



## REPUBLIQUE TUNISIENNE

\*\*\*

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur et de la Recherche  
Scientifique

\*\*\*

Université de Carthage

\*\*\*

Faculté des Sciences de Bizerte



### THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Discipline : **Sciences Biologiques**

## STRUCTURATION DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET ÉTUDE D'ASSOCIATION PAN-GÉNOMIQUE DES CAROTÉNOÏDES UTILISANT LA TECHNOLOGIE DARTSEQ CHEZ LES POPULATIONS LOCALES DE BLÉ DUR TUNISIEN

Présentée par: **Cyrine Robbana**

Soutenue publiquement le .../.../..., devant le Jury composé de :

Mr..... : Président

Mr. M'barek Ben Naceur : Directeur de Thèse

Mr. Ahmed Amri : Co encadreur de Thèse

Mr..... : Rapporteur

Mr..... : Rapporteur

Mr..... : Examineur

FSB 2018 / 2019

## Résumé

L'exploitation de la richesse allélique des populations locales de blé dur, qui sont bien adaptées à leur environnement d'origine, dans les programmes d'amélioration génétique est devenue une nécessité, pour faire face au changement climatique et pour répondre aux exigences du marché pour une bonne qualité de la semoule, particulièrement sur le plan richesse en caroténoïdes (pigments jaunes).

Dans cette optique, les objectifs de cette thèse consistent à i) étudier pour la première fois la diversité génétique et la structure de la population de 196 lignées issues de six populations locales tunisiennes utilisant une nouvelle technologie de génotypage à très haut débit (DARTseq), ii) à évaluer le potentiel de ce germoplasme pour la richesse en caroténoïdes dans le grain, en investiguant les effets génétiques, environnementaux et interaction génotype\*environnement dans les conditions climatiques tunisiennes et ii) à identifier chez ces populations locales des QTL associés à la teneur en caroténoïdes moyennant l'étude d'association pan-génomique (GWAS).

La technologie DARTseq utilisée pour génotypager les 196 lignées, moyennant 16 148 marqueurs DART polymorphes et informatifs, qui couvraient la totalité des génomes A et B, a montré une performance élevée. L'analyse de la structure de la population avec l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC) a permis de distinguer cinq groupes avec les populations Mahmoudi et Biskri qui forment le même pool génétique, alors que la population Jenah Zarzoura qui constitue le groupe le plus distant. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a montré que la variation génétique était entre les populations locales plutôt qu'à l'intérieur de celles-ci. La DAPC des populations locales tunisiennes, méditerranéennes et de l'ouest de l'Asie a montré une similitude génétique entre les populations locales tunisiennes et nord-africaines, à l'exception de la population Jenah Zarzoura qui reste toujours la plus éloignée.

Les analyses de caroténoïdes ont montré que les populations locales tunisiennes possèdent une grande variabilité pour la teneur totale en caroténoïdes (TCC) et pour l'indice du jaune (IJ). La comparaison des moyennes de l'indice du pigment jaune dans six environnements et de la teneur totale en caroténoïdes dans deux environnements a montré que certaines populations locales présentent d'une part des teneurs en caroténoïdes plus élevées que les variétés améliorées tunisiennes et d'autre part certaines lignées issues des populations

Jenah Khotifa ont des teneurs plus élevées que le meilleur témoin des lignées élites de l'ICARDA. L'héritabilité attendue H<sup>2</sup> de l'indice du jaune et de la teneur totale en caroténoïdes dans tous les environnements est très élevée, allant de 0,72 à 0,95 et de 0,89 à 0,95, respectivement. Cette étude a pu montrer un effet génotype prédominant et une interaction environnement\*génotype minime pour l'indice du pigment jaune. L'analyse de régression pas à pas a révélé que les composantes de rendement contribuent plus à l'augmentation de l'indice du pigment jaune, et plus particulièrement le rendement en grains ( $R^2 = 0.33$ , au seuil de signification 5%) a un effet direct et positif sur ce trait en utilisant l'analyse «path».

L'étude d'association pan-génomique utilisant la technologie DArTseq chez la collection tunisienne de blé dur étudiée a permis d'identifier 29 QTL significativement associés à l'indice du jaune évalué dans six environnements, et 12 QTL significativement associés à la teneur totale des caroténoïdes évaluée dans deux environnements.

Dans cette thèse, nous avons démontré que les populations locales Tunisiennes possèdent un potentiel pour la richesse en caroténoïdes dans tous les environnements, qui pourrait être utilisées dans des programmes d'amélioration génétique, ainsi que nous avons identifié de QTL stables pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes, qui pourront être utilisées dans la sélection assistée par marqueurs «Marker assisted selection ou MAS» pour les teneurs élevées en caroténoïdes dans les conditions environnementales Tunisiennes.

**Mots clés:** Populations locales; blé dur; DArTseq; Diversité génétique; structure de la population; caroténoïdes; GWAS; QTL.

## Publications et communications

### Publication

1/ Robbana, C.; Kehel, Z.; Ben Naceur, M.; Sansaloni, C.; Bassi, F.; Amri, A. **Genome-Wide Genetic Diversity and Population Structure of Tunisian Durum Wheat Landraces Based on DArTseq Technology.** *International Journal of Molecular Sciences*.2019, 20, 1352. (Impact factor selon Thomson Reuters = 3.687).

### Communications orales ou par posters

1/ Robbana, C; Amri, A; Tselikas, A. & Ben Naceur, M. **Performance of Tunisian durum wheat landraces and improved varieties under drought.** Conférence Scientifique Internationale sur l'Environnement et l'Agriculture, Hammamet - Tunisie, 24-25 Avril 2017. (Communication par poster).

2/ Robbana, C; Ben Naceur, M., Kehel, Z.; Ammar, K.; Guzman, C. & Amri, A. **Assessment Of Some Quality And Yield Components Traits In Old And Modern Tunisian Durum Wheat Varieties Under Rainfed Condition.** International conference "FROM SEED TO PASTA III, A SUSTAINABLE DURUM WHEAT CHAIN FOR FOOD SECURITY AND HEALTHY LIVES", Bologna - Italy, 19-21 September 2018. (Communication par poster).

3/ Robbana, C; Jabri C; Amri A. and M'barek Ben Naceur. **Genetic variability based on spike morphological characterization of Tunisian durum wheat landraces.** Les Journées Internationales de Biotechnologie (JIB 2018). Sousse – Tunisie, 20-23 Décembre 2018. (Communication par poster).

4/ Amri, A; Robbana, C; Kehel, Z and Bassi, F. **Importance of genotyping in efficient conservation and use of genetic resources.** International Seminar «Genome And Wheat Sequencing». Constantine - Algérie, 28-29 Janvier 2019. (Communication orale).

## Table des matières

Résumé.....	I
Publications et communications .....	III
Publication.....	III
Communications orales ou par posters.....	III
Introduction générale.....	1
CHAPITRE 1: Synthèse bibliographique .....	6
I. Taxonomie du blé dur .....	7
II. Origine du blé dur.....	8
III. Domestication, évolution et génétique du blé dur .....	9
IV. Types des ressources génétiques du blé dur.....	12
1. Population locale ou variété ancienne.....	12
2. Variété améliorée ou moderne .....	12
3. Lignée pure .....	13
V. Histoire du blé dur en Tunisie .....	13
VI. Importance économique du blé dur .....	15
1. A l'échelle mondiale .....	15
2. A l'échelle nationale .....	16
VII. Eco physiologie du blé dur .....	16
1. Morphologie du blé dur .....	16
2. L'appareil végétatif.....	16
3. L'appareil reproducteur .....	16
a. L'épi .....	16
b. Le grain du blé dur.....	17
4. Cycle de développement.....	18
a. Période végétative: .....	19
b. Phase reproductive.....	20
c. Période de maturation du grain .....	20
1. Exigences de croissance du blé dur .....	21
a. Exigences édaphiques : .....	21
b. Exigences climatiques.....	21
VIII. Etude de la diversité génétique.....	22
1. Moyens d'étude de la diversité génétiques .....	23
a. Marqueurs morphologiques.....	23

