers in plant science*, 8, 1529.
- Rauf, S., Al-Khayri, J. M., Zaharieva, M., Monneveux, P., & Khalil, F. (2016). Breeding strategies to enhance drought tolerance in crops. In *Advances in plant breeding strategies: Agronomic, abiotic and biotic stress traits* (pp. 397-445). Springer, Cham.
- Redinbaugh, M. G., Jones, T. A., & Zhang, Y. (2000). Ubiquity of the St chloroplast genome in St-containing *Triticeae* polyploids. *Genome*, 43(5), 846-852.
- Rekikda, D., Zaharieva, M., Stankova, P., Xu, X., Soururis, I. & Monneveux, P. **Abiotic stress tolerance in *Aegilops* species.** (1998). Abiotic stress tolerance in *Aegilops* species. *Durum Research Network, Proceeding of the SEWANA, South Europe, West Asia and North Africa* (eds MM Nachit, M Baum, E Porceddu, P Monneveux, E Picard), 113-118.
- Rieseberg, L. H., & Carney, S. E. (1998). Plant hybridization. *The New Phytologist*, 140(4), 599-624.
- Roder, M. S., Wendehake, K., Korzun, V., Bredemeijer, G., Laborie, D., Bertrand, L., Isaac, P., Rendell, S., Jackson, J., Cooke, R. J., Vosman, B., & Ganal, M.W. (2002). Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(1), 67-73.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., & Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4), 2007-2023. In : Anonyme a, (2020). <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>

## Références Bibliographiques

---

- Rodriguez-Quijano M, Nieto-Taladriz, M.T & Carrillo, J.M. (2000).** Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in three species of *Aegilops*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48:599–607.
- Rolland, B., Jahier, J., Branlard, G., Duperrier, B., Lonnet, P., Senellart, P., Margalé, E. & Olivier, A. (2014).** Exploitation de la variabilité génétique d'*Aegilops tauschii* dans l'amélioration du blé tendre. *Innovations Agronomiques*, 35, 119-131.
- Said, M., Parada, A. C., Gaál, E., Molnár, I., Cabrera, A., Doležel, J., & Vrána, J. (2019).** Uncovering homeologous relationships between tetraploid *Agropyron cristatum* and bread wheat genomes using COS markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(10), 2881-2898.
- Saintenac, C. (2009).** Analyse de la distribution des crossing-overs sur le chromosome 3B du blé tendre (*Triticum aestivum*) et des facteurs influençant cette distribution. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II, France.
- Santoni, S., Faivre-Rampant, P., Prado, E. & Prat, D. (2000).** Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 9(4), 311-327.
- Schlötterer, C. (2000).** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
- Schlötterer, C. in Hoelzel, A. R. (1998).** Molecular Genetic Analysis Of Populations: A Practical Approach (*Practical Approach Series*). Chapter 7: Microsatellites. Oxford University Press.
- Schneider, A., Molnár, I., & Molnár-Láng, M. (2008).** Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, 163(1), 1-19.
- Schneider, A., Molnár, I., & Molnár-Láng, M. (2010).** Selection of U and M genome-specific wheat SSR markers using wheat–*Aegilops biuncialis* and wheat–*Ae. geniculata* addition lines. *Euphytica*, 175(3), 357-364.

## Références Bibliographiques

---

- Schoenenberger, N., Felber, F., Savova-Bianchi, D., & Guadagnuolo, R. (2005).** Introgression of wheat DNA markers from A, B and D genomes in early generation progeny of *Aegilops cylindrica* Host × *Triticum aestivum* L. hybrids. *Theoretical and applied genetics*, 111(7), 1338-1346.
- Scholz, H. (2007).** Notes on *Aegilops* (*Poaceae*). *Willdenowia*, 37(2): 431-434.
- Sears, E.R. (1941).** Chromosome pairing and fertility in hybrids and amphiploids in the Triticinae. *Res. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn. 337*: 1-20. In: **Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2006).** Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Science*, 46(2), 512-527.
- Semikhodskii, A. G., Quarrie, S. A., & Snape, J. W. (1997).** Mapping quantitative trait loci for salinity responses in wheat. *Cereal Research Department*, 83-92.
- Serraj, R., Hash, T. C., Buhariwalla, H. K., Bidinger, F. R., Folkertsma, R. T., Chandra, S., Gaur, P.M., Kashiwagi, J., Nigam, S.N., Rupakula, A. & Crouch, J. H. (2005).** Marker-assisted breeding for crop drought tolerance at ICRISAT: achievements and prospects. In *Proceedings of the International Congress "In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution"*. Avenue Media. Bologna. Italy (pp. 217-238).
- Serraj, R., Kumar, A., McNally, K. L., Slamet-Loedin, I., Bruskiewich, R., Mauleon, R., Mauleon, R., Cairns, J. & Hijmans, R. J. (2009).** Improvement of drought resistance in rice. In *Advances in agronomy* (Vol. 103, pp. 41-99). Academic Press.
- Serraj, R., McNally, K. L., Slamet-Loedin, I., Kohli, A., Haefele, S. M., Atlin, G., & Kumar, A. (2011).** Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management strategy. *Plant Production Science*, 14(1), 1-14.
- Shang, Y., Dai, C., Lee, M. M., Kwak, J. M., & Nam, K. H. (2016).** BRI1-associated receptor kinase 1 regulates guard cell ABA signaling mediated by open stomata 1 in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 9(3), 447-460.

## Références Bibliographiques

---

- Sharma, S., Balyan, H. S., Kulwal, P. L., Kumar, N., Varshney, R. K., Prasad, M., & Gupta, P. K. (2002).** Study of interspecific SSR polymorphism among 14 species from *Triticum-Aegilops* group. *Wheat Information Service*, 95, 23-28.
- Slama, A. (2002).** Étude comparative de la contribution des différentes parties du plant du blé dur dans la contribution du rendement en grains en irrigué et en conditions de déficit hydrique. Thèse de doctorat en biologie, Univ. Tunis. Tunisie.
- Slama, A., Ben Salem, M., Ben Naceur, M., & Zid, E. (2005).** Les céréales en Tunisie: production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Sécheresse*, 16(3), 225-229.
- Snyder, J. R., Mallory-Smith, C. A., Balter, S., Hansen, J. L., & Zemetra, R. S. (2000).** Seed production on *Triticum aestivum* by *Aegilops cylindrica* hybrids in the field. *Weed Science*, 48(5), 588-593.
- Somers, D. J., Isaac, P., & Edwards, K. (2004).** A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and applied genetics*, 109(6), 1105-1114. In: Anonyme a, (2020). <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>
- Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Gill, B.S., Ward, R. & Cregan, P. B. (2005).** Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and applied genetics*, 110(3), 550-560.
- Srinivas, G., Satish, K., Madhusudhana, R., Reddy, R. N., Mohan, S. M., & Seetharama, N. (2009).** Identification of quantitative trait loci for agronomically important traits and their association with genic-microsatellite markers in sorghum. *Theoretical and applied genetics*, 118(8), 1439-1454.
- Stachel, M., Lelley, T., Grausgruber, H., & Vollmann, J. (2000).** Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2), 242-248.
- Stone, A. E., & Peeper, T. F. 2004.** Characterizing jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*)× winter wheat hybrids in Oklahoma. *Weed science*, 52(5), 742-745.

## Références Bibliographiques

---

- Suenaga, K., & Nakajima, K. (1989).** Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). *Plant Cell Reports*, 8(5), 263-266.
- Tahri, E.H., Belabed, A. & SADKI, K. (1998).** Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat*, 1997(21), 81-87.
- Talebi, R. (2011).** Evaluation of chlorophyll content and canopy temperature as indicators for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 1457-1462.
- Tanaka, M. (1954).** Spring and winter habit of *Aegilops* and *Triticum*. *Wheat Inf Ser* 1: 18-19. In: **Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2006).** Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Science*, 46(2), 512-527.
- Tikhenko, N., Rutten, T., Voylokov, A., & Houben, A. (2008).** Analysis of hybrid lethality in F1 wheat-rye hybrid embryos. *Euphytica*, 159(3), 367-375.
- Tiwari, V. K., Rawat, N., Neelam, K., Kumar, S., Randhawa, G. S., & Dhaliwal, H. S. (2010).** Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschy* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(2), 259-269.
- Trigui, N., Sandmeier, M., Salanoubat, M. & Pernes, J. (1986).** Utilisation des données enzymatiques et morphologiques pour l'étude des populations et de la domestication des plantes: I. Séparation et identification génétique d'isozymes chez le mil (*Pennisetum typhoides* Bur. Stapf & Hubb.). *Agronomie*, 6(9), 779-788.
- Turner, P. C. , McLennan, A.G., Bates, A.D. & WHITE, M.R.H. (2000).** L'essentiel en biologie moléculaire. Pp 401. Version française, BERTI ed Port royal livres, Paris. France
- Vaissière, B. (2002).** Abeilles et pollinisation. *COURRIER DE LA NATURE-PARIS-*, 24-27.

## Références Bibliographiques

---

- Van Slageren M.W. (1994).** Wild Wheat: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. Et Spach.) Eig. (*Poaceae*) . Wageningen Agricultural Universitu, International center for Agriculttiral Research in the Dry Areas:Veenman Drukkers, Wageningen, Pp.512.
- Varshney, R. K., Nayak, S. N., May, G. D., & Jackson, S. A. (2009).** Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in biotechnology*, 27(9), 522-530.
- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J., & Vieira, L. G. E. (2007).** Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of plant physiology*, 164(10), 1367-1376.
- Voorrips, R. E., & Maliepaard, C. A. (2012).** The simulation of meiosis in diploid and tetraploid organisms using various genetic models. *BMC bioinformatics*, 13(1), 248.
- Waines, J. G., & Hegde, S. G. 2003.** Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. *Crop Science*, 43(2), 451-463.
- Wang, S., Yin, L., Tanaka, H., Tanaka, K., & Tsujimoto, H. (2010).** Identification of wheat alien chromosome addition lines for breeding wheat with high phosphorus efficiency. *Breeding science*, 60(4), 371-379.
- Wang, S., Yu, Z., Cao, M., Shen, X., Li, N., Li, X., Ma, W., Weibgerber, H., Zeller, F., Hsam, S. & Yan, Y. (2013).** Molecular mechanisms of HMW glutenin subunits from 1Sl genome of *Aegilops longissima* positively affecting wheat breadmaking quality. *PLoS One*, 8(4), e58947.
- Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G., and Tanksley, S.D. (1994).** Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1–6
- Yencho, G. C., Cohen, M. B., & Byrne, P. F. (2000).** Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 393-422.

