

Analyse Moléculaire De La Diversité Génétique Des Protéines De Réserves Chez Quatre Variétés De Blé Dur (*Triticum turgidum* L.var durum)

Nabila Adoui, M.A.A

Université M'sila, Algérie ; Université Constantine1, Algérie

Laid Benderradji, M.C.A.

Noura Messaoudi, PhD.

Université M'sila, Algérie

Faiçal Brini, Prof.

Centre de Biotechnologies de Sfax, Université Sfax, Tunisie

Leila Boudour, Prof.

Université Constantine1, Algérie

Doi: 10.19044/esj.2017.v13n36p249 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n36p249](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n36p249)

Abstract

The molecular polymorphism of the stock proteins, namely, glutenin and gliadin has been studied in order to perform a comparison of the genes coding for these factors in the quality of bread as much as they are major contributors to the elasticity and formation of wheat dough. DNA markers for quality traits are currently being used by wheat breeders to directly measure traits and performing biochemical tests. The aim of this study was to use DNA markers to search for varieties with glutenin genes (HMW and LMW) and gliadin genes also. 4 durum wheat varieties (alexandrium, murcenese, italicum and valencia) were used for these genes using PCR/RFLP markers via (F-56) and (R-56) primers. Results obtained show that polymorphism rate of this two primer is 54.54%. These two primers produce the same number of amplifiers whose size is 536bp. A total of eleven fragments are obtained for each primer. Five are relatively polymorphic, which concerns the genotype: 4, 20, 76, 91 and 92 through the pairing of an expression density materialized by low intensity bands. The study also revealed that there was no product at 527bp, the size of (HMW) glutenin gene; this indicates that the 100 genotypes do not contain this gene. Thus indicating its poverty in this element; compared to the (LMW) subunit of this gene which accounts for about 60% of glutenin proteins. While there is 770bp product for the gliadin gene, which indicates also that the 100 genotypes contain this gene. Thus indicating its good quality for bread making.

Key words: Durum wheat, DNA markers, quality traits, glutenin, gliadin

Résumé

Le polymorphisme moléculaire des protéines de réserves (gluténine et gliadine), ont été étudiés dans le but d'effectuer une comparaison des gènes codants pour ces facteurs clés dans la qualité du pain d'autant plus qu'ils sont des contributeurs majeurs de l'élasticité et de la formation de la pâte de blé. Les marqueurs d'ADN pour les caractères de qualité sont actuellement utilisés par les sélectionneurs du blé afin de mesurer directement les caractères sans attendre les générations en effectuant ainsi des tests biochimiques. Le but de cette étude réside dans l'utilisation des marqueurs de l'ADN pour la recherche de variétés de blé disposées de gènes de gluténine matérialisé par la sous unité de haut poids moléculaire (HPM) et la sous unité de faible poids moléculaire (FPM) d'une part et de gènes de gliadine d'autre part. Quatre variétés de blé dur (alexandrium, murcenese, italicum et valencia) ont été utilisées pour rechercher ces gènes en utilisant des marqueurs PCR/RFLP et des amorces (F-56) et (R-56). Les résultats obtenus montrent que le taux de polymorphisme des deux amorces (F-56 & R-56) est de 54,54%. Les deux amorces ne produisent qu'un même nombre d'amplifiants de taille (536pb). Au total onze fragments sont obtenus pour chacun des amorces. Sur ces onze fragments ciblés, cinq sont peu polymorphes (génotype: 4, 20, 76, 91 et 92) à travers l'appariation d'une densité d'expression matérialisé par des bandes peu intenses. L'étude a fait sortir aussi qu'il n'y avait pas de produit à 527pb, soit la taille du gène de gluténine (HPM), ceci indique que les 100 lignes ne contiennent ce gène indiquant ainsi sa pauvreté en cet élément clé ; comparativement à la sous unité (FPM) de ce même gène qui représente environ 60% des protéines de gluténine. Cependant, il y'a de produit à (770pb) pour le gène de gliadine, ce qui indique que les 100 lignes contiennent ce gène prouvant ainsi sa bonne qualité pour la panification.

Mots clés : Blé dur, marqueur d'ADN, caractères de qualité, gluténine, gliadine

Introduction

Dans le système agricole, les céréales (blés, orge et riz) occupent une place primordiale à l'échelle mondiale. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine (Slama *et al.*, 2005). Les deux espèces de blé les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) avec plus de 90% de production mondiale et le blé dur (*Triticum durum* Desf.) qui constitue 5% de celle-ci (Gooding, 2009). Selon la FAO (2016), la production mondiale de blé en 2016 s'établirait à 723 millions de tonnes. En

Algérie, cette production a atteint 3,30 millions de tonnes pendant la campagne agricole 2014/15 (FAO, 2015). Par ailleurs, la filière des céréales constitue la ration alimentaire quotidienne occupant ainsi une superficie de 2.7 millions d'hectares (Benbelkacem, 2013). Étant donné la forte augmentation de la population mondiale dans les années à venir et pour fin de satisfaire la demande alimentaire de l'humanité, il est nécessaire d'augmenter au moins à 60% la quantité des produits agricoles d'ici jusqu'à 2050 (Gallais, 2015). Pour l'Algérie, les besoins d'une population en pleine croissance, la production est estimée à plus 111 million de quintaux vers 2020 (Hervieu *et al.*, 2006). La production des céréales est devenue une question préoccupante, et cela suppose que le milieu s'y prêt et que la technologie l'encadre. En effet, l'amélioration génétique du blé a eu pendant longtemps pour objectif l'augmentation de la productivité, et le succès de cette stratégie est lié à l'existence de conditions environnementales favorables, qui permettent l'expression des différents facteurs du rendement. Pour se faire, la sélection massale qui est une ancienne méthode de sélection agricole, se base sur le choix des semences et répond le mieux aux critères des paysans (Zeven, 1998). Les céréales sélectionnées pour être cultivées murissaient uniformément en facilitant la moisson, d'autant plus qu'elles se conservaient suffisamment longtemps pour assurer de la nourriture jusqu'à la prochaine moisson et fournissent des semences pour la saison suivante de culture (Marchenay, 1987 ; Yadav *et al.*, 2011). Le but principal de tout programme de sélection est la production de variétés possédant un rendement élevé et stable, dont l'environnement dans lequel se fait la sélection joue un rôle important. Tous les milieux n'ont pas la même aptitude à révéler les différences génotypiques et l'existence d'une interaction (génotype x environnement), complique les efforts de la sélection (Sanchez-Garcia *et al.*, 2012). Le processus de sélection est différent, selon qu'on cherche l'adaptation spécifique ou l'adaptation générale (Annichiarico *et al.*, 2006). Les marqueurs morphologiques sont déjà connus comme des outils efficaces pour l'estimation de la diversité génétique du blé (Al Khanjari *et al.*, 2008) ainsi que la caractérisation des ressources génétiques est une étape clé pour la sélection (Amallah *et al.*, 2016). De ce fait, les ressources génétiques représentent un patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux exploiter. Ainsi, pour assurer une agriculture durable, l'étude de la diversité et la caractérisation de ces ressources génétiques sont indispensables pour créer de nouvelles variétés ayant une bonne qualité, un rendement élevé, adaptées aux variations climatiques et résistantes aux maladies (Aguiriano *et al.*, 2006). L'objectif de notre étude porte sur l'identification des gènes codants pour les protéines de réserves, à savoir, les glutenines et les gliadines afin de déterminer le polymorphisme et/ou la diversité génétique des variétés étudiées et de mettre en place un système efficace de protection de ces