b.	Marqueurs biochimiques .....	26
c.	Marqueurs moléculaires .....	26
IX.	Evaluation des caroténoïdes chez le blé dur .....	33
a.	Définition et propriétés des caroténoïdes .....	33
b.	Voie de biosynthèse des caroténoïdes.....	34
c.	Importance des caroténoïdes.....	35
d.	Les pigments jaunes chez le blé dur .....	37
e.	Evaluation de la teneur en pigment jaune .....	37
X.	Contrôle génétique de la teneur en pigment jaune .....	38
XI.	Effet des conditions environnementales sur la teneur en pigments jaunes.....	40
XII.	Etude d'association pan- génomique (GWAS) .....	41
1.	Résolution de la cartographie d'association .....	42
2.	Facteurs affectant le déséquilibre de liaison (DL) .....	44
3.	Structure de la population.....	45
XIII.	Association pan génomique pour la teneur en pigment jaune.....	45
	CHAPITRE 2: Matériels et méthodes .....	47
I.	Matériel végétal .....	48
II.	Site et Dispositif expérimental .....	51
III.	Conduite de l'essai .....	52
IV.	Gestion de l'irrigation des essais à la station INGC de Chebika, Kairouan.....	53
V.	Caractérisation génotypique des populations locales de blé dur utilisant la méthode DArtseq™. 55	
1.	Extraction de l'ADN génomique .....	55
2.	Contrôle de qualité et de la quantité de l'ADN .....	56
3.	Génotypage utilisant la méthode DArTseq™.....	56
4.	Mesure de la diversité génétique.....	57
5.	Mesure de la différenciation entre les populations.....	58
6.	Structure de la population.....	59
VI.	Evaluation de différents caractères mesurés dans les champs des populations locales de blé dur 59	
1.	Caractères phénologiques.....	59
2.	Caractères physiologiques.....	60
a.	Taux de chlorophylle (Unité SPAD).....	60
b.	La fluorescence chlorophyllienne.....	60
3.	Caractères agro-morphologiques.....	60

a.	Surface foliaire (SF).....	60
b.	Hauteur de la plante (H).....	61
c.	Longueur des épis (LE).....	61
d.	Longueur des barbes (LB).....	61
e.	Nombre des épillets par épi (NEE) .....	61
f.	Taille des grains .....	61
g.	Nombre des épis par mètre carré (NS).....	61
h.	Nombre des grains par épi (NGE).....	61
i.	Poids des grains par épi (PGE) .....	62
j.	Rendement en grains (GY).....	62
k.	Poids de milles grains (TKW) .....	62
l.	Poids spécifique (TW) .....	62
VII.	Evaluation des caroténoïdes chez les populations locales de blé dur .....	62
1.	Mesure de l'indice du jaune de la semoule (valeur du b*) .....	62
2.	Mesure des caroténoïdes totaux contenus dans les grains (TCC).....	63
VIII.	Evaluation de quelques traits de qualité du grain chez les populations locales de blé dur .....	64
1.	Mesure de la teneur en protéines des grains (Gpr) .....	65
2.	Mesure de l'indice de sédimentation (SDS) .....	65
IX.	Analyse d'association pan-génomique.....	66
a.	Les graphiques Q-Q ou «Q-Q plot» .....	66
b.	Les graphiques Manhattan ou «Manhattan plot» .....	66
c.	Analyses statistiques .....	67
	Chapitre 3: Résultats et Discussions.....	68
I.	Diversité génétique et structure des populations locales de blé dur Tunisien .....	69
1.	Résumé .....	69
2.	Introduction.....	69
3.	Résultats .....	71
a.	Caractéristiques des marqueurs DArTseq.....	71
b.	Distance génétique et classification hiérarchique des populations locales Tunisiennes.....	73
c.	Structure des populations locales Tunisiennes .....	75
d.	Diversité génétique et distance génétique entre les populations locales Tunisiennes .....	79
e.	Classification des lignées mal classées aux variétés locales cultivées et /ou aux variétés cultivées améliorées ou / et aux lignées élites ICARDA / CIMMYT .....	81
f.	Comparaison des populations locales tunisiennes aux populations locales des régions de la Méditerranée et de l'Asie occidentale .....	83

4.	Discussion .....	84
a.	Polymorphisme des marqueurs DArTseq chez les populations locales de blé dur Tunisien	85
b.	Diversité génétique et structure de population de la collection de blé dur Tunisien.....	86
c.	Origine du blé dur Tunisien .....	88
II.	Evaluation des caroténoïdes chez les populations locales de blé dur dans des environnements contrastés.....	91
1.	Résumé .....	91
2.	Introduction.....	92
3.	Résultats .....	93
a.	Evaluation de l'indice du jaune (b*) de la semoule chez les lignées de blé dur local dans six environnements différents.....	93
b.	Evaluation de la teneur en caroténoïdes totaux (TCC) de la semoule chez les lignées locales de blé dur conduites en conditions pluviales.....	96
c.	Etude de l'interaction génotype*environnement pour l'indice du pigment jaune et de la teneur totale en caroténoïdes.....	98
d.	Etude des corrélations entre l'indice du pigment jaune et d'autres traits de qualité, physiologique et agro-morphologique dans les différents environnements.....	102
e.	Etude des corrélations entre la teneur totale en caroténoïdes et d'autres traits de qualité, physiologiques et agro-morphologiques dans les différents environnements.....	105
f.	Détermination des facteurs affectant l'indice du jaune (valeur du b*) et la teneur totale en caroténoïdes (TCC) .....	106
4.	Discussion et conclusion.....	108
III.	Association pan génomique pour la teneur en pigments jaunes.....	113
1.	Résumé .....	113
2.	Introduction.....	113
3.	Résultats .....	114
a.	Choix du model statistique pour l'étude pan-génomique pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes .....	114
b.	Méthode de visualisation des QTL détectés pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes.....	116
c.	QTL associés à l'indice du jaune et à la teneur totale en caroténoïdes .....	118
4.	Discussion .....	120
IV.	Conclusion générale et perspectives.....	123
V.	Références bibliographiques.....	125





## Listes des figures

- Figure 1.** Origine du blé dur et sa diffusion.
- Figure 2** Evolution des blés depuis l'ancêtre sauge diploïde jusqu'au blé dur et tendre moderne.
- Figure 3** Evolution de la morphologie de l'épi chez le blé.
- Figure 4** Production mondiale de blé dur; A: Evolution de la production mondiale de blé dur en millions de tonnes; B: Production mondiale de blé dur par région. Source: IGC, 2017.
- Figure 5** Morphologie de l'épi de blé dur.
- Figure 6:** Anatomie du grain du blé dur
- Figure 7:** Différentes composantes du rendement tout le long du cycle du développement du blé dur.
- Figure 8** Evolution des technologies des marqueurs moléculaires chez les plantes.
- Figure 9:** Structure de base des carotènes et des Xanthophylles.
- Figure 10:** Accumulation des caroténoïdes dans les différents Types de plastides chez les plantes.
- Figure 11:** Voie de biosynthèse des caroténoïdes.
- Figure 12:** Rôle des caroténoïdes dans la désactivation de l'état triplets des molécules de chlorophylle et de la neutralisation de l'oxygène singulet
- Figure 13** Étendue du déséquilibre de liaison chez le blé tendre et le blé dur.
- Figure 14** Matrice de déséquilibre de liaison hypothétique.
- Figure 15** Localisation géographique des populations locales de blé dur collectées dans l'Oasis de Mareth, le Centre et le Sud Tunisien (Ensemble 1).
- Figure 16** Variation des températures minimales, maximales et des précipitations à la station de l'INGC Chebika, Kairouan durant (A) La campagne agricole 2015-2016 et (B) La campagne agricole 2016-2017.
- Figure 17** Evolution du coefficient cultural (Kc) au cours du cycle de développement de la culture du blé dur.
- Figure 18** Courbe d'étalonnage de la lutéine  $\mu\text{g/g}$  en fonction de l'absorbance à

450 nm.

- Figure 19** Evaluation de la force du gluten chez le blé dur au laboratoire du CIMMYT, Mexique.
- Figure 20** Distribution des fréquences des (A) Allèles mineures MAF et (B) contenus des informations polymorphiques (PIC) utilisant 16148 marqueurs DArTseq chez une collection de 196 lignées issues des six populations locales de blé dur.
- Figure 21** Distribution de la distance des allèles partagés de 196 lignées pures dérivées de six populations locales Tunisiennes de blé dur utilisant des marqueurs DArTseq.
- Figure 22** Arbre de classification hiérarchique des 196 lignées dérivées des six populations locales Tunisiennes de blé dur basé sur la distance génétique des allèles partagés (ASD).
- Figure 23** Nombre optimal des sous-populations utilisant l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC). (A): Variance cumulative expliquée par les PCs; (B): BIC en fonction du nombre de clusters.
- Figure 24** Graphiques sous forme de tableaux comparant la distribution de la classification d'origine des populations locales aux sous-populations utilisant DAPC avec (A) K = 2; (B) K = 3; (C) K = 4; (D) K = 5; (E) K = 6 et (F) K = 7.
- Figure 25** Test de permutation d'AMOVA avec 1000 permutations pour le nombre de sous-populations K = 5.
- Figure 26** Dendrogramme des variétés locales de blé dur Tunisien, des variétés locales améliorées et des lignées élites ICARDA / CIMMYT basé sur la distance génétique des allèles partagées (ASD).
- Figure 27** Diagrammes sous forme de tableau comparant la classification des populations locales Méditerranéennes, Asiatiques et Tunisiennes aux sous-populations utilisant DAPC avec K = 12.
- Figure 28** Variation de l'indice du jaune (valeur du b) chez les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes de blé dur dans six environnements.
- Figure 29** Variation de la teneur totale des caroténoïdes chez les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes de blé dur dans le site de Mornag durant deux campagnes successives 2015-2016.
- Figure 30** «Heat map» des corrélations entre les environnements basé sur les

moyennes ajustées dans chaque environnement.