## Références Bibliographiques

---

- Ykhlef, N., KELLOU, K., & DJEKOUN, A. (2007).** Régénération d'embryons issus de croisement interspécifique blé dur (*triticum durum* desf.)× *aegilops geniculata* roth.: effet des régulateurs de croissance. *Sciences & Technologie C*, (25), 44-52.
- Ykhlef, N. Djekoun, A., Bensari, M., Vignes D. (2000)** .L'efficacité de l'utilisation de l'eau marqueur physiologique de la résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf). *Sciences & technologie*, 10 : 87 - 92.
- Yu, Z., Wang, J., Liu, S., Rentch, J. S., Sun, P., & Lu, C. (2017).** Global gross primary productivity and water use efficiency changes under drought stress. *Environmental Research Letters*, 12(1), 014016.
- Zaharieva M., David J., This D. & Monneveux, P. (1999).** Analyse de la diversité génétique d'*Aegilops geniculata* Roth en Bulgarie. (In French, with English abstract). *Cahiers Agric* 8:181–188.
- Zaharieva M., Gaulin E., Havaux M., Acevedo E. & Monneveux, P. (2001).**Drought and heat responses in the wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth: potential interest for wheat improvement. *Crop Science* 41:1321–1329.
- Zaharieva, M. (1996).** Bulgarian *Aegilops* germplasm collection. Diversity and potential use in wheat improvement. In *Proc 5 th Int Wheat Conference, 10-14 June 1996, Ankara, Turkey* (pp. 450-451).
- Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2006).** Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Science*, 46(2), 512-527.
- Zerrad, W., Maataoui, B. S., Hilali, S., El Antri, S. & Hmyene, A. (2008).** Étude comparative des mécanismes biochimiques de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Lebanese Science Journal*, 9(2), 27-36.
- Zhang, J., Nguyen, H. T., & Blum, A. (1999).** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of experimental Botany*, 50(332), 291-302.
- Zielinski, M. L., & Scheid, O. M. (2012).** Meiosis in polyploid plants. In *Polyploidy and genome evolution* (pp. 33-55). Springer, Berlin, Heidelberg.

# **ANNEXES**

## Annexe I : Descriptives statistiques de l'étude de la tolérance à la sécheresse.

**Ag** (*Ae.gen*); **At** (*Ae.tri*); **Vt** (Hoggar ex. Vitron); **OZ**(Oued Zenati); **Wa** (Waha)  
**TC** (Taux de chlorophylle); **TSS** (teneur en sucres solubles) ; **AC** (Activité Catalase) ;  
**AP** (Activité peroxydase) ; **RS** (Résistance stomatique); **TRE** (Teneur relative en eau);  
**T** (Témoins) ; **N1** (Niveau 1 de stress) ; **N2** (Niveau 2 de stress).

### Results for génotypes = Ag

Variable	traitements	Total Count	Mean	StDev	Variance	Minimum	Maximum
TC	n1	3	35,667	1,680	2,823	34,200	37,500
	n2	3	38,70	4,97	24,67	35,30	44,40
	Tem	3	39,13	7,25	52,50	34,90	47,50
TSS	n1	3	0,7930	0,0493	0,0024	0,7560	0,8490
	n2	3	0,7903	0,0684	0,0047	0,7120	0,8380
	Tem	3	0,76500	0,00265	0,00001	0,76200	0,76700
AC	n1	3	0,1343	0,0352	0,0012	0,1140	0,1750
	n2	3	0,1473	0,0266	0,0007	0,1220	0,1750
	Tem	3	0,1193	0,0506	0,0026	0,0760	0,1750
AP	n1	3	2,820	0,423	0,179	2,391	3,237
	n2	3	2,978	0,784	0,615	2,211	3,778
	Tem	3	1,617	0,318	0,101	1,365	1,974
RS	n1	3	131,0	27,4	751,0	100,0	152,0
	n2	3	175,0	23,8	567,0	157,0	202,0
	Tem	3	23,93	6,02	36,21	17,00	27,80
TRE	n1	3	88,84	4,75	22,55	83,58	92,81
	n2	3	79,67	10,11	102,22	68,00	85,65
	Tem	3	87,90	5,37	28,79	82,83	93,52

### Results for génotypes = At

Variable	traitements	Total Count	Mean	StDev	Variance	Minimum	Maximum
TC	n1	3	41,60	2,65	7,03	38,90	44,20
	n2	3	44,10	2,27	5,16	42,50	46,70
	Tem	3	47,67	7,98	63,74	38,50	53,10
TSS	n1	3	0,8640	0,0489	0,0024	0,8190	0,9160
	n2	3	0,7560	0,0505	0,0025	0,6980	0,7900
	Tem	3	0,81333	0,00462	0,00002	0,80800	0,81600
AC	n1	3	0,08600	0,00866	0,00007	0,07600	0,09100
	n2	3	0,1320	0,0266	0,0007	0,1070	0,1600
	Tem	3	0,1347	0,0309	0,0010	0,1070	0,1680
AP	n1	3	3,51	2,27	5,17	1,07	5,57
	n2	3	4,81	2,91	8,47	1,85	7,67
	Tem	3	3,436	1,153	1,329	2,650	4,759
RS	n1	3	81,33	16,56	274,33	64,00	97,00
	n2	3	126,0	21,7	471,0	101,0	140,0
	Tem	3	27,97	3,96	15,70	23,40	30,50
TRE	n1	3	81,81	3,79	14,33	78,80	86,06
	n2	3	60,9	19,1	365,1	42,2	80,4
	Tem	3	90,27	1,90	3,59	88,22	91,96

## Results for génotypes = Oz

Variable	traitements	Total					
		Count	Mean	StDev	Variance	Minimum	Maximum
TC	n1	3	40,867	1,650	2,723	39,200	42,500
	n2	3	44,27	5,40	29,16	38,90	49,70
	Tem	3	36,07	4,14	17,10	32,50	40,60
TSS	n1	3	0,8393	0,0664	0,0044	0,7630	0,8840
	n2	3	0,8827	0,0210	0,0004	0,8590	0,8990
	Tem	3	0,8633	0,0515	0,0027	0,8080	0,9100
AC	n1	3	0,0990	0,0609	0,0037	0,0300	0,1450
	n2	3	0,1447	0,0200	0,0004	0,1220	0,1600
	Tem	3	0,09633	0,00462	0,00002	0,09100	0,09900
AP	n1	3	1,399	0,507	0,257	1,015	1,974
	n2	3	0,699	0,233	0,054	0,485	0,947
	Tem	3	0,959	0,521	0,271	0,598	1,556
RS	n1	3	43,67	11,59	134,33	36,00	57,00
	n2	3	122,0	32,4	1047,0	99,0	159,0
	Tem	3	8,167	1,069	1,143	7,500	9,400
TRE	n1	3	94,11	2,37	5,63	91,46	96,04
	n2	3	87,15	4,96	24,64	81,42	90,23
	Tem	3	98,09	4,48	20,08	93,65	102,61

## Results for génotypes = Vt

Variable	traitements	Total					
		Count	Mean	StDev	Variance	Minimum	Maximum
TC	n1	3	45,90	3,74	13,96	42,50	49,90
	n2	3	45,13	3,35	11,22	43,10	49,00
	Tem	3	41,267	0,551	0,303	40,900	41,900
TSS	n1	3	0,7993	0,0703	0,0049	0,7210	0,8570
	n2	3	0,7990	0,0799	0,0064	0,7310	0,8870
	Tem	3	0,9800	0,0400	0,0016	0,9340	1,0070
AC	n1	3	0,0940	0,0246	0,0006	0,0760	0,1220
	n2	3	0,1803	0,0761	0,0058	0,1070	0,2590
	Tem	3	0,1570	0,0308	0,0009	0,1290	0,1900
AP	n1	3	1,132	0,412	0,170	0,767	1,579
	n2	3	2,098	1,032	1,065	1,331	3,271
	Tem	3	2,447	1,328	1,763	0,914	3,214
RS	n1	3	36,7	17,7	313,2	21,2	56,0
	n2	3	81,0	39,7	1575,0	51,0	126,0
	Tem	3	1,887	0,219	0,048	1,640	2,060
TRE	n1	3	87,38	6,43	41,33	81,89	94,45
	n2	3	84,05	3,98	15,83	79,67	87,44
	Tem	3	96,83	5,43	29,53	91,01	101,77

## Results for géotypes = Wa

Variable	traitements	Total Count	Mean	StDev	Variance	Minimum	Maximum
TC	n1	3	46,47	2,21	4,89	44,40	48,80
	n2	3	43,767	0,896	0,803	43,200	44,800
	Tem	3	45,40	2,04	4,17	43,10	47,00
TSS	n1	3	0,7777	0,0517	0,0027	0,7420	0,8370
	n2	3	0,8590	0,0834	0,0069	0,7630	0,9130
	Tem	3	0,9233	0,1387	0,0193	0,7990	1,0730
AC	n1	3	0,1297	0,0273	0,0007	0,1070	0,1600
	n2	3	0,1017	0,0488	0,0024	0,0460	0,1370
	Tem	3	0,1297	0,0266	0,0007	0,0990	0,1450
AP	n1	3	1,248	0,648	0,420	0,857	1,996
	n2	3	1,147	0,468	0,219	0,643	1,568
	Tem	3	1,444	1,037	1,076	0,778	2,639
RS	n1	3	4,27	2,47	6,08	2,60	7,10
	n2	3	121,5	29,5	870,3	92,0	151,0
	Tem	3	2,237	1,108	1,228	1,430	3,500
TRE	n1	3	93,02	7,20	51,88	85,11	99,20
	n2	3	85,54	4,62	21,33	80,28	88,92
	Tem	3	92,73	4,44	19,74	90,16	97,86

## Correlations: TC; TSS; AC; AP; RS; TRE

	TC	TSS	AC	AP	RS
TSS	0,030 0,842				
AC	0,176 0,248	0,030 0,845			
AP	0,068 0,656	-0,121 0,427	0,152 0,318		
RS	-0,154 0,311	-0,247 0,102	0,088 0,564	0,301 0,044*	
TRE	-0,082 0,594	0,319 0,033*	-0,137 0,371	-0,295 0,049*	-0,487 0,001***

Cell Contents: Pearson correlation  
P-Value

-0,082	0,319	-0,137	-0,295	-0,487
0,594	0,033*	0,371	0,049*	0,001***

## General Linear Model: TC; TSS; ... versus géotypes; traitements

Factor	Type	Levels	Values
géotypes	fixed	5	Ag; At; Oz; Vt; Wa
traitements	fixed	3	n1; n2; Tem

### Analysis of Variance for TC, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
géotypes	4	358,85	358,85	89,71	5,60	0,002**
traitements	2	14,44	14,44	7,22	0,45	0,641 ns
géotypes*traitements	8	212,68	212,68	26,59	1,66	0,150 ns
Error	30	480,55	480,55	16,02		
Total	44	1066,52				

S = 4,00228    R-Sq = 54,94%    R-Sq(adj) = 33,92%

### Analysis of Variance for TSS, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
géotypes	4	0,044459	0,044459	0,011115	2,72	0,048*
traitements	2	0,028111	0,028111	0,014055	3,43	0,045*
géotypes*traitements	8	0,091042	0,091042	0,011380	2,78	0,020*
Error	30	0,122777	0,122777	0,004093		
Total	44	0,286390				

S = 0,0639733    R-Sq = 57,13%    R-Sq(adj) = 37,12%

### Analysis of Variance for AC, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
géotypes	4	0,005745	0,005745	0,001436	1,00	0,423 ns
traitements	2	0,008033	0,008033	0,004017	2,79	0,077 ns
géotypes*traitements	8	0,015600	0,015600	0,001950	1,36	0,255 ns
Error	30	0,043115	0,043115	0,001437		
Total	44	0,072493				

S = 0,0379098    R-Sq = 40,53%    R-Sq(adj) = 12,77%

### Analysis of Variance for AP, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
géotypes	4	47,956	47,956	11,989	8,50	0,000***
traitements	2	1,202	1,202	0,601	0,43	0,657 ns
géotypes*traitements	8	9,370	9,370	1,171	0,83	0,583 ns
Error	30	42,326	42,326	1,411		
Total	44	100,853				