variétés afin d'évaluer les caractères de production et d'adaptation pour mieux connaître ces potentialités génétiques avant de se lancer dans des leurs programmes d'amélioration.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est composé de 4 variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L.var *durum*) à savoir, alexandrium (alex), valencia (vale), italicum (ita) et murcenese (mur) regroupant chacune plusieurs génotypes (Tableau 1) (Boudour *et al.*, 2004; Boudour, 2006).

Tableau 1: Caractères des variétés étudiées.

Caractères Variétés	Couleur de l'épi	Couleur de barbe	Couleur et forme du grain	Forme de l'épi	Précocité	Compacité	Paille
alexandrium	Glabre rouge	Noire	Blanc Allongé bossu	Fusifforme à pyramidal	Tardive	Compacte	Creuse
valencia	Pubescent rouge	Blanche	Blanc	Pyramidal	Précoce	Lâche à compacte	Creuse
italicum	Pubescent rouge	Rouge	Blanc	Pyramidal	Demi précoce	Compacte	Demi creuse
murcenese	Glabre rouge	Rouge	Rouge Gros bossu	Fusifforme Fusiforme	Précoce	Demi compacte	Demi pleine

Le but de cette étude est de faire un screening de différents génotypes pour la présence ou l'absence de gènes de gluten (gluténine et gliadine) de bonne qualité. Il s'agit de 100 génotypes qui ont été regroupées en lots contient chacun 5 génotypes, soit au total 20 lots obtenus (Tableau 2).

Tableau 2: Répartition des génotypes étudiés

Lot	Genotypes	Lot	Genotypes
1	alex1, alex2, alex3, alex4, alex5	11	vale4, vale5, vale6, vale7, vale8
2	alex6, alex8, alex9, mur1, mur2	12	vale51, vale10, vale11, vale12, vale13
3	mur4, mur5, mur6, mur7, mur8	13	vale14, vale15, vale16, vale17, vale18
4	mur9, mur10, mur11, mur12, mur13	14	vale19, vale20, vale21, vale22, vale23
5	mur14, mur15, mur16, mur17, mur18	15	vale25, vale26, vale27, vale28, vale29
6	mur19, mur20, mur21, mur22, mur23	16	vale32, vale34, vale35, vale36, vale37
7	mur24, mur25, mur26, mur27, mur28	17	vale38, vale39, vale40, vale43, vale44
8	mur 29, mur30, mur31, mur32,	18	ita 21, ita22, ita23, ita24, ita25

	mur33		
9	mur34, mur35, mur36, mur37, mur38	19	ita26, ita27, ita28, ita29, ita30
10	mur39, mur40, mur41, vale 2, vale3	20	ita31, ita32, ita38, ita39, ita40

Ces génotypes ont été utilisés pour une amplification PCR/RFLP, ils ont été pris deux à deux, [(4, 7) ; (51, 76) ; (88, 91) ; (10 et 11)] pour chaque variété [(alex) ; (vale) ; (ital) ; (mur)] respectivement afin d'effectuer un séquençage d'ADN du gène de gluténine (sous unité : Haut Poids Moléculaire « HPM ») et (sous unité : Faible Poids Moléculaire « FPM ») et du gène de gliadine (Tableau 3).

Tableau 3 : Polymorphisme génotypique des variétés étudiées

N° génotype	Variété alexandrium	N° génotype	Variété valencia	N° génotype	Variété italicum	N° génotype	Variété murcenesse
-	alex1	51	vale4	88	ital23	10	mur2
-	alex2	76	vale32	91	ital26	11	mur4
-	alex3	-	vale48	92	ital27	18	mur11
4	alex4	-	vale49	-	ital93	20	mur13
-	alex5	-	vale51	-	ital94	-	mur36
-	alex6	-	vale52	-	ital96	-	mur40
7	alex8	-	vale53	-	ital97	-	mur41
-	alex9	-	vale54	-	ital98	-	mur42
		-	vale67	-	ital111	-	mur43
		-	valen68	-	ital115	-	mur44
		-	vale69	-	ital118	-	mur45
				-	ital119	-	mur46
						-	mur47

Caractérisation moléculaire de génotypes étudiées

L'étude moléculaire a porté sur les génotypes sélectionnés et l'extraction de l'ADN génomique de ces génotypes a été réalisée à partir de plantes récoltées des pots de végétation. Seules, les dernières paires de feuilles sont prélevées puis déshydratées par Silica gel sans cobalt pendant une semaine.

Extraction et purification de l'ADN

Le protocole d'extraction est celui d'un kit commercial, Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Courtaboeuf, France), sans modification. Le protocole de base non commercial est celui de Doyle *et al.*, (1987) à base de détergent cationique CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) déjà utilisé par Murray *et al.*, (1980). Le tampon d'extraction étant composé de 2% (p/v) de CTAB; 1,4 M NaCl ; 20mM Na₂EDTA; 100mM Tris-HCl (pH 8) et 1% de bisulfite de sodium ajouté extemporanément. Environ 20mg de feuilles déshydratées mises en suspension dans 1ml de tampon d'extraction préchauffé à 60°C sont broyées dans un mortier stérilisé par autoclavage, le