- Figure 31** Corrélations entre les différents traits de qualité, physiologiques et agromorphologiques.
- Figure 32** Corrélations entre la teneur totale des caroténoïdes, les traits physiologiques, agromorphologiques et les différents traits de qualité du grain.
- Figure 34** Graphique de la régression pas à pas des différents traits contribuant à augmenter l'indice du pigment jaune ( $b^*$ ) chez les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes.
- Figure 35** Diagramme «path» des différentes inter-relations des composantes du rendement avec l'indice du pigment jaune.
- Figure 36** Comparaison des graphiques quantile-quantile «Q-Q plot» des  $-\log$  (valeurs de  $p$ ) entre différents modèles de GWAS pour la teneur totale des caroténoïdes (moyenne de deux environnements) chez une collection de 196 lignées
- Figure 37** Diagramme de Manhattan ou «Manhattan plot» montrant les valeurs de  $p$  pour les marqueurs DArTseq associés à l'indice du pigment jaune.
- Figure 38** Diagramme de Manhattan ou «Manhattan plot» montrant les valeurs de  $p$  pour les marqueurs DArTseq associés à la teneur totale en caroténoïdes (TCC).

## Liste des tableaux

- Tableau 1.** Classification du genre *Triticum* selon Mac Key (2005).
- Tableau 2** Classification des populations locales de blé dur par Bœuf (1932).
- Tableau 3** Les différents stades de développement du blé dur.
- Tableau 4** Gènes et marqueurs moléculaires associés à la teneur en pigment jaunes sur les génomes A et B du blé.
- Tableau 5** Liste et taille des populations locales de blé dur Tunisien collectées dans et l’Oasis de Mareth, le Centre, et le Sud Tunisien (Ensemble 1).
- Tableau 6** Liste des populations locales de blé dur Tunisien, des variétés modernes Tunisiennes et des lignées hybrides de l’ICARDA/CIMMYT.
- Tableau 7** Nombre des accessions de populations locales de blé dur originaires de différentes régions de la Méditerranée et de l’Asie Centrale reçues de la banque de gène de l’ICARDA (Ensemble 3).
- Tableau 8** Apports des irrigations pour les deux essais installés à l’INGC Chébika Kairouan durant la campagne 2015-2016 avec un régime hydrique à 100% ETR et un régime hydrique à 25% ETR.
- Tableau 9** Apports des irrigations pour les deux essais installés à l’INGC Chébika Kairouan durant la campagne 2016-2017 avec un régime hydrique à 100% ETR et un régime hydrique à 25% ETR.
- Tableau 10** Classification des accessions en groupes en fonction de la teneur en pigments jaunes chez le blé dur.
- Tableau 11** Classification des accessions en groupes en fonction de la force de gluten chez le blé dur.
- Tableau 12** Nombre des marqueurs DArTseq sélectionnés (n), L’hétérozygotie observée ( $H_0$ ) et l’hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) dans les 14 chromosomes des 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes de blé dur basée sur la carte génétique consensus du blé tendre.
- Tableau 13** Résumé de l’AMOVA pour la comparaison entre différents nombres de sous-populations K et les groupes réels composés des six populations locales Tunisiennes de blé dur.

- Tableau 14** Résultats de l'AMOVA hiérarchique de  $K = 2$  à  $K = 5$  à l'aide de de subdivision en strates hiérarchisées chez les 196 lignées dérivées des six populations locales Tunisiennes de blé dur.
- Tableau 15** Distance génétique de Reynolds entre les populations locales Tunisiennes de blé dur sur la base du nombre de sous-populations  $K = 5$ .
- Tableau 16** Diversité génétique entre les populations locales Tunisiennes de blé dur en fonction du nombre de sous-populations  $K = 5$ .
- Tableau 17** Comparaison des moyennes de l'indice du jaune dans les six environnements.
- Tableau 18** Moyenne de l'indice du  $b^*$  des six environnements pour chaque sous-population.
- Tableau 19** Comparaison des moyennes de l'indice du jaune  $b^*$  à Mornag durant deux campagnes 2015 et 2016.
- Tableau 20** Indice du pigment jaune  $b^*$  dans chaque sous-population sur la base des moyennes ajustées des deux campagnes à Mornag.
- Tableau 21** Estimation de l'héritabilité étendue  $H^2$  pour l'indice du pigment jaune ( $b$ ), la teneur total des caroténoïdes (TCC) et d'autres traits agro morphologiques et de qualité.
- Tableau 22** Marqueurs DArtseq associés significativement à  $(-\log_{10}(p) \geq 3)$  avec l'indice du pigment jaune (moyenne des six environnements) en utilisant la GWAS avec le modèle (MLM + K + Q) chez une collection de 196 lignées issues des six populations locales.
- Tableau 23** Marqueurs DArtseq associés significativement à  $(-\log_{10}(p) \geq 3)$  avec la teneur totale des caroténoïdes (moyenne de deux environnements) en utilisant la GWAS avec le modèle (MLM + K + Q) chez une collection de 196 lignées issues des six populations locales.

## Liste des abréviations

a*	Indice du brun
ADN	«Deoxyribonucleic acid» ou Acide désoxyribonucléique
AMOVA	«Analysis of molecular variance» ou analyse de la variance moléculaire
AS	« Association study » ou étude d'association
ASD	«Allele sharing distance» ou distance des allèles partagés
b*	Indice du jaune ou indice du pigment jaune
BIC	«Baysian information content» ou critère d'information bayésien
BNGT	Banque Nationale des Gènes de Tunis
CIMMYT	«Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo»
CP	Composante principale
D	Distance
D'	Coefficient de déséquilibre de liaison normalisé
DAPC	«Discriminant analysis of principal components» ou analyse discriminante des composantes principales
DArTseq	«Diversity Array Technology sequencing»
DO	Densité optique
E-std	Erreur standard
ETR	Evapotranspiration réelle
GBS	«Genotyping by sequencing» ou génotypage par séquençage
GWAS	«Genome - wide association study» ou étude pan-génomique

GY	«Grain yield» ou rendement en grains
FDR	«False discovery rate»
FLA	«Flag leaf area» ou surface foliaire
F <sub>ST</sub>	«Fixation index» ou indice de fixation
H	«Hight» = Hauteur
H <sub>2</sub>	Héritabilité étendue
HD	«Heading date» = Date d'épiaison
He	Hétérozygotie exceptée
Ho	Hétérozygotie observée
ICARDA	«International Center for Agricultural Research in the Dry Areas»
ID	Identifiant de l'accession
IGC	«International Grain Council »
INGC	Institut National des Grandes Cultures
IPGRI	«International Plant Genetic Resources Institute»
IR	Mode irrigué
K	Nombre de populations
K <sub>c</sub>	Coefficient cultural
I*	Indice de vitrosité
LD	«Linkage disequilibrium» ou déséquilibre de liaison
MAF	«Minor allele frequency» ou fréquence des allèles mineurs
NEE	Nombre d'épillets / épi
NGE	Nombre de grains / épi
NIL	«Near isogenic lines»
NIRS	«Near infrared spectroscopy ou spectroscopie proche infrarouge»
NS	«Number of spikes / m <sup>2</sup> » ou nombre d'épis / m <sup>2</sup>
MD	«Maturity date» ou date de maturité
MLB	Longueur de la barbe



MLE	Longueur de l'épi
MLM	«Mixed linear model» ou modèle linéaire mixte
PAV	«Presence / Absence of variability» ou présence ou absence de variabilité
PC	«Principal component» ou composante principale
PCR	«Polymerase Chain Reaction» ou réaction de polymérisation en chaîne
PIC	«Polymorphic information content» ou contenu des informations polymorphiques
QTL	«Quantitative trait loci» ou locus de caractères quantitatifs
Q-Q	Quantile-quantile
R	«Package for statistical analysis» ou package pour des analyses statistiques
r	Coefficient de corrélation de Pearson
R <sup>2</sup>	Coefficient de corrélation entre deux locus
RIL	«Recombinant inbred lines»
SA	«Seed area» ou superficie des semences
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SL	«Seed length» ou longueur de la semence
SNP	«Single nucleotide polymorphisms»
SPAD	Indice de chlorophylle
STR	Mode stressé
SW	«Seed width» ou largeur de la semence
TCC	Teneur totale en caroténoïdes
TFT	«Total fertile tillers» ou talles fertiles totales
TT	«Total tillers» ou talles totales
TKW	«Thousand kernel weight» ou poids de milles grains
UV	Ultra - violet

## Unités de mesure

°C	Microgramme / gramme de matière sèche
cm	Centimètre
cM	Centimorgan
g	gramme
j	Jour
h	Heure
Kg / ha	Kilogramme / hectar
mA	Milliampère
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
pb	Paire de base
rpm	Tour / minute
s	Seconde
µg	Microgramme

## Introduction générale

Le blé dur est parmi les cultures les plus importantes au monde. Il est cultivé sur environ 13 millions d'hectares avec une production aux alentours de 39,1 Mt en 2017 (Conseil international des grains, Grain Market Reports, 2017). Il est principalement cultivé dans les pays riverains du bassin méditerranéen et sa culture s'est étendue à l'Inde, au Mexique, à l'Amérique du Nord et à la Russie (Gioia et al., 2015; Bonjean et al., 2016). L'Afrique du Nord cultive environ 2,5 millions d'hectares de blé dur, dont environ 1 million d'hectares en Tunisie. Il est principalement utilisé pour la production des pâtes et d'autres produits alimentaires dérivés.