S = 1,18780    R-Sq = 58,03%    R-Sq(adj) = 38,45%

**Analysis of Variance for RS, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
génotypes	4	30422,5	30422,5	7605,6	18,81	0,000***
traitements	2	95436,3	95436,3	47718,2	118,05	0,000***
génotypes*traitements	8	12996,4	12996,4	1624,5	4,02	0,002**
Error	30	12127,1	12127,1	404,2		
Total	44	150982,3				

S = 20,1056 R-Sq = 91,97% R-Sq(adj) = 88,22%

**Analysis of Variance for TRE, using Adjusted SS for Tests**

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
génotypes	4	1298,74	1298,74	324,69	6,35	0,001***
traitements	2	1481,63	1481,63	740,82	14,50	0,000***
génotypes*traitements	8	597,43	597,43	74,68	1,46	0,213ns
Error	30	1533,02	1533,02	51,10		
Total	44	4910,82				

S = 7,14847 R-Sq = 68,78% R-Sq(adj) = 54,21%

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for TC**

génotypes	N	Mean	Grouping
Wa	9	45,2	A
At	9	44,5	A
Vt	9	44,1	A
Oz	9	40,4	A B
Ag	9	37,8	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for TC**

traitements	N	Mean	Grouping
n2	15	43,2	A
n1	15	42,1	A
Tem	15	41,9	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for TSS**

génotypes	N	Mean	Grouping
Oz	9	0,9	A
Vt	9	0,9	A
Wa	9	0,9	A
At	9	0,8	A
Ag	9	0,8	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for TSS**

traitements	N	Mean	Grouping
Tem	15	0,9	A
n2	15	0,8	A
n1	15	0,8	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for AC**

génotypes	N	Mean	Grouping
Vt	9	0,1	A
Ag	9	0,1	A
Wa	9	0,1	A
At	9	0,1	A
Oz	9	0,1	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for AC**

traitements	N	Mean	Grouping
n2	15	0,1	A
Tem	15	0,1	A
n1	15	0,1	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for AP**

génotypes	N	Mean	Grouping
At	9	3,9	A
Ag	9	2,5	A B
Vt	9	1,9	B
Wa	9	1,3	B
Oz	9	1,0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for AP**

traitements	N	Mean	Grouping
n2	15	2,3	A
n1	15	2,0	A
Tem	15	2,0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for RS**

génotypes	N	Mean	Grouping
Ag	9	110,0	A
At	9	78,4	B
Oz	9	57,9	B C
Wa	9	42,7	C
Vt	9	39,9	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for RS**

traitements	N	Mean	Grouping
n2	15	125,1	A
n1	15	59,4	B
Tem	15	12,8	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for TRE

génotypes	N	Mean	Grouping
Oz	9	93,1	A
Wa	9	90,4	A
Vt	9	89,4	A
Ag	9	85,5	A B
At	9	77,7	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence for TRE

traitements	N	Mean	Grouping
Tem	15	93,2	A
n1	15	89,0	A
n2	15	79,5	B

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: TC; TSS; ... versus génotypes; traitements

MANOVA for génotypes

s = 4    m = 0,5    n = 11,5

Criterion	Test		DF		P
	Statistic	Approx F	Num	Denom	
Wilks'	0,07554	4,041	24	88	0,000***
Lawley-Hotelling	5,03586	4,931	24	94	0,000***
Pillai's	1,58872	3,075	24	112	0,000***
Roy's	3,53339				

MANOVA for traitements

s = 2    m = 1,5    n = 11,5

Criterion	Test		DF		P
	Statistic	F	Num	Denom	
Wilks'	0,08226	10,361	12	50	0,000***
Lawley-Hotelling	8,85252	17,705	12	48	0,000***
Pillai's	1,10723	5,374	12	52	0,000***
Roy's	8,58418				

MANOVA for génotypes\*traitements

s = 6    m = 0,5    n = 11,5

Criterion	Test		DF		P
	Statistic	Approx F	Num	Denom	
Wilks'	0,10653	1,526	48	127	0,032*
Lawley-Hotelling	3,29823	1,603	48	140	0,018*
Pillai's	1,64592	1,418	48	180	0,054 ns
Roy's	1,82797				

## Cluster Analysis of Observations: Mean1; Mean2; Mean3; Mean4; Mean5; Mean6

Squared Pearson Distance, Single Linkage  
Amalgamation Steps

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined	New cluster	Number of obs. in new cluster
1	4	78,0898	3,9265	4	5	4
2	3	69,6172	5,4449	3	4	3
3	2	36,3835	11,4007	2	3	2
4	1	35,1149	11,6281	1	2	1

Final Partition  
Number of clusters: 1

	Number of observations	Within cluster sum of squares	Average distance from centroid	Maximum distance from centroid
Cluster1	5	3536,28	23,6426	44,4373

## Cluster Analysis of Observations: Mean1; Mean2; Mean3; Mean4; Mean5; Mean6

Squared Pearson Distance, Single Linkage  
Amalgamation Steps

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined	New cluster	Number of obs. in new cluster
1	4	78,0898	3,9265	4	5	4
2	3	69,6172	5,4449	3	4	3
3	2	36,3835	11,4007	2	3	2
4	1	35,1149	11,6281	1	2	1

Final Partition  
Number of clusters: 4

	Number of observations	Within cluster sum of squares	Average distance from centroid	Maximum distance from centroid
Cluster1	1	0,00000	0,00000	0,00000
Cluster2	1	0,00000	0,00000	0,00000
Cluster3	1	0,00000	0,00000	0,00000
Cluster4	2	5,22215	1,61588	1,61588

### Cluster Centroids

Variable	Cluster1	Cluster2	Cluster3	Cluster4	Grand centroid
Mean1	37,833	44,4556	40,4000	44,6556	42,4000
Mean2	0,783	0,8111	0,8618	0,8564	0,8337
Mean3	0,134	0,1176	0,1133	0,1321	0,1257
Mean4	2,471	3,9183	1,0188	1,5859	2,1160
Mean5	109,978	78,4333	57,9444	41,2706	65,7793
Mean6	85,472	77,6611	82,2256	89,9250	85,0418

### Distances Between Cluster Centroids

	Cluster1	Cluster2	Cluster3	Cluster4
Cluster1	0,0000	33,1966	52,2179	69,1942
Cluster2	33,1966	0,0000	21,5751	39,2041
Cluster3	52,2179	21,5751	0,0000	18,8609
Cluster4	69,1942	39,2041	18,8609	0,0000

**Annexe II : Résultats détaillés des paramètres de croisements par géniteurs et par année**

<b>Année</b>	<b>Croisement</b>	<b>NE</b>	<b>NEP</b>	<b>NFP</b>	<b>NN</b>	<b>NHYBRIDE</b>
<b>2010</b>	<i>Ae.gen/W</i>	2	6	12	9	0
	<i>Ae.gen/W</i>	3	8	18	18	0
	<i>Ae.gen/W</i>	2	6	13	12	0
	<i>Ae.gen/W</i>	2	4	8	6	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	3	6	5	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	4	10	7	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	3	6	16	13	1
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	4	12	9	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	2	8	15	11	1
	<i>Ae.tri/OZ</i>	4	13	26	20	0
	<i>Ae.gen/H</i>	2	6	12	10	0
	<i>Ae.tri/H</i>	5	16	32	22	0
	<i>Ae.tri/H</i>	3	10	20	11	3
	<b>2011</b>	<i>Ae.gen/OZ</i>	3	12	18	10
<i>Ae.gen/OZ</i>		4	11	26	25	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		1	4	8	7	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		1	5	10	8	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		1	4	8	7	1
<i>Ae.tri/OZ</i>		1	3	6	5	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		2	7	14	12	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		2	5	10	8	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		3	13	26	14	5
<b>2012</b>	<i>Ae.gen/OZ</i>	4	10	20	12	7
	<i>Ae.gen/OZ</i>	5	13	26	13	7
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	5	11	3	4
	<i>Ae.gen/OZ</i>	4	8	16	7	1
	<i>Ae.gen/OZ</i>	4	10	20	18	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	5	12	24	10	3
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	5	10	3	5
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	5	10	7	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	4	8	16	2	7
	<i>Ae.gen/OZ</i>	3	7	14	4	6
	<i>Ae.tri/OZ</i>	7	26	52	39	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	2	8	15	12	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	3	12	24	20	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	4	14	28	27	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	4	14	28	26	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	3	7	14	12	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	3	9	18	15	1

Annexe II : Suite,

Année	Croisement	NE	NEP	NFP	NN	NHYBRIDE
2013	<i>Ae.tri/OZ</i>	3	8	16	6	6
	<i>Ae.tri/OZ</i>	2	8	16	14	0
	<i>Ae.tri/OZ</i>	1	3	6	2	4
	<i>Ae.gen/OZ</i>	3	10	20	11	3
	<i>Ae.gen/OZ</i>	1	3	6	3	0
	<i>Ae.gen/H</i>	5	15	30	26	0
	<i>Ae.gen/H</i>	2	4	8	7	0
	<i>Ae.gen/H</i>	3	7	14	14	0
	<i>Ae.gen/H</i>	1	3	6	6	0
	<i>Ae.gen/H</i>	5	11	22	18	0
	<i>Ae.gen/H</i>	5	11	22	16	0
	<i>Ae.gen/H</i>	2	4	8	8	0
	<i>Ae.tri/H</i>	5	18	36	34	0
	<i>Ae.tri/H</i>	4	11	22	20	0
	<i>Ae.tri/H</i>	4	18	36	20	0
	2015 Constantine	<i>Ae.tri/H</i>	3	12	24	11
<i>Ae.tri/H</i>		3	11	22	21	0
<i>Ae.tri/H</i>		3	8	16	17	0
<i>Ae.tri/H</i>		5	19	38	37	0
<i>Ae.tri/OZ</i>		4	12	24	23	0
<i>Ae.gen/H</i>		4	11	22	19	0
<i>Ae.gen/H</i>		3	8	16	12	0
<i>Ae.gen/OZ</i>		4	12	22	17	1
<i>Ae.gen/OZ</i>		5	14	24	12	2
<i>Ae.gen/OZ</i>		6	17	33	22	0
<i>Ae.gen/OZ</i>		5	13	26	15	0
<i>Ae.gen/OZ</i>		4	12	24	17	0
<i>Ae.gen/OZ</i>		6	19	36	18	0
<i>Ae.gen/OZ</i>		7	20	40	24	0
<i>Ae.gen/OZ</i>		1	3	6	3	0
Skikda		<i>Ae.gen/OZ</i>	3	9	18	8
	<i>Ae.gen/OZ</i>	4	10	22	15	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	1	3	6	6	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	9	26	43	32	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	9	27	54	37	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	1	4	7	4	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	9	26	54	46	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	8	26	57	32	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	2	7	14	9	0
	<i>Ae.gen/OZ</i>	53	140	265	235	5
<i>Ae.gen/H</i>	6	17	34	21	4	

<i>Ae.tri/OZ</i>	13	54	100	73	0
<i>Ae.tri/H</i>	12	48	90	76	2

**Annexe III : Matrice de présence-absence des allèles répertoriés par les marqueurs SSRs (*Xwmc 25*, *Xwmc44*, *Xbarc174*, *Xwmc177*, *Xwms 135* et *Xwms 257*).**

	WMC25-135	WMC25-154	WMC25-180	WMC25-200	WMC25-210	WMC25-230	XBARC174-158	XBARC174-172	XBARC174-184
12Aegen	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13OZ	1	0	0	1	0	0	1	1	0
1AegenOZ	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2AegenHog	0	0	0	1	0	0	1	0	1
3AegenOZ	0	0	0	1	0	0	1	0	1
5AetriOZ	1	0	0	1	0	0	1	0	1
6AegenOZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8AegenCem	0	0	0	0	0	1	0	0	1
11Cemitto	1	0	0	0	0	1	0	1	1
9Hog	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10Aetri	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Aecomosa	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Aeumbel	0	0	0	0	1	0	0	0	0





**Annexe IV : Matrice de présence-absence des allèles répertoriés par les marqueurs SSRs (*Xwmc* 488, *Xwms* 332, *Xwms* 124, *Xwmc* 161 et *Xwms* 493).**

	<b>P124-105</b>	<b>P124-175</b>	<b>P124-190</b>	<b>P124-196</b>	<b>P124-200</b>	<b>P124-205</b>	<b>P488-150</b>	<b>P488-155</b>	<b>P488-161</b>	<b>P488-166</b>
<b>Hog</b>	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
<b>OZ</b>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<b>Cem</b>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<b>AegenOZ2</b>	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
<b>AegenCem</b>	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
<b>Aecom</b>	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
<b>AegenOZ4</b>	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
<b>AegenOZ5</b>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
<b>AetriOZ1</b>	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>Aetri</b>	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<b>AetriOZ2</b>	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
<b>Aeumb</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<b>AetriOZ3</b>	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
<b>Aegen</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0





# **PUBLICATION**

## Hybridization potential *Aegilops* sp. / durum wheat: which interest for the genetic breeding of the drought tolerance?