broyat est incubé à 60°C au bain-marie pendant 60min avec une agitation manuelle et fréquente par inversion des tubes. Après une centrifugation rapide, 500µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 sont ajoutés au surnageant, l'ensemble est agité, centrifugé à 10000g pendant 10min à 4°C, puis à la phase aqueuse sont ajoutés 500µl d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Après agitation, l'ensemble est centrifugé à 10000g pendant 10min à 4°C. A la phase aqueuse, sont ajoutés 2/3 de volume d'isopropanol, le mélange est conservé à (-20°C) pendant 30min. Après précipitation, l'ensemble est centrifugé à 10000g pendant 10min à 4°C, puis et après élimination du surnageant, le culot est séché dans un évaporateur concentrateur centrifuge sous vide (Speed Vac Savant Instruments, Farmingdale, USA) pendant 5min et ré-suspendu en présence de 500µl de NaCl 1M et de RNase à la concentration finale de 800µg. ml⁻¹ pendant 30min à 37°C. Ensuite, 500µl d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique 24/1 sont ajoutés. Les tubes agités manuellement et centrifugés à 10000g pendant 10min à 4°C dont à la phase aqueuse sont ajoutés 2/3 de volume d'isopropanol, le mélange est conservé à (-20°C) pendant 30min. Après précipitation, l'ensemble est centrifugé à 10000g pendant 10min à 4°C, et après élimination du surnageant, le culot d'ADN est séché à l'évaporateur concentrateur centrifuge sous vide pendant 5min et ré-suspendu dans 30µl de TE (10mM Tris (pH 8), 20mM Na₂EDTA) toute la nuit à 4°C.

Un témoin d'extraction sans matériel biologique est systématiquement inclue dans la procédure. La quantité et la qualité de l'ADN (1,5µl) sont estimées par dosage au spectrophotomètre Nano-Drop (Thermo Scientific Nano-DropTM8000). L'évaluation de la pureté par DO à 260nm et 280nm est le rapport DO260 / DO280, et la quantification par DO à 260nm.

Electrophorèse d'ADN

L'analyse électrophorétique de l'ADN est réalisé avec 3µl d'ADN, ajouté au 2µl de tampon de charge (5x), à pH 8 [0.75ml bleu de bromophénol (2%), 5ml glycérol (100%), 2ml Na-EDTA, 0.75ml xylène cyanole (2%), 1.5ml H₂O]. Le support d'électrophorèse est formé d'un gel d'agarose à 1% [1 g agarose dans 100ml de tampon TBE (1x) à pH 8 en présence 2µl de bromure d'ethylum (10µg/µl)]. Après avoir coulé le gel, formation des puits et le laisser polymériser ; les échantillons d'ADN (5µl) qui sont préparés par l'addition de 2µl de tampon de charge au 3µl de l'ADN sont déposés dans les puits et soumis à un courant de 93volts durant 90min, en utilisant le tampon de migration 'TBE (5x) (5.4g Tris, 0.29g EDTA 500mM à pH 8, 2.75g Acide borique, 100ml H₂O), à pH = 8.

Analyse PCR/RFLP

L'analyse RFLP est effectuée par l'utilisation de deux amorces de 770pb,

F-56:5'GGATCCATGAAGACCTTTCTCATCCT3'

R-56:5'AAGCTTTCAGTTTGTACCGAAGATGC3'

L'amplification de l'ADN à l'aide d'une PCR pour l'analyse RFLP est réalisée dans un thermo-cycler ADN (Biometra, GmbH) selon la méthode de Williams *et al.*, (1990) ; Zietkiewicz *et al.*, (1994). Un volume finale de 25µl contient 2.5µl de tampon PCR (10x), 0.5µl MgCl₂, 0.5µl dNTP, 0.5amorce, 2µl ADN, 0.5 Unité Taq-polymérase et 16µl H₂O (Tableau 4). Cette amplification comprend une phase de dénaturation initiale d'ADN de 2,5min à 94°C, une phase de 30 cycles avec 1min à 94°C., pour la dénaturation de l'ADN, 1min à 37°C pour l'hybridation des amorces, 1min à 72°C pour l'élongation et une phase d'élongation finale de 10 min à 72°C. On y trouve d'abord une phase de dénaturation initiale de 2 min à 94°C, suivie de 40 cycles pour une dénaturation de 94°C pendant 30 secondes, pour une hybridation à 52°C pendant 45 secondes et pour une extension à 72°C pendant 2min et enfin un dernier cycle d'extension finale à 72°C pendant 7 min. Après 2h, Les bandes d'ADN amplifiées sont visualisées sous lumière ultraviolette avec 10µg/µl de bromure d'éthilium et la taille des fragments est estimée sur la base d'une échelle d'ADN de 100 à 2000 paires de base.

Tableau 4: Composantes du volume final de la PCR

Tampon de réaction 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl ₂ , pH 9.0)	2.5µl
50mM MgCl ₂	0.5µl
2mM dNTP	2.5µl
10mM amorce	0.5µl
50ng ADN	2.0µl
0.5Unité Taq-polymérase	1.0µl
H ₂ O	16µl
Volume finale	25µl

Analyse de gènes de gluten

Gènes de glutenine (HPM et FPM)

Les 100 génotypes ont été groupés dans des tubes de 5 génotypes chacun, soit 20 tubes au total, les amorces (1 et 2) & (3 et 4) Ont été utilisée pour amplifier le gène de gluténine (HPM) et (FPM), respectivement

F-HPM: 5'GAAACCTGCTGCGGACAAG3'1

R-HPM: 5'GCCTAGCAACCTTCACAATC3'2

F-FPM: 5'AAACAGAATTATTAAAGCCGG3'3

R-FPM: 5'GGTTGTTGTTGTTGCAGCA3'4

Gène de gliadine

L'amorce suivante a été utilisée pour amplifier le fragment d'AND de taille de 770bp. F-56: 5'GGATCCATGAAGACCTTTCTCATCCT3'

R-56: 5'AAGCTTTCAGTTRGTACCGAAGATGCC3'

Analyse phylogénétique et d'expression des gènes

Les gels sont photographiés, scannés, puis analysés par le logiciel Bio-Rad. Model Gel Documentation 2000. Pour les gels PCR/RFLP, les bandes de chaque profil sont désignées par leur présence (+) ou absence (-). La matrice ainsi établie pour le marqueur généré par les deux amorces est analysée à l'aide du logiciel Bio-Rad. Les résultats obtenus sont traités par l'analyse statistique multi variée. La matrice de l'identité génétique et la distance sont estimés selon le coefficient de Nei (Nei, 1978), en utilisant le logiciel Genetix version 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004).