Les populations locales sont toujours cultivées selon les systèmes agricoles traditionnels et sont très appréciées pour les plats locaux tels que le frikeh, burghul, couscous, mais leurs superficies sont considérablement réduites avec l'adoption massive de nouveaux cultivars commercialisés depuis les années 1970 (Daaloul et al., 1998; Deghais et al., 2007).

Le blé dur est une céréale allo tétraploïde autogame ( $2n = 4x = 28$ , AABB) provenant d'un croisement entre *Aegilops speltoides* (SS) et *Triticum urartu* (AA). Cette céréale a été domestiquée à partir de blé primitif (*Triticum turgidum* ssp *dicoccum*) dans le croissant fertile il y a environ 10000 ans (Salamini et al., 2002; Dvorak and Akhunov 2005; Feldman and Kislev 2007; Matsuoka 2011; Zohary et al., 2012). Les régions de l'Abyssinie et de l'Afrique du Nord sont considérées parmi les centres secondaires de diversité pour le blé dur (Vavilov 1951). La Tunisie, qui fait partie du centre secondaire de la diversité du blé dur, possède une riche diversité en termes de populations locales et d'espèces sauvages apparentées (Boeuf 1932; Lala, et al. 2018).

Les variétés locales de blé dur sont considérées comme un matériel génétique parental précieux pour les programmes d'amélioration du blé dans le monde entier. La base des données Genesys (<http://www.genesys-pgr.org>) contient 60 488 accessions de blé dur, dont 22 600 sont des populations locales. La banque de gènes du Centre International de Recherche Agricole dans les Zones Arides (ICARDA) détient l'une des plus grandes collections de blé dur, avec plus de 20 531 acquisitions, dont plus de 65% sont des populations locales. La banque Nationale de Gènes Tunisienne (NGBT) détient un total de 4 000 accessions de blé dur, dont la plupart sont des lignées pures issues des populations locales collectées.

Les populations locales ou «landraces» Tunisiennes sont bien adaptées à un large éventail d'environnements, ils sont génétiquement diverses, et ils sont considérées comme un

important réservoir de gènes utiles pouvant être exploités dans les programmes de sélection du blé (Daaloul et al., 1998; Khoufi et al., 2012; Lopes et al., 2015).

Une grande diversité génétique de blé dur Tunisien local a été rapportée en utilisant les caractères morphologiques, agronomiques, physiologiques et biochimiques (Deghais et al., 2007; Sourour et al., 2010). Sourour et Hajer, (2008) ont montré une diversité phénotypique importante du matériel génétique Tunisien estimée à 0,77 en utilisant les indices de Shannon-Weaver (Sourour and Hajer, 2008). Plusieurs techniques de marqueurs moléculaires ont été utilisées pour évaluer la diversité génétique chez le blé, depuis les RFLP, les RAPD, les ISSR, les AFLP, les EST – SSR (Ya et al., 2017), les DArT jusqu'aux SNP (Khan et al., 2014; Sohail et al., 2015). Toutefois, la caractérisation moléculaire des populations locales Tunisiennes est rare bien que Medini et al., (2005) ont signalé une diversité génétique élevée entre 33 cultivars Tunisiens anciens utilisant 15 marqueurs SSR (Medini et al., 2005).

Actuellement des progrès énormes en génomique ont été enregistrés grâce à la construction d'une carte génétique consensus à haute densité basée sur les SNP et au développement de plusieurs plateformes de séquençage de prochaine génération (NGS) (Borrill et al., 2015; Maccaferri et al., 2015). La méthode de génotypage «Axiom 35K array» a été utilisée pour génotyper un panel de 370 entrées de blé dur et a permis de différencier entre les variétés améliorées et les populations locales et de montrer que l'Éthiopie et le Moyen-Orient possèdent le niveau de diversité allélique le plus faible par rapport aux autres régions (Kabbaj et al., 2017). De nombreuses études ont montré que le génotypage par séquençage (GBS) était de plus en plus adopté comme une technique moléculaire rapide et peu coûteuse permettant i) la couverture des marqueurs essentiellement de type SNP ou DArT sur le génome entier (Holtz et al., 2016), ii) la découverte des SNP, et iii) le génotypage et l'analyse de la variabilité génétique chez différentes espèces cultivées, y compris les populations locales blé dur (He et al., 2014; Alipour et al., 2017; Sieber et al., 2017). La technologie DArTseq™ a été appliquée avec succès pour les espèces ayant de grands génomes tels que l'orge (Wenzl et al., 2004) et des génomes polyploïdes ou / et complexes tels que le blé tétraploïde et hexaploïde (Akbari et al., 2006; Sohail et al., 2015). L'approche DArTseq™ basée sur le séquençage avec une lecture rapide utilisant Illumina s'est révélée efficace pour étudier la diversité génétique des populations locales de blé dur syrien et turque (Sansaloni et al., 2011; Baloch et al., 2017), de blé tendre (Li et al., 2015b), de pastèques et d'haricots (Yang et al., 2016; Valdisser, et al., 2017). Cette technologie puissante pourra constituer un outil efficace et utile pour caractériser les populations locales Tunisiennes.

D'ailleurs des études menées sur les variétés locales méditerranéennes ont montré qu'elles possèdent des traits de qualités désirables qui sont absentes chez les cultivars modernes (Moragues et al., 2006). Récemment, la teneur en pigment jaune ou caroténoïdes est devenue un critère important dans l'évaluation de la qualité de la semoule et joue un rôle particulièrement important dans la détermination de la qualité commerciale et nutritionnelle des produits finis tels que les pâtes, due à l'appréciation de la couleur jaune par les consommateurs. Cette couleur est le résultat de la concentration des caroténoïdes ou pigments jaunes dans le grain, due à la présence des xanthophylles dans l'endosperme, principalement la lutéine et d'autres composés apparentés (Hentschel et al., 2002). Les caroténoïdes jouent également un rôle important dans la santé humaine grâce à leurs rôles antioxydants (Eggersdorfer et Wyss, 2018) et il a été démontré par plusieurs études que ces caroténoïdes sont impliqués dans la protection des plantes du stress photo oxydatif (Havaux, 2014).

Chez le blé dur, les teneurs en pigments jaunes sont relativement adéquates entre 4 à 8 ppm (Troccoli et al., 2000) comparativement aux autres types de blé. Différentes méthodes ont été utilisées pour estimer la teneur en caroténoïdes (pigments jaunes) telles que: i) la méthode indirecte basée sur le système colorimétrique  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (CIE, Commission internationale de l'éclairage, 1986) dont l'indice  $b^*$  a été prouvé hautement corrélé avec la teneur totale en caroténoïdes. Cette méthode est considérée comme une méthode rapide largement utilisée par les industries producteurs des pâtes et les améliorateurs; ii) la méthode de référence AACC 14-50 (Committee 2000) et plus récemment la méthode AACC 14-6-01 (Abdel-Aal et Rabalski, 2012) qui ont montré une corrélation significative avec la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Ces deux méthodes sont basées sur l'extraction des caroténoïdes totaux par l'eau saturée en *n* butanol (WSB) suivie d'une mesure spectrophotométrique; et iii) la méthode HPLC qui est performante pour la séparation, l'identification et la mesure des différentes composantes des caroténoïdes (Fратиanni et al., 2005).

En effet, la teneur en caroténoïdes (pigments jaunes) a été évaluée majoritairement chez les variétés modernes ou les lignées élites issues de croisements. Par contre, malgré la grande diversité et la richesse allélique des populations locales de blé dur (Fayaz et al., 2013; Lopes et al., 2015), ce caractère n'a pas été exploité.

La teneur en pigment jaune est un trait quantitatif complexe, fortement influencé par le génotype et présente une héritabilité élevée (Elouafi et al., 2001; Clarke et al., 2006; Roncallo et al., 2012; Guzmán et al., 2016). Toutefois, certains travaux ont décrit un effet

environnemental important (Roncallo et al., 2012), d'autres au contraire ont mentionné plutôt un effet minime (Elouafi, et al. 2001; Clarke, et al. 2006; Guzmán, et al. 2016). D'autre part, l'effet interaction génotype\* environnement est très peu élucidée.