Fethia ZADRI <sup>1\*</sup>, Kamel KELLOU <sup>1</sup>, Adra MOUELLEF <sup>1</sup>, Hadjer BOUANIKA <sup>2</sup>, Ryma BOULDJED <sup>1</sup>, Chafika ZAHRAOUI <sup>1</sup>, Abdelhamid DJEKOUN <sup>1</sup>, Nadia YKHLEF <sup>1</sup>

Received July 27, 2018; accepted March 20, 2019.  
Delo je prispelo 27. julij 2018, sprejeto 20. marca 2019.

### ABSTRACT

To study their hybridization potential, two species of the genus *Aegilops* (*Aegilops geniculata* Roth; *Aegilops triuncialis* L.) and two durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties ('Oued Zenati' and 'Hoggar') were crossed, where *Aegilops* was the female parent. The four cross combinations were tested during five years in order to release the genitors having the most affinity for obtaining interspecific hybrids. The parents were also characterized for their drought stress tolerance during the crossing period. The results confirm the tolerance of *Aegilops* sp. and adaptation of the durum wheat varieties to climatic conditions governing the Algerian cereal zones. 81 hybrids F1 were obtained. Differences in hybridization affinity between the parents were very remarkable. The combination of parents *Aegilops geniculata*/'Oued Zenati' has produced the highest number of hybrids (54 or a rate of 5.23 %), followed by *Aegilops triuncialis*/'Oued Zenati' (18 hybrids or a rate of 3.88 %). The crossing of the two *Aegilops* species with the Hoggar variety produced a small number of hybrids. Among the advantages of this crossing, the obtaining of hybrids in caryopsis without resorting to the embryos rescue. Hybrid seedlings expressed a maternal cytoplasmic heredity. However, no adult plant could have been regenerated.

**Key words:** *Aegilops*; durum wheat; drought tolerance; interspecific hybridization; genetic breeding

### IZVLEČEK

#### HIBRIDIZACIJSKI POTENCIAL KRIŽANCEV OSTIKE (*Aegilops* sp.) IN TRDE PŠENICE (*Triticum durum* Desf.) PRI VZGOJI KRIŽANCEV ODPORNIH NA SUŠO

Za preučevanje hibridizacijskega potenciala sta bili križani dve vrsti iz rodu ostike (*Aegilops geniculata* Roth; *Aegilops triuncialis* L.) in dve sorti trde pšenice ('Oued 'Zenati' in 'Hoggar'), pri čemer je bila ostika ženska starševska vrsta. Križanci teh štirih kombinacij so bili preiskušani v obdobju petih let z namenom vzgoje potomcev s čim večjim deležem medvrstnih lastnosti. Starševske vrste so bile v obdobju križanja preučevane glede njihove odpornosti na sušni stres. Rezultati so potrdili odpornost vrst ostike na sušo in prilagoditev sort trde pšenice na podnebne razmere v žitnih območjih Alžirije. Vzgojenih je bilo 81 F1 križancev. Razlike v sposobnosti križanja med starševskimi vrstami so bile opazne. Kombinacija staršev *Aegilops geniculata*/'Oued Zenati' je dala največje število križancev (54 ali 5,23 %), tej je sledila kombinacija *Aegilops triuncialis*/'Oued Zenati' (18 križancev ali 3,88 %). Križanje obeh vrst ostike s sorto Hoggar je dalo le malo križancev. Med prednostimi tega križanja je pridobitev križancev v kariopsi, brez uporabe metode reševanja zarodkov. Hibridne sejanke so pokazale znake maternalnega citoplazmatskega dedovanja. Kljub naporom ni uspelo vzgojiti nobene odrasle hibridne rastline.

**Ključne besede:** *Aegilops*; trda pšenica; toleranca na sušo; medvrstno križanje; žlahtnenje

<sup>1</sup> Mentouri Brothers University 1, Nature and Life Science Faculty, Plant Biology and Ecology Department, Genetic, Biochemistry and Plant Biotechnology Laboratory, Team II 'Biotechnology and Plant Amelioration', Constantine, Algeria. Road Ain El Bey, Constantine 25000-Algeria; \*zadri\_fethia@yahoo.fr

<sup>2</sup> 20<sup>th</sup> August 1955 Skikda University, Sciences Faculty, Nature and Life Science Department, Skikda, Algeria. Road El Hadayak, bp 26, Skikda 21000, Algeria

This work is a part of Ph.D thesis, the mentor is Nadia YKHLEF.

## 1 INTRODUCTION

The cultivation of durum wheat in Algeria represents an economic and social importance (Attab & Brinis, 2012; Chahbar & Belkoudja, 2016). The major constraint of this culture in the Mediterranean region is drought; the fluctuations of the rain combined to an intense heat, especially at the end of the cycle, affect sensibly the productivity (Ashraf, 2010; Kosova et al., 2014). The capacity of plants to be acclimatized to the water deficit is associated to their adaptability to the photosynthesis reduction which involves disturbances in multiple biochemical and physiological processes (rate of transpiration, stomatal conductance, effectiveness of water use) and a negative impact on growth (Anjum, 2011; Aissa & Redouane, 2014). The genus *Aegilops*, related to the genus *Triticum*, represents an important source of genes with potential interest for the wheat genetic amelioration (Ashraf, 2010). Indeed, many *Aegilops* species are adapted to various bioclimatic levels, notably arid and semi- arid, and therefore present a tolerance to drought (Molnar et al., 2004; Dulai et al., 2006) and to salinity (Colmer et al., 2006). The interspecific hybrids were significantly exploited in the amelioration of traits presenting simple genetic determinism (Jahier et al., 2006). Addition or substitution lines were developed from interspecific hybrids between wheat and *Aegilops* species (Schneider et al., 2005) allowing the successful introgression of many genes with disease resistance from *Aegilops* species (Schneider et al., 2008; Mujeeb-Kazi et al.,

2013). Like the introduction into wheat of an eyespot resistance gene from *Aegilops ventricosa* (Jahier et al., 2006). Recently, similar lines have been created in order to introduce genes that code for: efficient utilization of phosphor by the plant (Wang et al., 2010); high values of zinc and iron of the seeds (Tiwari et al., 2010; Neelam et al., 2011) and amelioration of pastes and breadmaking quality (Wang et al., 2013). Thus, the interspecific hybrids offer remarkable genetic variability for use in wheat genetic breeding programs (Rolland et al., 2014). Many studies report the natural occurrence of interspecific hybrids between wheat and *Aegilops* species which are considered as the female parent (Morrison, et al., 2002; Cifuentes et al., 2006). Nevertheless, these works intended to study the incorporation of transgenes into *Aegilops* species from cultivated wheat varieties. Unfortunately, works dedicated to the introgression of tolerance traits for abiotic stress from *Aegilops* species remain rare (Mujeeb-Kazi et al., 2013). Thus, the objective of this work is the study of the hybridization potential between species of the genus *Aegilops* and durum wheat varieties and the influence of the crossing direction on obtaining interspecific hybrids *Aegilops*/durum wheat. As this study is a part of wheat breeding program to drought tolerance, by wild species as *Aegilops*, the genitors were also characterized for their tolerance to water stress during the crossing period.

## 2 MATERIALS AND METHODS

The plant material in this study consists of two durum wheat varieties and two tetraploid species of the genus *Aegilops* (Table 1). The seeds were provided by ITGC,

El Khroub (Technical Institute of Great Cultivation, Constantine, Algeria), except for *Aegilops geniculata* which is a local natural collection (Constantine).

**Table 1:** Characteristics of wheat varieties and *Aegilops* species studied (Kellou, 2003 ; Van Slageren, 1994)

Species	Characteristics
<i>Triticum durum</i> Desf.	
Variety Oued Zenati 368 (O.Z)	Selected from the ‘Oued Zenati’ local population, it is a late-variety, adapted to the anterior plains, characterized by a black, long beard spike and high straw.
Variety Hoggar (Hog)	Introduced from Spain, ITGC / Tiaret Selection, 1986. It is adapted to the Highlands and Saharan areas.
Species of the genus <i>Aegilops</i> <i>Aegilops geniculata</i> Roth( <i>Ae.gen</i> ) (syn. <i>Ae.ovata</i> L.)	Annual species, allo-tetraploid ( $2n = 4x = 28$ ), its genomic formula is UUMM. It grows in the Mediterranean region, the Middle East and the southern parts of Russia and Ukraine.
<i>Aegilops triuncialis</i> ( <i>Ae.tri</i> )	Annual species, amphi-tetraploid, ( $2n = 4x = 28$ ). Its genomic formula is UUCC. It grows in the Mediterranean region.

Experiments on drought tolerance and interspecific hybridization were assured in a greenhouse at the Genetics, Biochemistry and Biotechnology Laboratory of Mentouri Brothers University 1, Constantine, Algeria. For both experiments, the seeds were previously disinfected and pre-germinated in Petri dishes. They were transplanted into pots of 5 kg containing a mixture of ground and sand (2: 1 v / v) at the rate of three seedlings per pot and periodically watered to their field capacity.

## 2.1 Drought tolerance

At the heading stage, plants were divided in three lots: Control lot (C): whose plants were periodically irrigated to saturation; First level stressed lot (L1): abstention of watering for one week (7days); Second level stressed lot (L2): abstention of watering for two weeks (15 days). The treatment of L2 was applied a week before that of the L1 in order to synchronize the samples and the measurements. Three replications per variety and per treatment were applied.

### 2.1.1 Physiological parameters

The physiological parameters measured are: the relative water content (RWC [%]) calculated from the formula of Clark & McCaig (1982). Stomatal resistance (SR, [m<sup>2</sup>.s mol<sup>-1</sup>]) is measured using a Porometer (Delta Devices® MK3). The total chlorophyll content (TCC [unit of SPAD “Soil Plant Analysis Development”]) is measured with a chlorophyll SPAD meter (502 of Minolta®).