L'analyse phylogénétique a été menée dans MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), à l'exception des séquences répétitives, L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode UPGMA dont le niveau d'expression des gènes a été mesuré par qRT-PCR (Bio-Rad). L'expression génétique a été normalisée au niveau d'expression du gène de la sous unité 15kDa de l'ARN polymérase (Stephenson *et al.*, 2007).

Résultats et discussion

Analyse RFLP

La qualité de l'ADN a été vérifiée par le rapport DO260/DO280, sa valeur oscille entre 1.92 et 1.95 ce qui montre que le degré de pureté est élevé. L'étude de la pureté de l'ADN avait pour objectif de mettre en évidence le polymorphisme moléculaire des génotypes de blé dur sélectionnés en utilisant le marqueur PCR/RFLP. Le marqueur RFLP est dispersé dans les régions non codantes du génome et plus susceptible de muter en comparaison avec les gènes codants, c'est un indicateur de variations génétiques dans les études phylogénétiques. L'homogénéité de la densité des bandes reflète le nombre presque identique de copies pour la séquence amplifiée. Ce résultat corrobore avec celui de (Noma *et al.*, 2016) qui trouvent chez le blé tendre des copies multiples estimé de (10-15) à (35-40) et que le nombre de fragments ne diffère pas par rapport à l'amorce utilisée. De ce fait l'amorce que nous avons utilisée a répondu négativement en nombres de bandes et s'est avéré non polymorphe et que chaque bande correspond à l'amplification de la même séquence d'ADN amplifiée. Le taux de polymorphisme des deux amorces, à savoir, (F-56) & (R-56) est de 44%, et cela reflète aussi le taux polymorphique de chaque amorce séparément (Tableau 5, Figure 1).

Caractérisation des fragments des amorces (F-56 ; R-56)

Les deux amorces produisent le même nombre d'amplifiants de taille 536pb. Au total 11 fragments sont obtenus à raison d'un fragment pour chaque amorce (F-56 ; R-56). De ce fait on a distingué pour l'échantillon7 (génotype, alex8) ; l'échantillon10 (génotype, mur2) ; l'échantillon11 (génotype, mur4) ; l'échantillon18 (génotype, mur11) ; l'échantillon51 (génotype, vale4) et l'échantillon88 (génotype, ital23) qu'il y a une présence de bandes intenses de 536pb. Alors que pour l'échantillon4 (génotype, alex4) ; l'échantillon20 (génotype, mur13) ; l'échantillon76 (génotype, vale32) ; l'échantillon91 (génotype, ital26) et l'échantillon92 (génotype, ital27), on a distingué la présence d'un nombre de bandes moins intenses (Tableau 6, Figure 1).

Tableau 5: Analyse RFLP (génotypes générés par amorces F-56 et R-56).

RFLP	P (%)	M	PM (pb)	Echantillon										
				4	7	10	11	18	20	51	76	88	91	92
F-56 & R-56	54,54	1	1130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	1070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	961	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	865	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		5	806	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	708	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		7	610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		8	536	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		9	477	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		10	418	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		11	339	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		12	260	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		13	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total = 11			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

M : marqueur moléculaire, (4, 20, 76, 91, 92) : Echantillons des génotypes (alex4, mur13, vale32, ital26, ital27)...bandes moins intenses ; (7, 10, 11, 18, 51, 88): Echantillons des génotypes (alex8, mur2, mur4, mur11, vale4, ital23).....bandes intenses. (+) : présence, (-) : absence

Tableau 6 : Echantillons des génotypes sélectionnés pour le séquençage de l'ADN.

Echantillon	Genotype	Echantillon	Genotype
4	alex4	51	vale4
7	alex8	76	vale32
10	mur2	88	ita23
11	mur4	91	ita26
18	mur11	92	ita27
20	mur13	/	/

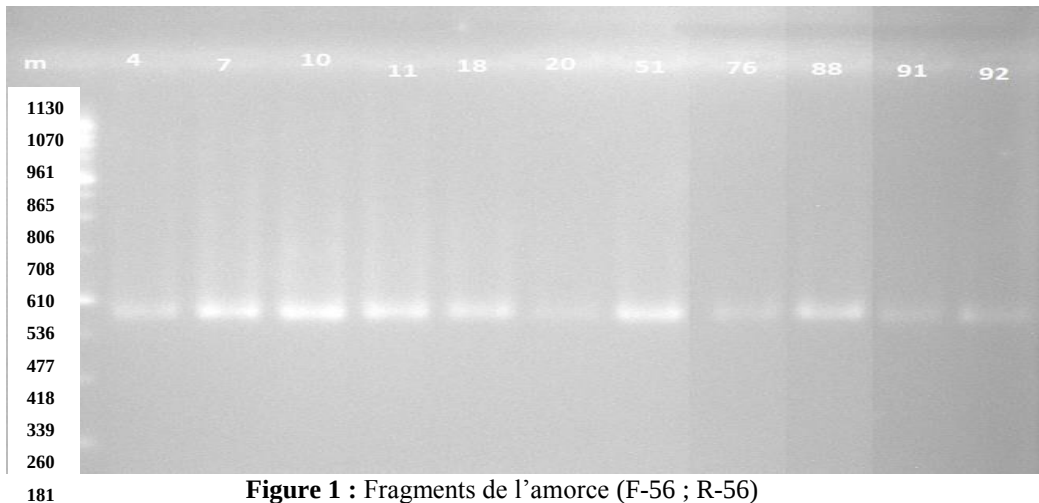


Figure 1 : Fragments de l'amorce (F-56 ; R-56)

Gène de glutenine (HPM)

Le gel obtenu des tubes numérotés de 1 à 20 de 100 génotypes, montre de très faibles bandes à 527pb ce qui confirme l'absence de gènes de glutenine (HPM) et cela indique que ces génotypes dépourvues de ce gène (Figure 2). Selon Abdel-Mawgood (2008) ; Noma *et al.*, (2016), l'absence du gène de gluténine (HPM) a été confirmée par la comparaison avec un témoin de l'ADN du blé tendre égyptien qui a montré des bandes très visible à 527pb.