La teneur en pigment jaune dans le grain est un trait polygénique, contrôlé par deux loci majeurs à effet additifs, les loci PSY1A et PSY1B codant pour la phytoène synthase impliquée dans la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes, dont il a été rapporté qu'ils sont localisés sur les chromosomes 7A et 7B, respectivement (Elouafi et al., 2001; Patil et al., 2008; Colasuonno et al., 2014; Patil et al., 2018). Plusieurs autres QTL mineurs ont été identifiés sur les chromosomes 1A, 1B, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B et 6B (Hessler et al., 2002; Pozniak et al., 2007; Patil et al., 2008; Zhang et Dubcovsky, 2008; Howitt et al., 2009). La majorité des QTL décrits ont été identifiés par le biais de la cartographie des QTL biparentale traditionnelle («QTL mapping») utilisant un nombre restreint de marqueurs. Très peu parmi ces QTL ont été utilisés dans les programmes de sélection. Actuellement, l'association pan génomiques (GWAS) ou cartographies d'association (AM), qui est basée sur le déséquilibre de liaison (LD), est devenue une approche puissante de la cartographie génétique en fournissant une haute résolution des loci détectés, en raison de la présence d'une diversité génétique élevée et l'historique de recombinaison des allèles dans la population. La majorité des études de cartographie d'association qui ont été menées pour disséquer la base génétique de la teneur en pigments jaunes ont utilisé des lignées issues de programmes d'améliorations avec soit un nombre restreints de marqueurs de type SSR (Reimer et al., 2008), soit le génotypage à haut débit de type Illumina 90K Infinium iSelect (N'Diaye et al., 2017; N'Diaye et al., 2018). Cependant, Roselló et al., (2018) avaient décrit l'efficacité de la technologie DArTseq dans la détection de 21 QTL associés à l'indice du jaune de la semoule dans une collection de 165 populations locales originaires de 21 pays méditerranéens, dont le marqueur wPt-3729 pourrait être utilisé dans la sélection assistée uniquement chez les populations locales de l'Est de la Méditerranée et les cultivars améliorées, en dépit de leurs richesses en caroténoïdes comparativement à ceux de l'Ouest de la Méditerranée. Aucune étude de GWAS pour ce caractère n'a validé la stabilité des QTL identifiés dans différents environnements.

Dans ce projet de thèse, les objectifs sont comme suit:

- 1) Etudier pour la première fois la diversité génétique et la structure de population d'une collection constituée de 196 lignées de blé dur issues de six populations locales Tunisiennes utilisant une nouvelle technologie de génotypage DArTseq<sup>TM</sup>.

2) Evaluer les teneurs totales en caroténoïdes (pigments jaunes) chez 196 lignées de blé dur issues de six populations dans six environnements.

3) Identifier des QTL associés à la teneur totale en caroténoïdes (pigments jaunes) chez une collection de 196 lignées de blé dur issues de six populations locales

# **CHAPITRE 1: Synthèse bibliographique**



## I. Taxonomie du blé dur

Le blé dur est une plante annuelle autogame appartenant à la classe des Monocotylédones, à la famille des *Gramineae* ou *Poaceae* et à la tribu des *Triticeae* qui renferme les céréales les plus cultivées appartenant aux genres; *Triticum* ssp. (le blé); *Hordeum* ssp. (l'orge) et; *Secale* ssp (le seigle).

La classification du genre *Triticum* ssp a évolué au cours du temps en se basant au début sur des critères morphologiques et physiologiques (Von Linne, 1800), ensuite sur des critères morphologiques et cytologiques (Sakamura, 1918), permettant de séparer les blés en trois groupes en tenant compte du nombre des chromosomes: Le groupe des blés diploïdes (14 chromosomes), le groupe des blés tétraploïdes (28 chromosomes) et le groupes des blés hexaploïdes (42 chromosomes).

Selon Mac Key, (2005) classification des blés basée sur la combinaison des critères morphologiques, physiologiques, cytologiques, biochimiques, génétiques et évolutifs est la plus adoptée décrivant le blé dur (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) comme un blé tétraploïde ( $2n = 28$ ) de génome BB AA (Mac Key, 2005) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Classification du genre *Triticum* selon Mac Key, (2005).

	Génome	Espèces	Nomenclature courante
<b>Diploïdes</b>	<b>AA</b>	<i>T. monococcum</i> L.	
		ssp. <i>boeoticum</i> (Boiss.) MK	<i>T. boeoticum</i> Boiss.
		ssp. <i>monococcum</i>	<i>T. monococcum</i> L.
		<i>T. urartu</i> Tum.	<i>T. urartu</i> Tum.
<b>Tétraploïdes</b>	<b>AABB</b>	<i>T. turgidum</i> (L.) Thell.	
		ssp. <i>dicoccoides</i> (Körn) Thell.	<i>T. dicoccoides</i> (Körn) Schweinf.
		ssp. <i>dicoccum</i> (Schrank) Thell.	<i>T. dicoccum</i> (Schrank) Schuebl.
		ssp. <i>paleocolchicum</i> (Men.) MK.	<i>T. paleocolchicum</i> Men.
		ssp. <i>turgidum</i> L.	
		conv. <i>turgidum</i> L	<i>T. turgidum</i> L.
		conv. <i>durum</i> (Desf.) MK.	<i>T. durum</i> Desf.
		conv. <i>turanicum</i> (Jakubz.) MK.	<i>T. turanicum</i> Jakubz.
conv. <i>polonicum</i> (L.) MK.	<i>T. polonicum</i> L.		

		conv. <i>aethiopicum</i> Jakubz.	<i>T. aethiopicum</i> Jakubz.
<b>AAGG</b>		<i>T. timopheevi</i> Zhuk.	
		ssp. <i>araraticum</i> (Jakubz.) MK.	<i>T. araraticum</i> Jakubz.
		ssp. <i>timopheevi</i> Zhuk.	<i>T. timopheevi</i> Zhuk.
<b>Hexaploïdes</b>	<b>AABBDD</b>	<i>T. aestivum</i> (L.) Thell.	
		ssp. <i>compactum</i> (Host.) MK.	<i>T. compactum</i> Host.
		ssp. <i>macha</i> (Dek. et Men.) MK.	<i>T. macha</i> Dek. et Men.
		ssp. <i>spelta</i> (L.) Thell.	<i>T. spelta</i> L.
		ssp. <i>sphaerococcum</i> (Perc.) MK.	<i>T. sphaerococcum</i> Perc.
		ssp. <i>vavilovii</i> (Tum.) Sears	<i>T. vavilovii</i> (Tum.) Jakubz.
		ssp. <i>vulgare</i> (Vill.) MK.	<i>T. aestivum</i> L.
	<b>AAAAGG</b>	<i>T. zhukovskyi</i> Men. Et Er.	<i>T. zhukovskyi</i> Men. et Er.

## II. Origine du blé dur

Le blé est parmi les plantes les plus anciennement cultivées par l'homme (Darwin et Royer, 1862). L'origine géographique et temporelle ont été un sujet de débats en émettant plusieurs théories et hypothèses (Tanno et Willcox, 2006). Des études archéologiques, botaniques et phylogénétiques ont révélé l'existence de l'ancêtre sauvage du blé dès la période du Néolithique, il y'a environ 10 000 ans dans le Croissant fertile du Proche-Orient, plus précisément dans une petite zone centrale localisée dans l'amont de la région de Tigre et les rivières d'Euphrate, qui correspond actuellement au Sud Est de la Turquie et le Nord de la Syrie (Lev-Yadun et al., 2000). La transition de l'ère Paléolithique à l'ère Néolithique connue sous le nom de révolution néolithique était à l'origine de l'émergence de la civilisation humaine et des premières communautés agraires qui ont permis le développement de l'agriculture suite au changement du mode de vie chasseur-cueilleur au mode de vie sédentaire et cultivateur en utilisant des outils et des techniques de cultures innovantes appropriées (Harman 2008; Faris 2014).

Dans le levant qui est considéré comme le berceau de l'agriculture riche en biodiversité particulièrement les céréales, les habitants ont probablement exploité les peuplements naturels avant de domestiquer les blés tétraploïdes (Gepts, 2004). Au début de la période du Dryas entre 8900 et 7000 av. JC., une succession d'épisodes climatiques de froid et de sécheresse contraignaient les civilisations humaines du levant et avaient abouti à la migration des

populations avec leurs savoir-faire de cette zone centrale vers d'abord tout le croissant fertile et ensuite de proche en proche vers d'autres continents (Figure 1).

Auriau, (1967) a reporté les travaux de Vavilov qui avait décrit trois centres d'origine primaire et secondaire du genre *Triticum*.

La Tunisie faisant partie de l'Afrique du nord est considérée comme un centre secondaire de diversité du blé dur (Bœuf, 1932).