### 2.1.2 Biochemical parameters

They concerned the determination of soluble sugars content ([SSC μMol 100 mg<sup>-1</sup> of fresh material] saccharose, glucose, fructose, their methyl derivatives and polysaccharides) by the phenol method of Dubois et al., 1956. The antioxidant activity of peroxidase and catalase is measured on enzymatic extracts, obtained after grinding 0.500 mg of fresh leaves in a phosphate buffer (50 mmol l<sup>-1</sup> at pH7), centrifugation and filtration of the supernatant. The activity of peroxidase “POX” (EC 1.11.1.7.) is determined at 470 nm using guaiacol as a substrate. The reactional mixture contained 1 ml of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01 N), 1 ml of guaiacol and

1 ml of enzymatic extract. Data was recorded every 20 sec for 2 min. The catalase activity “CAT” (EC 1.11.1.6.) is determined in a reactional mixture containing 1 ml of hydrogen peroxide (0.01N), 1 ml of 50 mmol l<sup>-1</sup> phosphate buffer and 1 ml of enzymatic extract. The decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was followed at 240nm (Cakmak & Marschner, 1992), the data were recorded every 15sec for 2min. The enzymatic activity is expressed in μkat mg<sup>-1</sup> of proteins contained in the plant extract used) (Micro-Katal [μKat]: disappearance of one μmole of substrate per second). The statistical treatment of the results was carried out by the software Minitab version 2017.

## 2.2 Interspecific hybridization

The interspecific crosses of *Aegilops* sp. / durum wheat varieties were conducted over five years. Three sowing dates were completed for each parent to synchronize their flowering time. Before anthesis, *Aegilops* sp. spikes have been emasculated and wrapped to avoid cross-pollination. They were pollinated with fresh pollen from the durum wheat varieties, without any growth hormones uses after emasculation and pollinisation. The hybrids were harvested in caryopsis.

## 2.3 In-vitro culture

A mature embryo culture of hybrid caryopsis was undertaken to break the dormancy of these seeds. They were disinfected under a laminar flow hood in a 70 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH solution for 30 sec, rinsed with sterile distilled water and then placed in a dilute 12 % sodium hypochloride solution for 15 min. They were rinsed 5 times with sterile distilled water. The disinfected caryopses were placed in Petri dishes with absorbent paper previously sterilized and they were soaked with sterile distilled water. After 24 h, the mature embryos were removed under binocular and under sterile conditions. They were transferred to MS regeneration medium (Muraschige & Skoog, 1962) supplied with Kinetin (0.25 mg l<sup>-1</sup>), AIB (Indole butyric acid) (1 mg l<sup>-1</sup>). The cultures were incubated in a culture chamber in the dark, at a temperature of 25 ± 2 ° C for one week. After the release of coleoptiles, a photoperiod of 16 h day / 8h night was applied. Mature embryos were transplanted to a new medium every four weeks.

# 3 RESULTS

## 3.1 Drought tolerance

Tolerance to water stress was evaluated for two *Aegilops* species and two durum wheat varieties.

### 3.1.1 Physiological parameters

#### 3.1.1.1. Relative water content

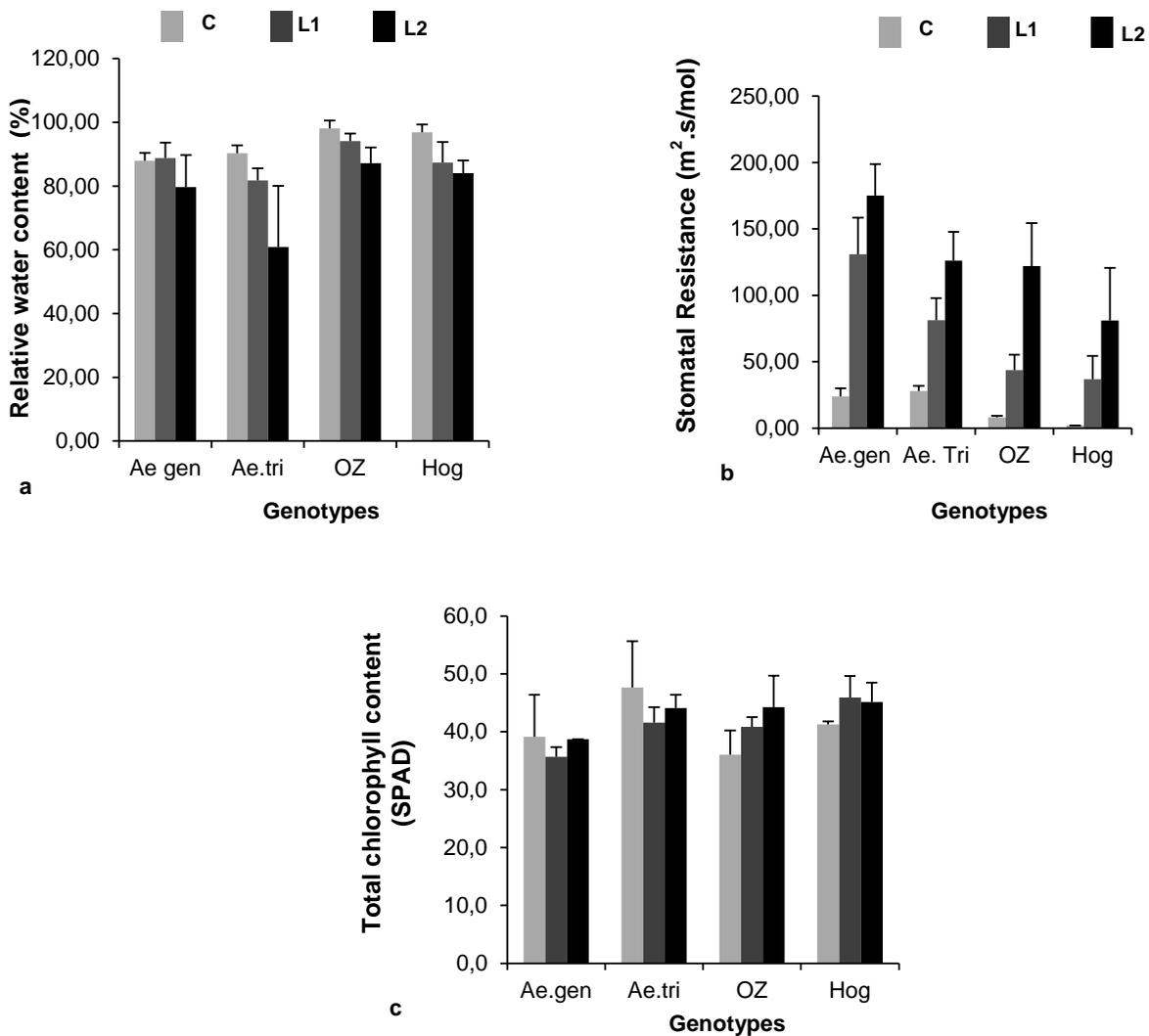
The relative water content decreases with the intensity of the stress (Fig. 1a) comparing to the controls (C)

whose value varies from 87.90 to 98.08 %, the non-watered plants during one week (L1 of stress) have displayed WRC from 81.81 to 94.11 % and the unsprayed for two weeks (L2 of stress) from 60.90 to 87.15 %. The variance analysis showed very highly significant differences between the genotypes as well as for the treatments at the threshold  $\alpha = 0.001$ , the genotype x treatment interaction, proved not significant.

### 3.1.1.2 Stomatal Resistance

For all the studied genotypes, the SR increases markedly with the severity of the stress (Fig. 1b). The

means values range from 1.89 to 27.97  $\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$  for C plants; from 36.73 to 131.00  $\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$  for L1; from 81.00 to 175.00  $\text{m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{mol}^{-1}$  for L2. The *Aegilops* have been remarked by high resistance means and a fast response from L1 (especially for *Aegilops geniculata* "*Ae.gen*") compared to wheat varieties. As a result, the variance analysis of the genotypes as well as the treatments was very highly significant at the threshold  $\alpha = 0.001$ , the genotype x treatment interaction is significant at the threshold  $\alpha = 0.05$ .



**Figure 1:** Water stress effect on physiological parameters: a. Relative water content; b. Stomatal resistance; c. Total chlorophyll content.

### 3.1.1.3 Total chlorophyll content

*Ae.gen* and *Ae.Tri*, present values of 39.1 and 47.7 SPAD for C that decrease at L1 to 35.7 and 41.6 SPAD but increase at L2 to 38.7 and 44.1 SPAD, respectively (Fig. 1c). O.Z has an increase in TCC with stress levels,

compared to C whose value is 36.1 SPAD, TCC reaches 40.9 SPAD at L1, then 44.3 at L2. For Hog, the value of C is 41.3SPAD, the TCC increases to 45.9 SPAD at L1 and then decreases slightly at 45.1 SPAD at L2. As a result, the analysis of variance revealed a significant

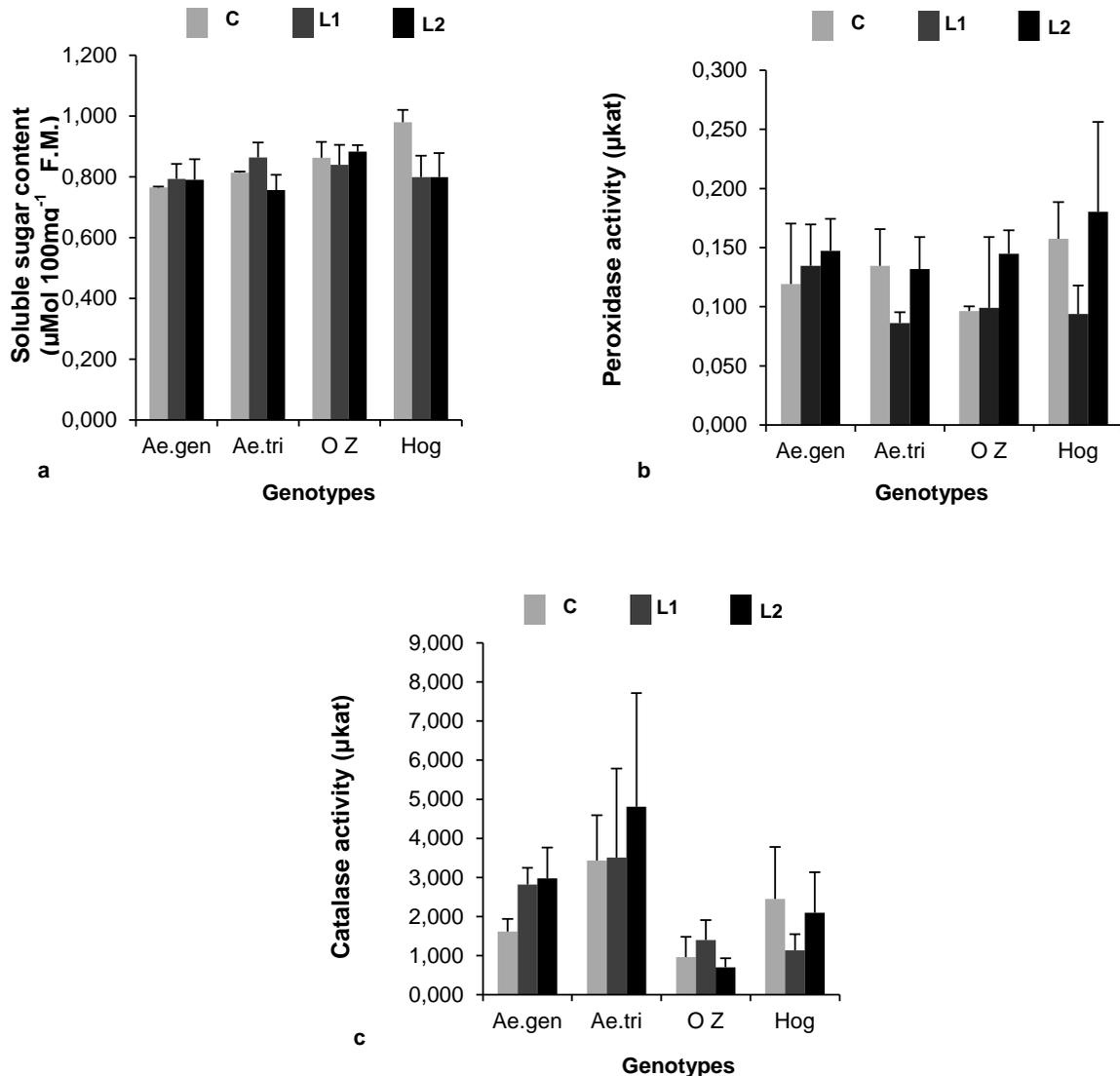
difference between the genotypes studied at  $\alpha = 0.05$  threshold, whereas the treatments as well as the genotype x treatment interaction proved to be insignificant.