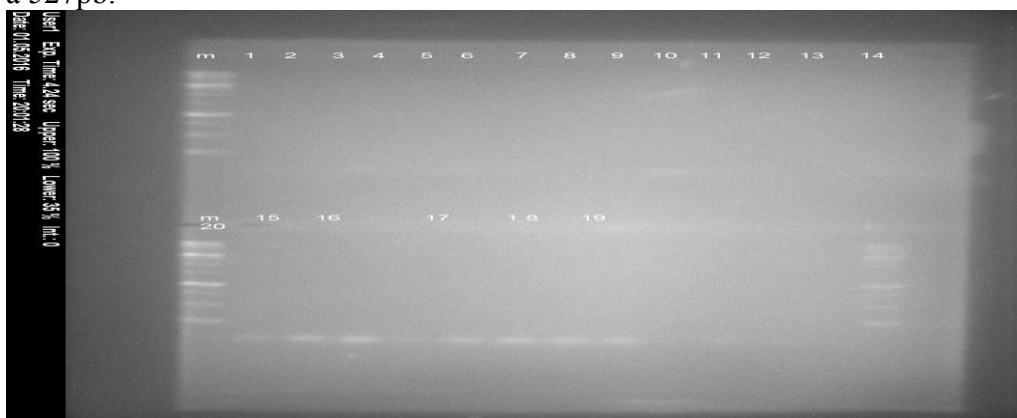


Figure 2 : Absence de bandes du gène de glutenine (HPM)

Gène de glutenine (FPM)

Le gène de gluténine (FPM) représente environ 60% des protéines de glutenine dans les graines matures et joue un rôle important dans la formation du macro-polymère de glutenine et de la qualité du gluten, en particulier pour l'extensibilité et la résistance de la pâte. La sous unité (FPM) du gène de glutenine appartient à la famille de gènes multiples. Une étude

récente basée sur le screening de la bibliothèque BAC et l'analyse protéomique a montré que Glu-A3, Glu-B3 et Glu-D3 dans le cultivar de blé chinois Xiaoyan54 contiennent 4, 3 et 7 gènes respectivement (Abdel-Mawgood, 2008).

Gène de gliadine

Le gel obtenu dans les vingt tubes de 100 génotypes étudiés, fait apparaître une forte présence de bandes correspondant au gène de gliadine, c'est le produit à 770pb (taille du gène de gliadine). Ceci indique que les 100 génotypes pourvus de ce gène (Tableau 2, Figure 3). Globalement, l'abondance élevée de gène de gliadine est très marqué dans les tubes 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 comparativement à la faible abondance dans les tubes 3, 4, 10, 13, 19, alors que les tubes 14, 15, 16, 17, 18 sont plus abondants en ce gène et plus particulièrement dans le tube numéro 20.

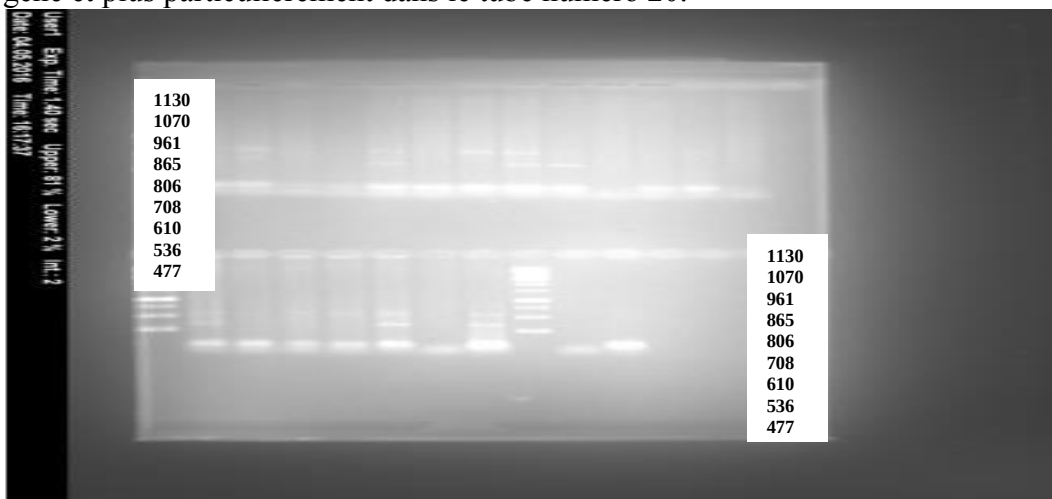


Figure 3 : Gène de gliadine

Analyse phylogénétique et d'expression des gènes

Au total, 99 séquences de gène de gliadine avec leurs régions promotrices sont obtenues. Après élimination de 30 séquences redondantes, on aura 69 séquences dont 7 sont de pseudogènes avec un codon stop prématuré et 62 étaient intacts avec une séquence de codage complète.

L'analyse phylogénétique a été effectuée en utilisant ces séquences, et les gènes de gliadine ont été classés en onze groupes et nommés selon les noms des variétés (Kawaura *et al.*, 2005). La répartition de ces gènes en fonction des lots de génotypes étudiés (Tableau. 2), est la suivante: Le lot 4 et 7 appartient à la variété alexandrium, le lot 10, 11, 18, 20 concerne la variété murcenese, alors que le lot 51 et 76 appartient à la variété valencia et finalement le lot 88, 91, 92 qui sont pour la variété italicum (Figure 4).

ALEX4 TGTCTCATGGTAATGAGTAAGATCAGTCTAAACCAC-----TC--CAATCTACATCAT
 ALEX8 -----GCGGGGGAGGATGCTCTGC-AATCG--TGGAG--AC--CCAACCG-CCCAAC
 MUR2 -----GCGAA-----ACATATATGATATACAA-----AGTTTATATCCCCC--
 MUR4 -----ACGCAGTATC-----ACTATCAGTATATTTACA-----AA--TATTAACCGCC--
 ITA25 CCGGGAACACTAGATAAGTATGAGCCATGATATAAACCCCACTCCCCCATCGCCAAAC--
 VOL4 -----GCGTACAGTTTTAG-----GCATCCGTAGAGCCAA-----ACTCAATACAGCCCAAA
 VOL32 -----GCGGA-----ACAAGGGTTATCTATG-----ACGGACACACGCCCAAA
 ITA23 -----CTT-----AGGTCTATTTTCATCTG-----GGCGACCAACGCCGCAAA

C CAGAGAAGTCTGCTCTCTCTATGA--CTACCGGCGA---AACTTATTACTCATATCTTGTA
 GCGGGCTTAAATGCTCCCGCTCA-----CTTGCAAGCA-----AACTTATTTTGAAGCGCTGTAT
 MUR2 -CGCTCTCT-TTCCCGCGCCCAATTTCCCTCTCCCAACCCCTTTTCAACAAAAC--
 MUR4 -CACTGCTTTGAGTCTCCCGCCCTTTTGCCCGCCCAAACTCCCTCTCTCAACAAACCACT
 ITA25 TTCCCTTTCTGATGCTCTCCCTCTCTGTCATCCCATTTCCGCACTATCGCACT-----
 VOL4 CTGCAATTTAGAGTTCAGTGCACCAATTCGAGC-CAAAAATCCATCTTTCTCAACAGCCAC
 VOL32 CTGCAAGTTAGAGTTCAGTGCACCAATTCGAGCCACAAAATCCATCTCAGCAACAGCCAC
 ITA23 CTGCAAGTTAGAGTTCAGTGCACCAATTCGAGCCACAAAATCCATCTCAGCAACAGCCAC