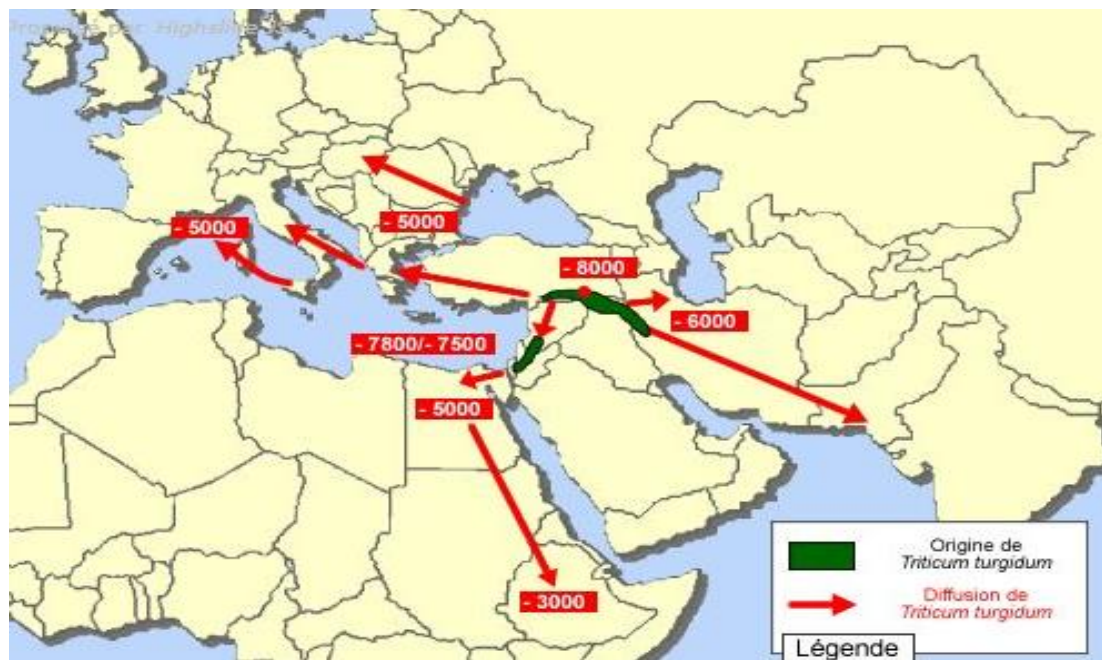


Figure 1: Origine du blé dur et sa diffusion (Bonjean, 2001).

### III. Domestication, évolution et génétique du blé dur

La domestication des blés est un processus de sélection continue par l'homme. Elle est apparue il y a probablement plus que 10000 ans dans la zone du levant ou croissant fertile (Feldman et Kislev, 2007; Zohary et al., 2012). Des études phylogéniques et archéologiques ont décrit que le blé diploïde sauvage *Triticum urartu* ( $2n = 2x = 14$ ), ayant le génome  $A^uA^u$  a joué un rôle essentiel dans l'évolution des blés tétraploïdes en contribuant avec le génome  $A^u$  qui est à l'origine du progéniteur sauvage tétraploïde identifié comme étant l'emmer sauvage *Triticum dicoccoides* ( $2n = 4x = 28$ ), de génome  $A^uA^uBB$ , suite à une hybridation spontanée avec le génome BB d'une herbe sauvage appartenant au genre *Aegilops* proche de l'espèce *Aegilops speltoides*.

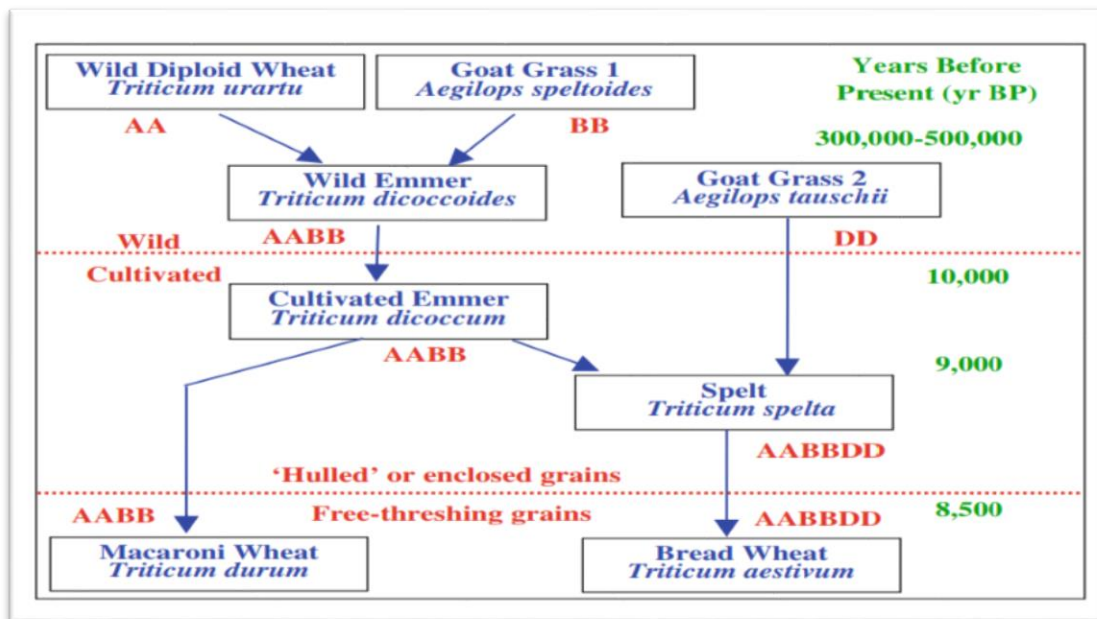
L'histoire de la domestication des blés est très complexe due à plusieurs facteurs, parmi lesquels nous citons: le changement du mode de vie cueilleur- chasseur au mode de vie

sédentaire et cultivateur, les changements climatiques, l'expansion démographique et la migration humaine (Tanno et Willcox, 2006; Dubcovsky et Dvorak, 2007).

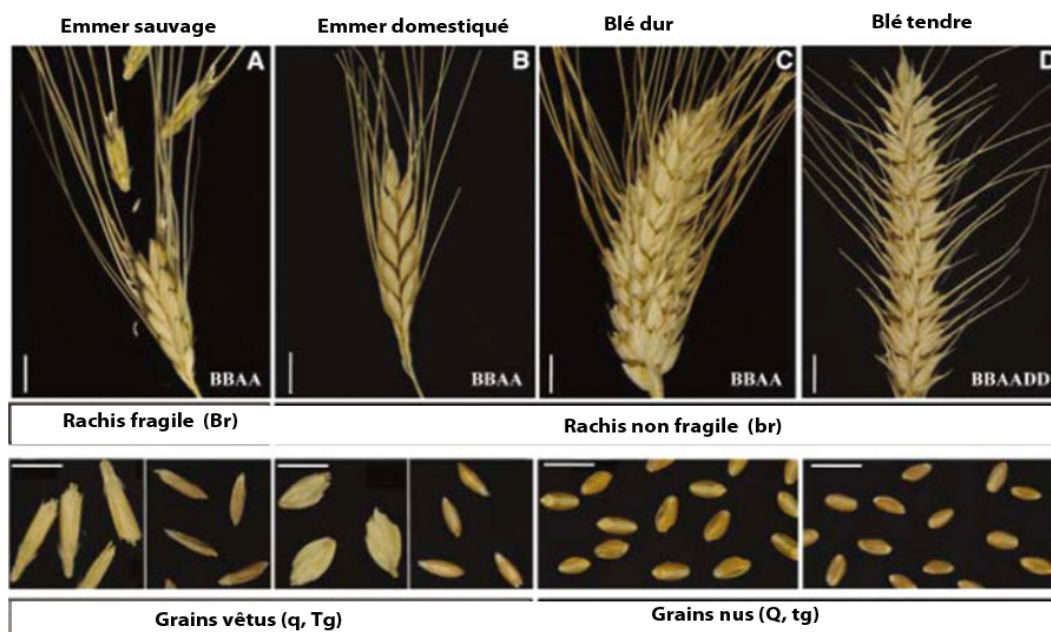
Selon plusieurs auteurs, la domestication des blés peut être répartie en deux phases (Figure 2): Une première phase considérée comme une domestication primaire qui correspond à l'évolution de l'emmer sauvage caractérisé par des semences dormantes, un rachis fragile et des grains vêtus vers l'emmer domestiqué (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*), qui est à l'origine du premier blé tétraploïde domestiqué, due à la sélection de l'homme des épis ayant un rachis non fragile pour optimiser le processus de la récolte (Tanno et Willcox, 2006; Zohary et al., 2012). Une deuxième phase considérée comme une domestication secondaire marquée par une série de modifications génétiques décrites comme le syndrome de domestication affectant des traits morpho-physiologiques clefs (graines nues et de grandes tailles, épis avec rachis solides, port dressé de la plante, dormance des graines réduite, mode de reproduction autogame, réduction du nombre de talles). Ces changements étaient principalement dus aux mutations des principaux gènes caractéristiques de l'évolution du blé; notamment les gènes Br, Tg et Q conférant un rachis fragile, une glume tenace et une graine décortiquée, respectivement (Dubcovsky et Dvorak, 2007; Peng et al., 2011; Avni et al., 2017; Hughes et al., 2019) et sont à l'origine de l'apparition du blé tétraploïde *Triticum turgidum* ssp. *durum* (Figure 3).