### 3.1.2 Biochemical parameters

#### 3.1.2.1 Soluble sugar content

The recorded SSC revealed different stress behaviours (Fig. 2a). For *Ae.gen* and *Ae.tri*, respectively, the SSC is 0.765 and 0.813  $\mu\text{mol}$  for C, it reaches 0.793 and

0.864  $\mu\text{mol}$  at L1, but decreases at 0.790 and 0.756  $\mu\text{mol}$  at L2. For O.Z, a decrease in SSC is observed at L1 (0.839  $\mu\text{mol}$ ) compared with C (0.863  $\mu\text{mol}$ ), then an increase at L2 (0.883  $\mu\text{mol}$ ). Hog, has a SSC of 0.980  $\mu\text{mol}$  for C which decreases for L1 to 0.799  $\mu\text{mol}$  and remains constant at this value at L2. The variance analysis revealed highly significant differences between the genotypes as well as the genotype x treatment interaction at  $\alpha = 0.01$  threshold, whereas the treatments proved to be insignificant.



**Figure 2:** Water stress effect on biochemical parameters: a. Soluble sugar content; b. Peroxidase activity; c. Catalase activity

#### 3.1.2.2 Peroxidase activity

*Aegilops* sp. show an increase in this activity in stressed plants compared to control plants which have a value of 1.617 and 3.436  $\mu\text{Kat mg}^{-1}$ , at L1 the value reaches

2.820 and 3.511  $\mu\text{Kat mg}^{-1}$ , at L2 it is 2.977 and 4.808  $\mu\text{Kat mg}^{-1}$  respectively, for *Ae.gen* and *Ae.tri*, this latter presents the most important values of POX activity (Fig. 2b). The O.Z control present a POX

activity of  $0.959 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ , which increases for L1 to  $1.398 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  but decreases at  $0.699 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  for L2. Whereas in the Hog variety, the POX activity decreases for L1 at  $1.132 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  compared to C whose activity is  $2.447 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  and then increases at L2 to  $2.098 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ . The analysis of variance was very highly significant between the different genotypes ( $\alpha = 0.001$ ), whereas the treatments as well as the genotype x treatment interaction proved to be insignificant.

### 3.1.2.3 Catalase activity

The CAT activity (Fig. 2c) shows, for *Ae.tri* and Hog variety, respectively, a decrease at L1 ( $0.086$  and  $0.094 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ ) in comparison with the C plants ( $0.135$  and  $0.157 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ ), then an increase at L2 ( $0.132$  and  $0.180 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ ). For O.Z, the activity increases slightly at L1 ( $0.099 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ ) compared to

C ( $0.096 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ ), it increases considerably at L2 ( $0,145 \mu\text{Kat mg}^{-1}$ ). For *Ae.gen*, the increase in enzymatic activity with stress levels is more remarkable than in O.Z, the CAT is  $0.119 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  for C and it reaches  $0.135 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  at L1 then  $0.147 \mu\text{Kat mg}^{-1}$  at L2. For this parameter, the treatments appeared significant at  $\alpha = 0.05$  threshold, while the genotypes as well as the genotype x treatment interaction proved to be insignificant. The comparison between the two enzymes activities reports higher values of POX than those of CAT (Fig. 2b and c). The correlations between physiological and biochemical parameters are shown in Table 2, where we recorded two significant positive correlations ( $\alpha = 0.05$ ) between SSC and SR, and between WRC and SSC. A highly significant negative correlation ( $\alpha = 0.01$ ) between WRC and SR is also observed.

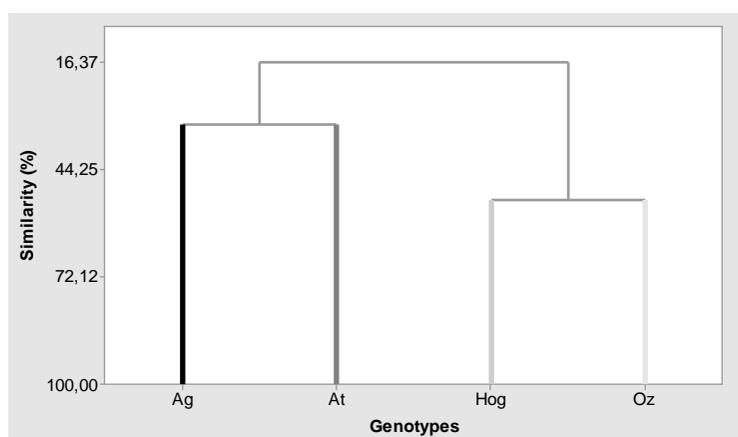
**Table 2:** Linear correlations matrix of physiological and biochemical parameters

	TCC	SSC	CAT	POX	SR
SSC	0.027				
CAT	0.242	0.092			
POX	0.159	-0.082	0.158		
SR	-0.070	-0.352*	0.166	0.317	
RWC	-0.169	0.350*	-0.145	-0.280	-0.481**

$p \leq \alpha = 0.05$ : (\*)significant differences.  $p \leq \alpha = 0.01$ : (\*\*)highly significant differences

The grouping of the four genotypes, with a dendrogram using the single linkage and the Squared Pearson distance and for a minimum similarity level of 50 % (Fig. 3), enabled to distinguish four homogeneous

groups: the first is represented by *Ae.gen*, the second by *Ae.tri*, the third consists of O.Z and the fourth group of Hog.



**Figure 3:** Grouping dendrogram of studied genotypes. **Ag:** *Ae. geniculata*; **At:** *Ae. triuncialis*; **Hog:** Hoggar; **OZ:** Oued Zenati

## 3.2 Interspecific hybrids obtaining

The interspecific hybridization between two species of the genus *Aegilops* as the female parent, with the two durum wheat varieties, allowed us to obtain 81 hybrids.

Table 3, summarizing the five-year results for the four possible combinations of crossing, represents the crossability between the genitors, expressed as a percentage of the number of hybrids obtained reported to the number of pollinated flowers.

**Table 3:** Five-year hybridizations results according to genitors combinations

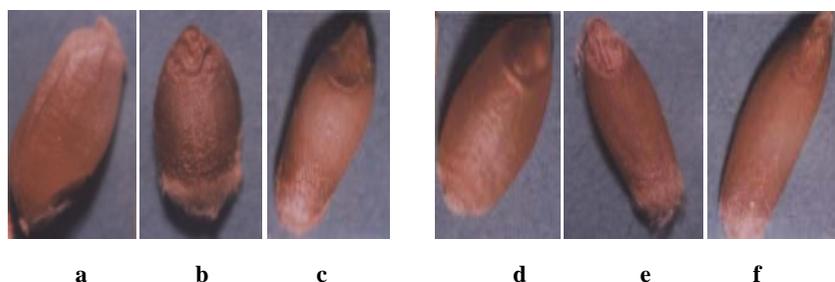
Crosses	NS	NSK	NPF	NFS	NHS	Cross-ability%
<i>Ae.gen</i> /OZ	192	524	1032	714	54	<b>5.23</b>
<i>Ae.gen</i> / H	38	97	194	157	4	<b>2.06</b>
<i>Ae.tri</i> /OZ	66	237	464	361	18	<b>3.88</b>
<i>Ae.tri</i> /H	47	171	336	269	5	<b>1.49</b>

NS: Number of pollinated spikes. NSK: Number of pollinated spikelets. NFP: Number of pollinated flowers. NFS: Number of fruit set. NHS: Number of hybrids seeds.

The results show differences in hybridization affinity between parents. The combination of *Ae.gen* and O.Z produced the largest hybrids number (54 a rate of 5.23 %). The crossing between *Ae.tri* and O.Z, comes second in hybrids production (18 a rate of 3.88 %). Combinations of *Ae.gen* and Hog as well as *Ae.tri* and Hog gave a small number of hybrids.

### 3.3 Mature embryo culture and plantlet regeneration

All the hybrids were collected in caryopsis resembling the female parent *Aegilops* sp. (Fig. 4), of different sizes (very noteworthy for hybrids whose parent is *Ae.tri* characterised by long caryopsis), mostly with a normal endosperm, only a few were scalded.



**Figure 4:** Harvested hybrid caryopsis photographs in comparison with those of respective parents. a-Hog, b- Hybrid *Ae.gen*/Hog, c-*Ae.gen*, d- O.Z, e- Hybrid *Ae.tri*/OZ, f- *Ae.tri*.

Several cold stratifications as well as the scarification of the seeds did not allow the break dormancy of hybrids, observed under natural conditions. Only mature embryos culture allowed germination and regeneration

of hybrid seedlings (Table 4). The embryos collected were of different sizes, some very small not exceeding one millimeter in diameter.

**Table 4:** Germination rate and number of hybrid seedlings regenerated by mature embryo culture

Hybrids	Cultured embryos	Germination %	Regenerated seedlings	Adult plants
<i>Ae gen</i> ./O.Z	7	100%	2	0
<i>Ae gen</i> /Hog	5	100%	2	0
<i>Ae tri</i> /Hog	2	100%	1	0
<i>Ae tri</i> /O.Z	1	100%	1	0
Total	15	100%	6	0

From fifteen embryos, six seedlings were regenerated in a relatively average rate of regeneration of 40 %, however, no adult plant is obtained. After successful germination (100 %) of all hybrids, those with normal growth (Fig. 5a) regenerated the seedlings. While for

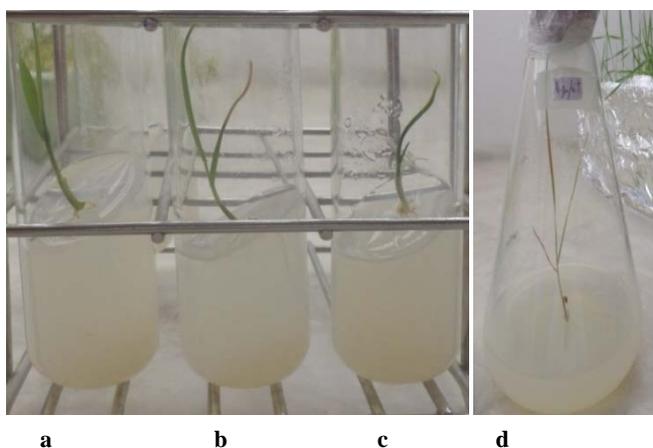
others, anomalies have been detected leading to precocious death causes by lack of root system edification (Fig. 5b); lack of the coleoptile development (Fig. 5c); and albino coleoptiles regeneration (Fig. 5d).