TACTGCTTTTTCT-----AAGGCGATAACTACTGGT-AACAACATCTATTACCA
 CCGAATAATTTCT-----TAAGCTTTTTTGTGTT-AATAACTATGATGATTAAC
 MUR2 CACAGCCATCCCCATTTTCTCAGCCCTGTTTTCTTTCTTCTCTCCCTTACCCTCTCTC
 MUR4 AAGAGCTACTTCCATTTTCTTCCACACAAGAATTTCTGCTGCTCT-CACCCCTTCTCT
 ITA25 CTACCAAGCTCTCATCTCTAGCCATCGCGTTGTTCTTTTCTTCTTCTCCCATATCT---
 VOL4 ACCAGCAAGTCCCATTTGGTGTCAACCAACCAAAATTTCTGGTGTCTACAACCTTTTCTAC
 VOL32 AAGAGCAAGTCCCATTTGTTACAACAACAACAATTTCTAGGGCAGCAACAACCATTTCCAC
 ITA23 AAGAGCAAGTCCCATTTGGTACAACAACAACAATTTCTAGGGCAGCAACAACCATTTCCAC

CGCTTTTATCTCAAACCTCAAGTGATGACCTTCTAACATCG-TAGTGCATGTT-TCCCTCT
 AGCTTTATTTGAAAGCTGAAGTGATGATCTTTTAAACATGTATGGCATGTTTCCACCAT
 MUR2 TCTCTTTT---ATTTTTTTTCTTATGCTTTTTTCTTTCTCTCTCATTTTTTTTTTTT
 MUR4 CCGCTTTTT---CTTTTTCTGGTGATGATCTTTT-TTCTTTCTCTTCTTATTTTGTCTTCT
 ITA25 -CCTTTCC---CAATTTCCGCGCGCTCTCCCTTTTCCGCGCGCTCTCATATCTCTCTGTT
 VOL4 CACTACTT-CAATTTCCAGAGCTCTCTCTTTTCTCATCTCTTAACTTTTCTTCTCT
 VOL32 CACAACAA---CCATATCCGAGCGCGCAACCATTTTCATCACAACAACCATATCTGAGC
 ITA23 CACAACAA---CCATATCCAGCGCGCAACCATTTTCATCACAACAACCATATCTGAGC

ATTTAAATATCCCTAAAA-----AAATAATGTGCTGCTACGTACATCT
 ALEX8 ATTTAAATATCCTAAAA-----AAA-TAATGTGTGTGTACGTCAAAATG
 MUR2 CTCTCCCTTTTCCAGCA-----CGGCTTCTGTTTGTGTTTCTCTCCCTTTT
 MUR4 GTTCCCTTTTCCCGAGCC-----AACTTCTTTT-TTTTTCTCTCCCTTT
 ITA25 -TTTTCTCTCCAGGAGTACTACCTCTGCACTTTCTTTCTCTCTCTCCCTCTTT
 VOL4 TGATCTCATTTATTAACG-----CGTACCTTCTTTCTCTATCGCCCACTCTTT
 VOL32 GCAACCATTTCCGAG-C-----CGCAACTATTATTCGAGCGCAACCATTT
 ITA23 GCAACCATTTCCGAG-C-----CGCAACTACCATTTTCGAGGCCAACAACCATTT

CCTAATTTATTTTATTTGGGGGACATGCTCGCTCTTCTATTACCTAACCTCAACCCTT
 ALEX4 CAGAATTTATTTGATTGGGGGATATGATGGCTCTCCATATACCGAAGCTAAACCTT
 ALEX8 TATTTATTTGTTTATATACC-----ATTTTATTTATTTCTCTCTCTCTCTTT
 MUR2 TT-TTTTTGTTTATTT-----CCTTTATTTTTCTCTCTCT-TCCTTT
 ITA25 ATCATCTCTCTTTT-----CAGATACATTAACAGTATGATAGAT
 VOL4 CTCTCACTCTCTTTTT-----CACATACATTAACCGTATTTCTCTCC-
 VOL32 CACCACAACAACCATATC-----CACAACAGCAACCAAGATTTGCAACC-
 ITA23 GACCAACAACAACCATATC-----CACAACGCAACCAAGATTTGCAACC-

CGATCACCCACGAACGATGCCCCCAGCGGGCACCCTTCCATACCCCCCCC-TCTCCA
 ALEX4 TGATACCCGATGAAGCATGGGTAGAGTGGGACCTTCCAATACCCCCCACA-TCATCA
 ALEX8 GCGCTCTCTTTTTT---TT-TTCTCTATAAAACGTTTTTCCCCCAACTCTTTTTT
 MUR2 CCGCTCTCTATTTT---TTTTTCTCAGAAAAAGCAATCCCCCTCAACCCTTTTGTG
 ITA25 TAGTCTCTCTCTCTCTCTTTTCAACAACCTTTCAGGTCACACCCCAACACT-CTTCTC
 VOL4 TCTTCAACCCTCCCC---TTTCAACCCCCCCCACTTCTCCCCCAAC--TC-TCCTGA
 VOL32 ACAACAACCCCTTT---TTCAAGCAGCAGCAGCATCAACAACAACAACA-ACAACA
 ITA23 ACAACAACCAATTT---CACAGCAGCAGCAGCAACAACAACAACAACA-ACAACA

CTATGTGCTGTTGCTT-----TCTCCCACTTTTCTACTCTACCCCTCTCTTCT-TCT
 ALEX4 CTATGTGCTGTTGCTT-----TGATAATAAATTTATGTCACTGTGAGAACATATG-TTAT
 ALEX8 CTCTTGCTCTTTTTTTTTTCTCTCTCTTTTCTTTTCACTATTAACATAATTTATTTATCA
 MUR2 CCGCTT-CAGCTGTTTCTTTCTCTCTCTCTTTTCTTCTTCAAAAAAATAAG-AGCA
 ITA25 CTCTTACTCTTTTGT---ACAATTAATTTCCCTTGAATCTTACGAGTTTAA-AGCT
 VOL4 CCGCTTCTTCTCATCTCC---TCATTAATTTCCCTTTTCCCATCTCTACATAAGAT-TGT
 VOL32 CCCCTACTACTACTAC---TCCACAATAATACCTTGTCTCCACTCTCAACAGTAA-TAC
 ITA23 CAACAACAACAACAAC---AACAACAACACTCAACTTTCAACTACAGCAACCTTAT-TGT