**Figure 5:** Hybrid mature embryo photographs of MS medium germination. **a-***Ae.tri/OZ*, two weeks of culture. **b-** *Ae.gen/OZ*, two weeks of culture. **c-***Ae.tri/Hog*, one week of culture. **d-** Another hybrid *Ae.gen/OZ*, four weeks of culture

The death of seedlings, at the acclimation stage, occurring at different stages of growth (the most advanced is that of tillering for the hybrid *Ae.gen/Hog*) is due to the weak growth of the seedlings (stunted plantlets, leaves with very small surface, weak root

system) (Fig. 6). However, hybrid seedlings also exhibited morphological features of female parents *Ae.gen* and *Ae.tri* in the early stages of development, similar to twisted pre-foliation and leaf color.



**Figure 6:** Regenerated hybrid plantlets. **a:** *Ae.gen/O.Z.* **b:** *Ae.tri/Hog.* **c:** *Ae.gen/Hog* (six weeks of culture). **d-** *Ae.gen/Hog* (twelve weeks of culture).

#### 4 DISCUSSION

Obtaining interspecific hybrids offers significant variability. It is the crucial step in any program of genes introgression from wild species. However, its success depends not only on the choice of genitors that suits the objectives of the program, but also on crossing affinity. Thus, the study of drought tolerance confirms the high potential of *Aegilops* species to tolerate water stress, particularly that of *Ae.geniculata*, which corroborates

with the works of (Rekika et al., 1998; Zaharieva et al., 2001; Baalbaki et al., 2006) and the adaptation of the OZ variety to Mediterranean stress type (Ali Dib et al., 1992; Meziani et al., 1993). The RWC and the SR had a significant impact on the other physiological and biochemical parameters of this study, SR - RWC ( $r = -0.481^{**}$ ); SSC - RWC ( $r = 0.350^{*}$ ); SR and SSC ( $r = -0.352^{*}$ ) (Table 2). In fact, the ability to maintain elevated

RWCs in a situation of water stress is related to the osmotic adjustment capacity or to the high elasticity of the plant tissues (Bousbaa et al., 2013). The opening or closing of stomata, sensitive to the concentrations of abscisic acid produced by the roots, is the most element affected by the water stress of all those in relation to the water of the plant (Anjum et al., 2011; Shang et al., 2016). By closing its stomata, the plant saves the available water and preserves cell integrity, thus constituting one of the best strategies for water stress tolerance (Djekoun & Ykhlef, 1996; Ykhlef et al., 2000; Bousbaa et al., 2013; Shang et al., 2016). Consequently, the closure of the stomata leads to a decrease of the photosynthesis (Maurino & Peterhansel, 2010; Gallais, 2015) and an increase of the reactive oxygen species where peroxidase plays an important role in their elimination, especially in conditions of water stress (Anjum et al., 2011).

The few works dedicated to interspecific crosses where species of the genus *Aegilops* are taken as female parent, report the weakness of obtaining such hybrids, which seems, more favourable in field conditions (Guadagnuolo et al., 2001). Many criteria influence the acquisition of fertile hybrids and backcross progenitor for introgression between two genera, including genetic relationships, ploidy level, and hybridization direction (Waines & Hegde, 2003). The success of obtaining hybrids depends largely on the parental genotypes involved in the crossing. The differences in hybridization affinity of *Aegilops* species and wheat varieties are highly observed (Guadagnuolo et al., 2001; Waines & Hegde, 2003; Stone & Peeper, 2004; Hadzhiivanova et al., 2012; Ykhlef et al., 2007). In many studies, the common sharing of the D genome between the bread wheat and the wild parent allowed the pairing of homeologous chromosomes and obtaining fertile hybrids (Snyder et al., 2000; Schoenenberger et

al., 2005; Martins et al., 2015). The effect of the Ph1 locus is only suppressed in some diploid *Aegilops* species (Al-Kaff et al., 2007), so allowing the pairing of homeologous chromosomes in the hybrid (Waines & Hegde, 2003). The lethality of hybrids, manifested by meristem tissues anomalies from germination to a weak growth at advanced stages of development, are often reported in interspecific hybridization, resulting from incompatibilities between the nuclear and cytoplasmic genomes, due to complementarities or epistasis interactions between genes (Tikhenko et al., 2008; Matsuoka et al., 2007; Mizuno et al., 2010). In the case of *Poaceae*, a paternal heredity of chloroplast DNA has never been observed (Guadagnuolo et al., 2001), so in our study, the maternal cytoplasmic heredity explains the morphological characters of resemblance between hybrids and the female *Aegilops* parent. Differences in establishment of pre- or post-zygotic hybridization barriers between parents manifest according to the direction of hybridization, which make easier the obtaining of hybrids in one of the directions (Riesberg & Carney, 1998). Following our results, interspecific hybridization where *Aegilops* is the female parent have the advantage of obtaining caryopsis hybrids (Guadagnuolo et al., 2001; Cifuentes et al., 2006) compared to the reciprocal hybridization durum wheat /*Aegilops* where interspecific hybrids were obtained only by embryos rescue (Hadzhiivanova et al., 2012; Ykhlef et al., 2007). Our study is a contribution to the identification of genitors and mechanisms that facilitate interspecific hybrids obtaining. We have focused on the cross-ability of the O.Z variety, widely used and adapted to the Mediterranean stress type, with the *Ae.gen* and *Ae.tri* species, and the quality of hybrids obtained in the *Aegilops* /durum wheat direction. Thus, research within these two species of accessions, that are more favourable for obtaining hybrids, is promising success and less expensive hybridization.

## 5 CONCLUSION

We have undertaken in this study, the hybridization of two species of the genus *Aegilops* and two durum wheat varieties. The characterization of the genitors for their drought tolerance during the hybridization period, confirms our choice of the genitors, where we noticed the superiority of the *Aegilops* for water stress tolerance comparing to the wheat and the adaptation of durum wheat varieties to the climate of Algerian cereal zones. The duration of the stress applied seems average. Therefore, in a short term the plants reacted by a fast closing of the stomata which remedied the loss of water by transpiration and consequently maintained a high RWC favourable to the good cellular functioning. Obtaining hybrids, even with a low rate of 3.9 %, indicates the possibility of interspecific hybridization

between *Aegilops* species and durum wheat, taking *Aegilops* as the female parent. Their success is affected by several parameters where the genotype of the involved parents and the degree of relationship are important criteria, because of the existence of genes that inhibit homeologous pairings between parental genomes as well as the establishment of genes that cause lethality and the sterility of hybrids in some species during speciation. The obtaining of caryopsis in very good condition and without recourse to the embryos rescue, confirms that genetic mechanisms of post zygotic isolation have been expressed in the hybridization direction where *Aegilops* is considered as the female parent. The study and understanding of these mechanisms and the identification of their responsible

genes will overcome these barriers and facilitate the acquisition of hybrids in order to succeed the introgression programs of interesting genes from wild species. We lead cytogenetic and molecular studies to

characterize hybrids and to elucidate potential problems that led to the loss of hybrid seedlings during the acclimation phase.

## 6 ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Dr. Kacem S. for her helpful guides to the *in-vitro* culture experiment. We are grateful to Mr Belbekri N. for his help and technical assistance during

the whole work and for Pr. Mezedjri L. for his considerable help in statistical analysis. We would like to thank Miss Zeghida Y.I. for grammar correction.

## 7 REFERENCES

- Aissa, N. & Radhouane, L. (2014). Importance du statut hydrique et de l'indice chlorophyllien de la feuille drapeau du Sorgho (*Sorghum vulgare* L.) dans l'élaboration du rendement grainier en présence de contraintes hydriques et salines. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 10(1), 111-117.
- Ali Dib, T., Monneveux, P. & Araus, J. L. (1992). Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. II. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie*, 12(5), 381-393. <https://doi.org/10.1051/agro:19920504>
- Al-Kaff, N., Knight, E., Bertin, I., Foote, T., Hart, N., Griffiths, S., & Moore, G. (2007). Detailed dissection of the chromosomal region containing the Ph1 locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling. *Annals of botany*, 101(6), 863-872. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm252>
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026-2032. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances*, 28(1), 169-183. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.005>
- Attab, S., & Brinis, L. (2012). Etude comparative de la réponse physiologique de deux variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) à l'infection par *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* agent causal de l'oïdium. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 25(1), 82-87.
- Baalbaki, R., Hajj-Hassan, N., & Zurayk, R. (2006). *Aegilops* Species from semiarid areas of Lebanon: Variation in quantitative attributes under water stress. *Crop science*, 46(2), 799-806. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0120>
- Bousbaa, R., Djekoun, A., Susan, D., & Ykhlef, N. (2013). Caractérisation moléculaire et association marqueur SSR phénotype pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *European Scientific Journal*, 9(12), 204-219.
- Cakmak, I., & Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant physiology*, 98(4), 1222-1227. <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222>
- Chahbar, S. & Belkhodja, M. (2016). Water deficit effects on morpho-physiological parameters in durum wheat. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(3), 1166-1181. <https://doi.org/10.4314/jfas.v8i3.28>
- Cifuentes, M., Blein, M., & Benavente, E. (2006). A cytomolecular approach to assess the potential of gene transfer from a crop (*Triticum turgidum* L.) to a wild relative (*Aegilops geniculata* Roth.). *Theoretical and applied genetics*, 112(4), 657-664. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0168-z>
- Clarke, J. M., & McCaig, T. N. (1982). Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of Triticum genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 62(3), 571-578. <https://doi.org/10.4141/cjps82-086>
- Colmer, T. D., Flowers, T. J., & Munns, R. (2006). Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1059-1078. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj124>
- Djekoun A. & Ykhlef N. (1996). Déficit hydrique, effets stomatiques et non-stomatiques et activité photosynthétique chez quelques génotypes de blé Tétraploïdes. 3ème Réunion du réseau SEWANA, de blé dur IAV HASSAN II (Maroc), 6-7 Décembre 1996.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dulai, S., Molnár, I., Prónay, J., Csernak, A., Tarnai, R., & Molnár-Láng, M. (2006). Effects of drought on