A--TTATCTCTTTTTTATCATCTACGCAAGTACTACCAATTAATACATTTTATCATCA
 ALEX4 AGATTACCTTTCGATTTGATATCACAGAAAGTAAAGAACAGGAAACCGTTTCCCACT
 ALEX8 GAAGTTACA-G--TGTTTTTGTATGCGGGGTTTTCTTTCT
 MUR2 GGAAGTAAAAA---ATTAGTAGTAAAGAAAGTAGGGGG
 MUR4 AAGGAGACAAGT-----AAAGGATTAGGGAGTA
 ITA25 AGCATTACAAGT-TTATTAT-TTGTGAAG-----
 VOL4 A--CA-----ATACGCGAATTTACCAATTA-----
 VOL32 GGGGGAATAACT---TGATTTATTTAATAGTAAATTTCAACTTTTA
 ITA23

```

ALEX4      GCCCTTCTTAATTTTCTCTTTTCCCT-----
ALEX8      GCCATAGTAAATTTGTGAATTTACGAGTAGCTTTTATTTCTGAGACAAATTTTTTTTT
MUR2      -----ACCTGAATTTTCTTTTCTGT--A-TCTCCTC---TACTCTTTCT--
MUR4      -----TTGAGGGATTTTACGTTTGT--A-GAGAGGT---GGAAGTTATCG--
ITA25      -----ATAGGGCCTATTGGGGGGGGGGGAATGGAAGCGGAGGAATTTAAAGAT
VOL4      -----AATGGGATGATTGAGTGGGTGTTAA-GTAAAGT---GCTATTAATAACT
VOL32      -----TACCAACACGCCTATCGCGATAACGAGAAAACAACCC---TTCTATTACATAT
ITA23      -----TTAAATACGCCAATAAAGTAAAT-----ATAAAAT---ATTATTAACATCT
          *

ALEX4      -----
ALEX8      TTGTTGTTATTATTAGTGATTATCTTAATGTTTTCTTTAAAA
MUR2      ACCCCCC-----AATGG-----
MUR4      CGGTAGG-----GCGGG-----
ITA25      ACGGAGGGTCC-----GCGAGT-----
VOL4      GAGCAGCTAGGGGCAATGG-----
VOL32      AATGGGCGGCCCGATATTA-----
ITA23      CTTTTTAAAGAATTTTTAGT-----

```

Figure 4. Analyse d'expression des gènes

Caractérisation de fragments de gènes de glutenine et gliadine : Abondance en guanine et cytosine (GC)

La caractérisation par amorce de fragments de gènes de glutenine est non significative à cause de l'absence totale de la sous unité (HPM) de ce gène, ainsi la faible abondance de la sous unité (FPM) de ce même gène, mais elle est significative pour le gène de gliadine (Tableau 7, figure 5). En effet, pour la variété alexandrium, le lot 4 contient 41.37% de GC (alex4) et 69.04% (alex8); le lot 7 contient 44.44% de GC (alex4) et 48.27% de GC (alex8). Alors que pour la variété murcenese, le lot 10 contient 48.33% de GC (mur2) et 47.45% de GC (mur4), alors que pour le lot 11, il contient 21.05% de GC (mur2) et 26.31% de GC (mur4); le lot 18 contient 45.83% de GC (mur2) et 40.42% de GC (mur4) et le lot 20 contient 24.44% de GC (mur2) et 20.93% de GC (mur4). Quand à la variété italicum, le lot 51 contient 38.59% de GC (ita23) et 49.15% de GC (ita25), le lot 76 contient 33.92% de GC (ita23) et 33.92% de GC (ita25) également. Cependant pour la variété valencia, le lot 88 contient 25% de GC (val4) et 30.76% de GC (val32), le lot 91 contient 33.33% de GC (val4) et 40% de GC (val32) alors que le lot 92 contient 63.15% de GC (val4) et 52.62% de GC (val32) (Tableau. 7).

Tableau 7. Taux de (GC %) de différents génotypes étudiés

Var	lot	Gén	GC%	var	lot	Gén	GC%	var	lot	Gén	GC%	var	lot	Gén	GC%
alex	4	alex 4	41.37	mur	10	mur 2	48.33	ita	51	ita23	38.59	vale	88	val4	25
						mur 4	47.45			ita25	49.15			val32	30.76
	8	alex 8	69.04		11	mur 2	21.05		76	ita23	33.92		91	val4	33.33
						mur 4	26.31			ita25	33.92			val32	40
	7	alex 4	44.44		18	mur 2	45.83						92	val4	63.15

						mur 4	40.42							val32	52.62
		alex 8	48.27		20	mur 2	24.44								
						mur 4	20.93								
Moy			50.78	Moy			34.34	Moy			38.89	Moy			40.81

Var = variété, **Gén** = génotype, **GC %** = pourcentage de Guanine et de Cytosine, **alex** = alexandrium, **mur** = murcenèse, **ita** = italicum, **val** = valencia, **Moy** = Moyenne

Similarité de Séquences de gène de gliadine

Les différentes variétés étudiées sont classés en 3 groupes sur la base de l'analyse de séquences de gène de gliadine matérialisé par le taux de (GC) et la matrice de l'identité et la distance génétique. Selon l'arbre phylogénétique établi (Figure 6), le premier groupe comporte la variété alexandrium (alex), alors que le deuxième groupe englobe la variété murcenese (mur) tandis que le troisième groupe renferme la variété valencia (vale). Il est à signaler que la variété italicum (38.89, GC) se positionne entre la variété valencia (40.81%, GC) et la variété murcenese (34.34%, GC) (Figure 5).

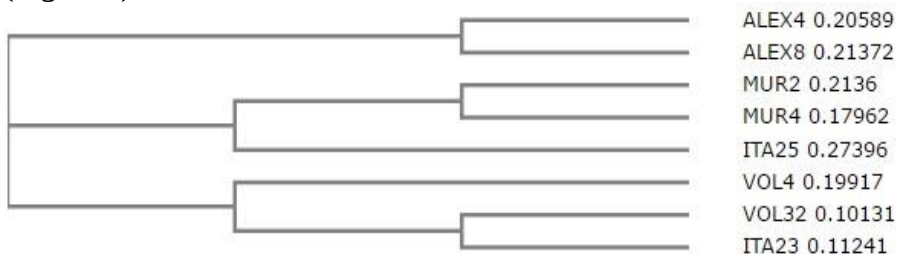


Figure 5 : Analyse phylogénétique des variétés étudiées.

Conclusion

A travers cette étude, il en résulte que la variété alexandrium (alex) dispose d'une forte stabilité génétique matérialisé par un taux plus élevé de (GC), allant jusqu'à 50.78%, ce qui lui confère une plus grande stabilité de son génome et par conséquent, elle ne va pas aboutir à avoir une diversité et/ou polymorphisme de protéines de réserve et plus particulièrement le gliadine. Cependant, la variété murcenese (mur) s'est avéré la plus divergente avec un taux de (GC) autour de 34.34%. Alors que la variété valencia (vale) et italicum (ita) sont moyennement stable du point de vue génétique avec un taux de (GC) atteignant 40.81% et 38.89% respectivement et par conséquent, elles ménagent une diversité ou un polymorphisme dans leur protéines de réserves et plus particulièrement la gliadine.

Les résultats obtenus montrent que la diversité génétique chez le blé dur (*Triticum turgidum* L. var *durum*) peut être déterminée par l'utilisation des marqueurs moléculaires pouvant ainsi amener à une variation entre les variétés étudiées, et par conséquent l'information retenue pourrait être utile pour les sélectionneurs de génotypes de blé pour augmenter la variation génétique. En outre, l'utilisation efficace des ressources génétiques dans tous les programmes de sélection et amélioration des plantes nécessite auparavant des connaissances approfondies concernant la diversité génétique par le biais d'autres types de marquage moléculaire.

References:

1. Aguiriano E., Ruiz M., Fité R., Carrillo J. M. (2006). Analysis of genetic variability in a sample of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Spanish collection based on gliadin markers. *Gen Res and Crop Evolution*, 53(8): 1543-1552.
2. Annichiarico P., Bellah F., Chiari T. (2006). Repeatable genotype x location interaction and its exploitation by conventional GIS-based cultivar recommendation for durum wheat in Algeria. *Europ. J.Agronomy.*, 24:70 - 81.
3. Ahmed Abdel-Mawgood, L. (2008). Molecular markers for predicting end-products quality of wheat (*Triticum aestivum* L.). *African journal of biotechnology* 7 (14), pp 2324-2327.
4. Al Khanjari S., Filatenko A. A., Hammer K., Buerkert A. (2008). Morphological spike diversity of Omani wheat. *Gen Res and Crop Evolution*, 55(8), 1185-1195.
5. Amallah L., Hassikou R., Rhrib K., Gaboun, F., Ennadir J., Bouazza F., Taghouti, M. (2016). Analyse de la diversité génétique d'une collection de blé dur par les marqueurs agro-morphologiques et biochimiques. *J. Mater. Env.Sci.*, 7(7):2435-2444.
6. Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. & Bonhomme, F. (2004). GENETIX, V.4.05 logiciel sous Windows pour la génétique des variétés. Laboratoire de génome, variétés et interactions CNRS UMR 5000, *Univ Montpellier II*, Montpellier.
7. Boudour, L., Djekoun, A., Ghribi, D., Olmi A. (2004). Morphology diversity of Algerian durum wheat variété. *Arab.Univ. J. Sci*, 12(2), 597- 608.
8. Boudour, L. (2006). Étude des ressources phytogénétiques du blé dur (*Triticum durum* Desf.) Algérien : Analyse de la diversité génétique et des critères d'adaptation au milieu. Thèse Doctorat d'Etat. *Université Mentouri Constantine*, 142p.
9. Benbelkacem, A. (2013). Rapport national des activités du projet : *INRA-ICARDA*, 2012/2013: 45p.

10. Doyle J. J., Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
11. F. A. O. (2015). Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture : Perspectives de récolte et situation alimentaire 2015. In, FAO, La carte FAO, 16p. <http://www.fao.org/giews/english/listserv.htm> (consultée mars 2015).
12. F. A. O. (2016). Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture : Perspectives de récolte et situation alimentaire 2016. In, FAO, La carte FAO, 6p. <http://www.fao.org> (consulter Mars 2016).
13. Gooding, M. J. (2009). The wheat crop. In: Wheat chemistry and technology, Khan, K., Shewry P. R, eds. St. Paul, MN: AACC *International*, 19-38.
14. Gallais, A. (2015). Comprendre l'amélioration des plantes. Enjeux, méthodes, objectifs et critères de sélection. *Eds Quae*, 240p.
15. Hervieu, B., Capone, R., Abis, S. (2006). The challenge posed by the cereals sector in the Mediterranean. *Ciheam analytical note*, (9): 14 p.
16. Kawaura, K., Mochida, K., Ogihara, Y. (2005). Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol* 139:1870-1880.
17. Noma, S., Kawaura, K., Hayakawa, K., Abe, C., Tsuge, N., Ogihara, Y. (2016). Comprehensive molecular characterization of the α/β -gliadin multigenes family in hexaploid wheat. *Mol. Genet. Genomics* 291: 65-77.
18. Slama A., Ben Salem M., Zid E. (2005). Les céréales en Tunisie: Production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Science et changements planétaires / Sécheresse*, 16(3) :225-229.
19. Stephenson, T. J., McIntyre, C. L., Collet, C., Xue, G. P. (2007). Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family of transcription factors in *Triticum aestivum*. *Plant Mol. Biol.* 65: 77- 92.
20. Sanchez-Garcia, M., Álvaro, F., Martín-Sánchez, J. A., Sillero, J. C., Escribano, J., Royo C. (2012). Breeding effects on the genotype x environment interaction for yield of bread wheat grown in Spain during the 20th Century. *Field Crops Research*, 126:79-86.
21. Tamura, K., Nei, M., Peterson, D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
22. Marchenay, P. (1987). À la recherche des variétés locales de plantes cultivées : Guide méthodologique. Paris, *Page Paca*, 125 p.

23. Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
24. Williams, J. J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphism amplified arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535
25. Yadav, S. S., Redden, R. J., Hatfield, J. L., Lotze-Campen, H., Hall, A. E. (2011). Crop adaptation to climate change, eds. Oxford, *Blackwell*, 595 p.
26. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2): 176–183.
27. Zeven, A. C. (1998). Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica* 104(2): 127-139.