- photosynthetic parameters and heat stability of PSII in wheat and in *Aegilops* species originating from dry habitats. *Acta Biologica Szegediensis*, 50(1-2), 11-17.
- Gallais, A. 2015. *Comprendre l'amélioration des plantes: Enjeux, méthodes, objectifs et critères de sélection. France*, Fr: Quae, Pp 231.
- Guadagnuolo, R., Savova-Bianchi, D., & Felber, F. (2001). Gene flow from wheat (*Triticum aestivum* L.) to jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.), as revealed by RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and applied Genetics*, 103(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s001220100636>
- Hadzhiivanova, B., Bozhanova, V., Dechev, D. (2012). Interspecific Hybridization between Durum Wheat and *Aegilops Umbellulata* (Zhuk.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(5), 713-721.
- Jahier, J., Chalhoub, B., & Charcosset, A. (2006). La domestication des plantes: de la cueillette à la post-génomique. *Biofutur*, 266, 28.
- Kellou, 2003. *Sauvetage d'embryons issus de croisements Triticum durum Desf x Aegilops geniculata Roth. et Triticum durum Desf x Agropyron repens (L) Pal. Beauv.* Thèse de magistère. Univ. Constantine. Algérie.
- Kosová, K., Vítámvás, P., & Prášil, I. T. (2014). Proteomics of stress responses in wheat and barley—search for potential protein markers of stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 5, 711. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00711>
- Martins, B. A., Sun, L., & Mallory-Smith, C. (2015). Resistance allele movement between imazamox-resistant wheat and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) in eastern Oregon wheat fields. *Weed Science*, 63(4), 855-863. <http://dx.doi.org/10.1614/WS-D-14-00146.1>
- Matsuoka, Y., Takumi, S., & Kawahara, T. (2007). Natural variation for fertile triploid F 1 hybrid formation in allohexaploid wheat speciation. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(4), 509-518. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0584-3>
- Maurino, V.G., & Peterhansel, C. (2010). Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Current opinion in plant biology*, 13(3), 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.01.006>
- Meziani, L., Bammoun, A., Hamou, M., Brinis, L., & Monneveux, P. (1993). Essai de définition des caractères d'adaptation du blé dur dans différentes zones agroclimatiques de l'Algérie (No. 94-075912. CIMMYT.). Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. *Diversité génétique et amélioration variétale*. Montpellier (France). 15-17 Décembre 1992. Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n°64).
- Mizuno, N., Hosogi, N., Park, P., & Takumi, S. (2010). Hypersensitive response-like reaction is associated with hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* Coss. *PLoS One*, 5(6), e11326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011326>
- Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M., & Galiba, G. (2004). Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31(12), 1149-1159. <https://doi.org/10.1071/FP03143>
- Morrison, L.A., Riera-Lizarazu, O., Cremieux, L., & Mallory-Smith, C. A. (2002). Jointed Goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host)× Wheat (*Triticum aestivum* L.) Hybrids. *Crop Science*, 42(6), 1863-1872. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1863>
- Mujeeb-Kazi, A., Kazi, A. G., Dundas, I., Rasheed, A., Ogonnaya, F., Kishii, M., Bonnett, D., Wang, R.C., Xu, S., Chen, P., Mahmoud, T., Bux, H. & Farrakh, S. (2013). Genetic diversity for wheat improvement as a conduit to food security. *Advances in agronomy*, 122, 179-257. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417187-9.00004-8>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Neelam, K., Rawat, N., Tiwari, V. K., Kumar, S., Chhuneja, P., Singh, K.,...& Dhaliwal, H. S. (2011). Introgression of group 4 and 7 chromosomes of *Ae. peregrina* in wheat enhances grain iron and zinc density. *Molecular breeding*, 28(4), 623-634. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9514-1>
- Rekikda, D., Zaharieva, M., Stankova, P., Xu, X., Soururis, I., and Monneveux, P.(1998). Abiotic stress tolerance in *Aegilops* species. *Durum Research Network, Proceeding of the SEWANA, South Europe, West Asia and North Africa (eds MM Nachit, M Baum, E Porceddu, P Monneveux, E Picard)*, 113-118.
- Rieseberg, L. H., & Carney, S. E. (1998). Plant hybridization. *The New Phytologist*, 140(4), 599-624. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00315.x>
- Rolland, B., Jahier, J., Branlard, G., Duperrier, B., Lonnet, P., Senellart, P., Margalé, E.& Olivier, A. (2014). Exploitation de la variabilité génétique d'*Aegilops tauschii* dans l'amélioration du blé tendre. *Innovations Agronomiques*, 35, 119-131.
- Schneider, A., Linc, G., Molnár, I., & Molnár-Láng, M. (2005). Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of 5 derived wheat–*Aegilops biuncialis* disomic addition lines. *Genome*, 48(6), 1070-1082. <https://doi.org/10.1139/g05-062>

- Schneider, A., Molnár, I., & Molnár-Láng, M. (2008). Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, 163(1), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9624-y>
- Schoenenberger, N., Felber, F., Savova-Bianchi, D., & Guadagnuolo, R. (2005). Introgression of wheat DNA markers from A, B and D genomes in early generation progeny of *Aegilops cylindrica* Host × *Triticum aestivum* L. hybrids. *Theoretical and applied genetics*, 111(7), 1338-1346. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0063-7>
- Shang, Y., Dai, C., Lee, M. M., Kwak, J. M., & Nam, K. H. (2016). BRI1-associated receptor kinase 1 regulates guard cell ABA signaling mediated by open stomata 1 in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 9(3), 447-460. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.014>
- Snyder, J. R., Mallory-Smith, C. A., Balter, S., Hansen, J. L., & Zemetra, R. S. (2000). Seed production on *Triticum aestivum* by *Aegilops cylindrica* hybrids in the field. *Weed Science*, 48(5), 588-593. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2000\)048\[0588:SPOTAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2000)048[0588:SPOTAB]2.0.CO;2)
- Stone, A. E. & Peeper, T.F. (2004). Characterizing jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) × winter wheat hybrids in Oklahoma. *Weed science*, 52(5), 742-745. <https://doi.org/10.1614/WS-03-119R1>
- Tikhenko, N., Rutten, T., Voylokov, A., & Houben, A. (2008). Analysis of hybrid lethality in F1 wheat-rye hybrid embryos. *Euphytica*, 159(3), 367-375. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9528-x>
- Tiwari, V.K., Rawat, N., Neelam, K., Kumar, S., Randhawa, G. S. & Dhaliwal, H.S. (2010). Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschy* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(2), 259-269. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1307-8>
- Van Slageren M.W. (1994). *Wild Wheat: a monograph of Aegilops L. and Amblyopyrum (Jaub. Et Spach.) Eig. (Poaceae)*. Wageningen Agricultural University, International center for Agricultural Research in the Dry Areas: Veenman Drukkers, Wageningen, Pp.512.
- Waines, J.G. & Hegde, S.G. (2003). Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. *Crop Science*, 43(2), 451-463. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0451>
- Wang, S., Yin, L., Tanaka, H., Tanaka, K., & Tsujimoto, H. (2010). Identification of wheat alien chromosome addition lines for breeding wheat with high phosphorus efficiency. *Breeding science*, 60(4), 371-379. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.60.371>
- Wang, S., Yu, Z., Cao, M., Shen, X., Li, N., Li, X., ...& Yan, Y. (2013). Molecular mechanisms of HMW glutenin subunits from 1S1 genome of *Aegilops longissima* positively affecting wheat breadmaking quality. *PLoS One*, 8(4), e58947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058947>
- Ykhlef, N., Djekoun, A., Bensari, M., Vignes, D. (2000). L'efficacité de l'utilisation de l'eau marqueur physiologique de la résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf). *Sciences & technologie*, 10: 87 - 92.
- Ykhlef, N., KELLOU, K., & DJEKOUN, A. (2007). Régénération d'embryons issus de croisement interspécifique blé dur (*Triticum durum* Desf.) × *Aegilops geniculata* roth.: effet des régulateurs de croissance. *Sciences & Technologie C*, 25, 44-52.
- Zaharieva, M., Gaulin, E., Havaux, M., Acevedo, E., & Monneveux, P. (2001). Drought and heat responses in the wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth: Potential interest for wheat improvement. *Crop Science*, 41(4), 1321-1329. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.4141321x>

<b>Nom &amp; Prénom :</b> Zadri Fethia Epouse Boudchicha <b>Date de Soutenance :</b> 28-12-2020		
<b>Thème :</b> Caractérisation d'hybrides <i>Aegilops sp./ Blé dur (Triticum durum Desf.)</i> pour l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse du blé dur : Caractérisation moléculaire par SSR.		
<b>Nature du diplôme :</b> Doctorat en Sciences, <b>Option</b> Biotechnologie Végétale		
<p><b>Résumé :</b> L'objectif de ce travail a été d'obtenir des hybrides interspécifiques entre blé dur et espèces sauvages d'<i>Aegilops</i> autant que parent femelle. Ce genre présente un réservoir de gènes pour l'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse qui occasionne de grandes pertes pour la céréaliculture en Algérie. A cet effet, trois variétés de blés durs (Oued Zenati, Waha et Hoggar) ont été croisées avec deux espèces sauvages tétraploïdes (<i>Aegilops geniculata</i> Roth et <i>Aegilops triuncialis</i> L.), pendant cinq années afin de déceler les géniteurs présentant plus d'affinité pour l'obtention d'hybrides. Ces géniteurs ont été aussi caractérisés pour leur tolérance à la sécheresse. Une culture d'embryons matures sur milieu MS a été entreprise, suite à une non germination des hybrides dans les conditions naturelles. La caractérisation des hybrides a été réalisée par le dénombrement chromosomique ainsi que par l'expression moléculaire de onze marqueurs microsatellites (SSR) en comparaison avec les parents. Les résultats montrent un grand potentiel de tolérance à la sécheresse des espèces sauvages, et une adaptation des variétés de blé aux conditions climatiques en zones de céréaliculture. 81 hybrides ont été obtenus, la combinaison des parent <i>Aegilops geniculata</i>/Oued Zenati a produit le plus grand nombre d'hybrides (54 soit un taux de 5,23%), suivie du croisement <i>Aegilops triuncialis</i>/Oued Zenati (18 hybrides soit un taux de 3,88%), les croisements des deux espèces d'<i>Aegilops</i> avec la variété Hoggar n'a produit qu'un nombre faible d'hybrides. Un avantage de ce sens de croisement est l'obtention d'hybrides en caryopse sans recours au sauvetage d'embryons. Cependant, une létalité ainsi que des anomalies de développement des hybrides ont été constatées à différents stades. Ainsi, aucune plante adulte n'a pu être régénérée. Pour l'hybride <i>Aegilops geniculata</i>/Oued Zenati, le nombre chromosomique a été établi à <math>2n=24</math>. Parmi les 11 amorces SSR, huit se sont révélées polymorphes, dont <i>Xbarc174</i> et <i>Xwms332</i> présentent un grand nombre de bandes permettant ainsi de différencier aux mieux les hybrides. Des différences d'expressions de marqueurs même pour les hybrides issus de même parents ont été observées, où l'amorce <i>Xwmc25</i> et <i>Xwms257</i> ont permis de déceler une fragmentation du chromosome 2BS et élimination des fragments pour deux hybrides <i>Aegilops geniculata</i>/Oued zenati. Ces résultats indiquent que les hybrides ont manifesté une hérédité cytoplasmique maternelle, et que des mécanismes d'isolement postzygotiques expliquent la létalité et les anomalies de développement, dans ce sens de croisement. La recherche au sein des <i>Aegilops</i> d'accessions présentant plus d'affinité de croisement, permettra la régénération d'hybrides et la réussite de telles hybridations.</p>		
<b>Mots clés :</b> <i>Aegilops</i> , blé dur, sécheresse, croisements interspécifiques, amélioration génétique, marqueurs SSR.		
<b>Laboratoire de recherche :</b> Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale-UFM1. Constantine		
<b>Membre de jury :</b>		
Président	DJEKOUN Abdelhamid	Pr. Université des Frères Mentouri Constantine1
Directeur de thèse	YKHLEF Nadia	Pr. Université des Frères Mentouri Constantine1
Examineur	BENMAHAMMED Amar	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
Examineur	Bousbaa Ratiba	MCA. Université des Frères Mentouri Constantine1
Examineur	BENBELKACEM Abdelkader	Directeur de recherche. INRAA. Constantine
Examineur	LAIB Messaoud	MCA. Université 20 Aout 1955. Skikda