Durant la seconde phase, il semblerait que le blé tétraploïde *Triticum turgidum* ssp. *durum* était cultivé en mélange avec d'autres céréales ainsi que l'emmer domestiqué au niveau du proche orient et du bassin méditerranéen jusqu'il devienne une culture dominante. Depuis lors, le blé dur s'est étendu à des zones géographiques encore plus éloignées et son expansion a suivi de près la migration humaine et il s'est adapté aux conditions environnementales et climatiques de chaque région induisant une grande variabilité génétique et des modifications dans le contrôle physiologique, agronomique et technologique.

De nos jours, le blé dur est principalement cultivé dans le bassin méditerranéen qui comprend le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie de l'Ouest.



**Figure 2:** Evolution des blés depuis l'ancêtre sauge diploïde jusqu'au blé dur et tendre moderne (reproduite à partir de <http://www.newhallmill.org.uk/wht-evol.htm>).



**Figure 3:** Evolution de la morphologie de l'épi chez le blé; (A): Rachis fragile; (B à D): Rachis non fragile; (A et B): grain velu (C et D) grain nu. (A): le blé emmer sauvage (*T. dicoccoides*); (B): L'emmer domestiqué (*T. dicoccum*); (C): le blé dur (*T. durum*), et (D): Le blé commun (*T. aestivum*). Barres d'échelle en blanc représente 1 cm. Les lettres dans le coin inférieur droit indiquent la formule du génome de chaque type de blé. Symbols des genes, Br rachis: fragile, Tg: glumes tenace, et Q: Epi de forme carrée (reproduite à partir de Dubcovsky et Dvorak, 2007).

## **IV. Types des ressources génétiques du blé dur**

Les techniques de domestication et d'utilisation du blé tétraploïde n'ont cessé d'évoluer au cours du temps afin de subvenir aux besoins et exigences croissantes de l'homme. La diffusion de cette culture dans des zones géographiques différentes a engendré une adaptation à de nouvelles conditions environnementales, une utilisation de pratiques culturelles appropriées et un développement de méthodes de sélection. Nous distinguons ainsi différents types de ressources génétiques de blé dur.

### **1. Population locale ou variété ancienne**

Une population locale est synonyme d'une variété ancienne, d'une variété locale, d'une variété paysanne, ou encore d'une «landrace», qui peut être définie comme un ensemble d'individus d'une même espèce qui a été sélectionnée et cultivée depuis des milliers d'années et qui est adaptée aux conditions environnementales locales et aux méthodes de cultures employées pour satisfaire les besoins socio-culturels et économiques des communautés paysannes.

Les populations locales sont alternativement appelées variétés traditionnelles portant un nom folklorique attribué par le paysan qui reflète son rôle innovateur (Jaradat, 2013).

### **2. Variété améliorée ou moderne**

La fin du 18<sup>ème</sup> siècle est marquée par une prise de conscience des agriculteurs innovants en développant des méthodes de sélection systématique des plantes et en démarrant d'une manière consciente et inconsciente le processus d'amélioration génétique. Au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, la découverte des lois mendéliennes sur l'hérédité et la maîtrise du mode de reproduction des plantes a contribué à la création de variétés améliorées ou modernes issues de croisements contrôlés pour un nombre de caractères utiles sur plusieurs générations à partir de deux lignées parentales.

Actuellement selon les critères de l'UPOV (Union pour la protection des obtentions végétales), une variété améliorée ne pourrait être inscrite que lorsqu'elle répond aux critères de distinction, d'homogénéité et de stabilité afin de garantir son potentiel vis-à-vis de certains traits aux utilisateurs.

### 3. Lignée pure

Au début du XXe siècle, le botaniste danois Wilhelm Johannsen a défini la lignée pure comme étant un groupe d'individus descendants d'un unique individu autofécondé et qui sont génétiquement identiques et homozygotes pour tous les caractères en raison d'une consanguinité prolongée (Johannsen, 1903).

## V. Histoire du blé dur en Tunisie

La diffusion du blé tétraploïde à partir du Nord-Ouest du levant vers l'Afrique du Nord a suivi plusieurs courants. La voie la plus ancienne est terrestre, qui a commencé à partir de l'Egypte et s'est poursuivi au Sud vers le Soudan et l'Ethiopie et au Nord vers la Lybie de l'Est (Bonjean, 2001). La seconde voie est maritime, d'abord à partir de la Grèce et la Crète vers la Lybie et ensuite à partir de la péninsule de Sicile pour parvenir aux côtes de la Tunisie, du Maroc et de l'Algérie (Feldman, 2001). En Tunisie, Bœuf, (1932) a indiqué l'existence des représentants de blé de Pologne (*Triticum polanicum* L.) et l'introduction des variétés de blé de poulard (*Triticum turgidum* L.), il avait également décrit que la Tunisie renferme un grand nombre de variétés locales ce qui a fait considérer ce pays comme un centre secondaire de diversité. D'après Ducellier, (1920), l'invasion des arabes a induit une hybridation spontanée entre les formes locales existantes et celles importées donnant naissance à une grande diversité des populations locales tunisiennes (Ducellier, 1920).

Bœuf, (1932) avait classé les populations locales tunisiennes en 4 groupes en se basant sur les appellations des paysans et sur la couleur de la glume et de l'épi (Tableau 2):

Le premier groupe représenté par les variétés Agili, Biskri, Mahmoudi, Sbei, Adjini et Aouedj qui sont caractérisées par des barbes noires et des glumes blanches.

Le deuxième groupe est caractérisé par des barbes blanches et des glumes blanches et représenté par la variété Derbessi. Des barbes rousses ou noires et des glumes rousses caractérisant le troisième groupe qui comporte les variétés Sour, Azizi, Bidi, Hmira et Mekki et le 4<sup>ème</sup> groupe représenté par les variétés Medea et Jenah Khotifa qui sont caractérisées par des épis noirs et des glumes noires violacées.

**Tableau 2:** Classification des populations locales de blé dur par Bœuf, (1932)

Groupe	Couleur de l'épi et de la glume	Population	Origine
Groupe 1	- Glume blanche - Barbe noire	Agili	Maroc
		Biskri	Algérie
		Mahmoudi	Algérie
		Sbei	Tunisie
		Adjini	Origines diverses
		Aouej	Maroc
Groupe 2	- Glume blanche - Barbe blanche	Derbessi	Tunisie
Groupe 3	- Glume rousse -Barbes rousses ou noire	Souri	Tunisie
		Azizi	Origines diverses
		Bidi	Maroc
		Bidi 17	Algérie
		Hmira	Centre de la Tunisie
Groupe 4	- Glume noires violacées -Barbes noire	Medea	Algérie
		Jenah Khotifa	Nord de la Tunisie

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, François Boeuf a démarré le programme d'amélioration génétique du blé en Tunisie. Il était basé durant la période 1913-1930 sur l'exploitation de la variabilité génétique à l'intérieur des populations locales et celles étrangères introduites, particulièrement d'origine méditerranéennes. L'objectif était l'obtention de populations homogènes capables de résister à la rouille noire, à la sécheresse et ayant une bonne qualité technologique telles que les lignées pures issues des populations Mahmoudi (introduite de l'Algérie) et celles de Chili (introduite de la France).

L'amélioration du blé dur en Tunisie a connu par la suite une évolution au cours du temps en passant par différentes phases selon des objectifs bien définis. A partir de 1927, une première hybridation a été conduite entre des populations locales et des populations méditerranéennes pour donner des variétés semi naines dans une première phase caractérisées par une précocité, un meilleur rendement et une meilleure qualité technologique mais sensibles aux maladies telles que les variétés Syndioug-Mahmoudi, D77, D115 et D117, ensuite une deuxième phase avec d'autres variétés caractérisées par une précocité et une résistance aux maladies telles que les variétés INRAT 69 et Badri. A partir de 1970, un programme national de collaboration entre la Tunisie et les centres internationaux, le Centre International d'Amélioration du Blé et du Maïs (CIMMYT) et le Centre internationale des recherches agricoles dans les zones arides (ICARDA) a été créé suite à l'introduction de variétés étrangères et leur exploitation avec celles locales pour augmenter la production céréalière dans le pays. Ce programme a abouti à la création de plusieurs nouvelles variétés:



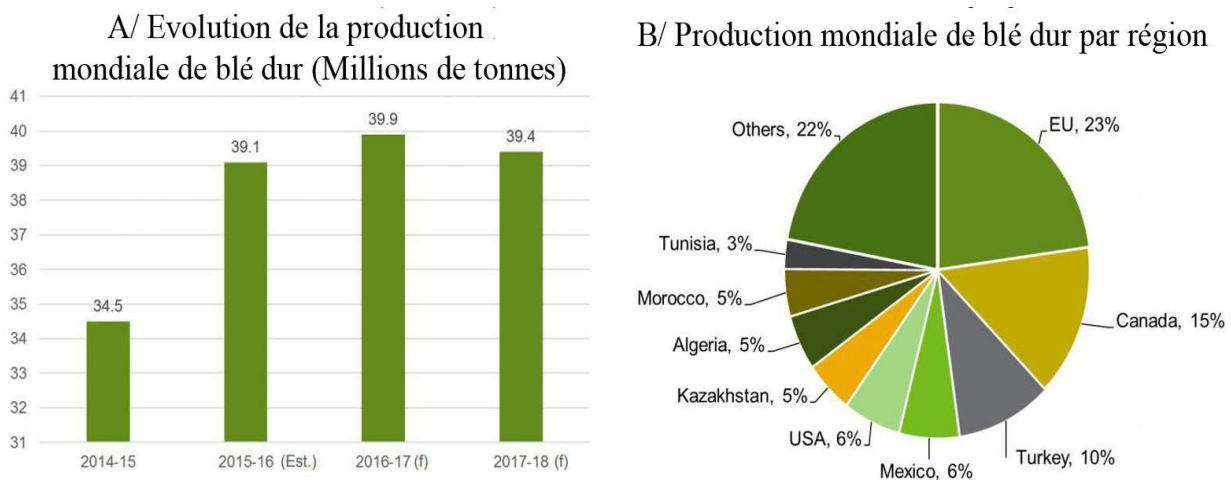
Amel 72 et Magherbi 72 (en 1972); Ben Bechir (en 1978), Karim (en 1980), Razzek (en 1987), Khiar (en 1992) et Om Rabia (en 1996) (Ammar et al., 2016).

Les programmes de recherches n'ont cessé de développer jusqu'à nos jours des variétés de plus en plus adaptées aux conditions environnementales défavorables et ayant une résistance aux maladies fongiques, parmi lesquelles on distingue les variétés Nasr, Maali, Salim et récemment INRAT 100.

## VI. Importance économique du blé dur

### 1. A l'échelle mondiale

Selon les statistiques de l'IGC «International Grains Council», la production mondiale de blé dur est estimée à 39.4 millions de tonnes au cours de la campagne 2017-2018 et montre une nette augmentation d'environ 400 millions de tonnes par rapport à 2014 expliquée par l'augmentation de la demande, de la consommation et de l'utilisation industrielle de cette céréale, malgré qu'elle ne représente que 5% de la production du blé (blé dur et blé tendre) (Figure 4).



**Figure 4:** Production mondiale de blé dur; A: Evolution de la production mondiale de blé dur en millions de tonnes; B: Production mondiale de blé dur par région. Source: IGC, 2017.

Les principaux producteurs sont l'Union Européenne (23%), le Canada (15%), la Turquie (10%), le Mexique et les Etats-Unis (6%, chacun respectivement) (Figure 4). Les pays du bassin méditerranéen représentés par les régions de l'Afrique du Nord, du Proche Orient et du sud de l'Europe contribuent à 75% de la production mondiale. Cependant, malgré l'importance de cette culture qui constitue la principale source alimentaire dans ces pays, la production est marquée par une irrégularité inter annuelle qui est largement influencée par les conditions climatiques contraignantes inter annuelles (Périodes de sécheresse).

## **2. A l'échelle nationale**

Le blé dur en Tunisie est considéré comme une culture stratégique en raison de son importance économique, socio-culturelle et son rôle agro-alimentaire et dans la sécurité alimentaire du pays. Parmi les céréales cultivées, le blé dur représente 70% de la production nationale céréalière.

L'évolution des superficies emblavées par cette culture durant la période 1984-2016 a montré une tendance en baisse à partir de l'année 2007. La majorité des superficies de cette culture est située dans les régions du nord et sont conduites en pluviale et au centre où cette culture est conduite en irrigué. Les rendements et les productions annuels du le blé dur fluctuent d'une année à une autre en raison de plusieurs facteurs, parmi lesquels: la pluviométrie qui constitue une des contraintes climatiques majeurs, le choix de la variété cultivée, et le paquet technologique utilisé. Cependant, une nette amélioration des rendements a été observée, à partir de 2002, justifiée par l'augmentation des prix à la production.

## **VII. Eco physiologie du blé dur**

### **1. Morphologie du blé dur**

Le blé dur est une plante annuelle, herbacée et autogame composée d'un appareil végétatif et d'un appareil reproducteur.

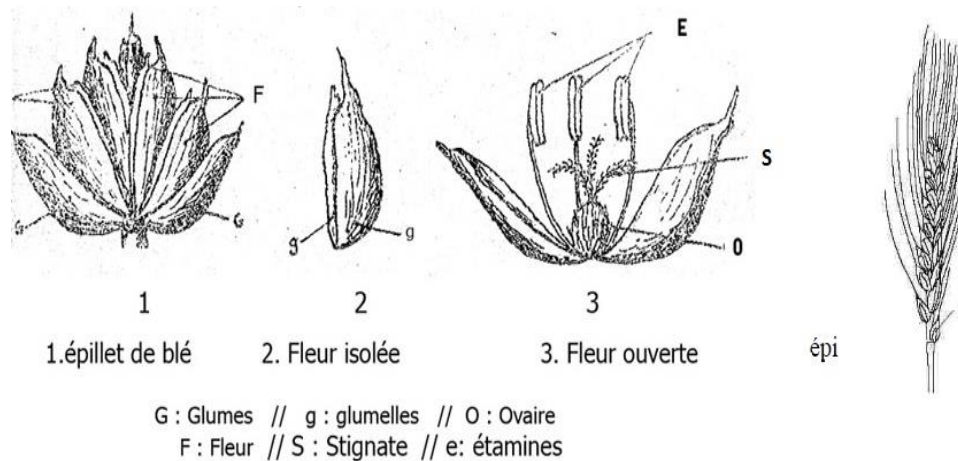
### **2. L'appareil végétatif**

L'appareil végétatif du blé dur comprend un système aérien et un système racinaire. Le premier est formé de talles portant à leurs extrémités des inflorescences de type épi et se rassemblant à la base pour former le plateau de tallage. Chaque talle est formé d'une tige portant des entre nœuds séparés par des nœuds alternes à partir desquels se différencient les feuilles. La tige feuillée principale est appelée le maître brin. Le second comprend de racines primaires ou séminales et des racines secondaires ou coronales.

### **3. L'appareil reproducteur**

#### **a. L'épi**

Un épi de blé dur est composé de deux rangées d'épillets disposés en position alterne de part et d'autre d'un axe central appelé rachis. Chaque épillet est pourvu de deux glumes à sa base et de 3 à 5 fleurs apétales dont chacune est composée de 3 étamines et d'un ovaire et enveloppée par deux glumelles (Figure 5). Les fleurs sont cléistogames et hermaphrodites et le mode de reproduction du blé dur est à 95% autogame.

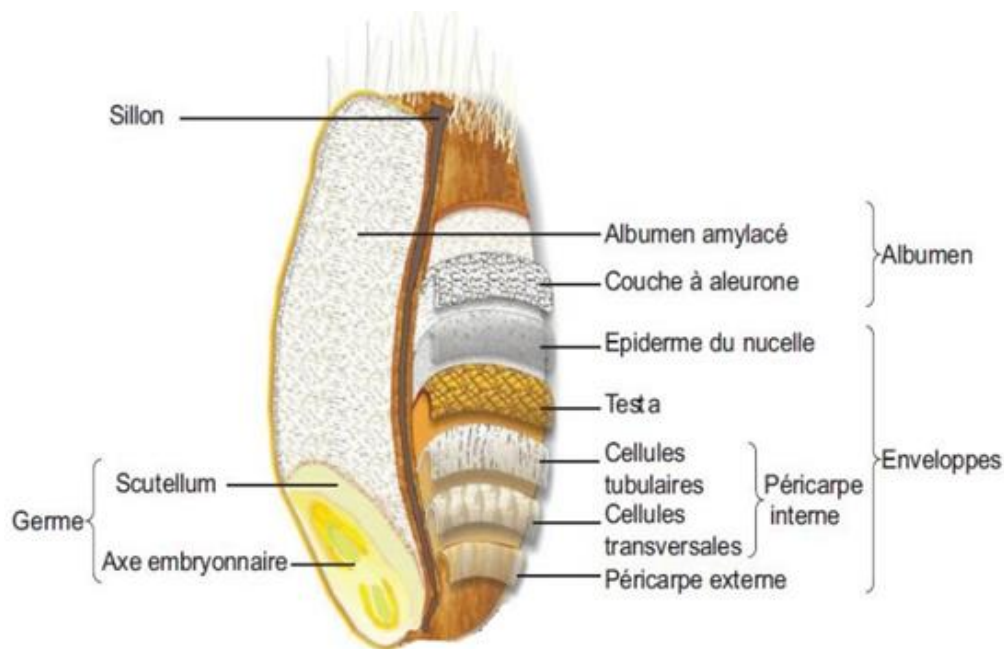


**Figure 5:** Morphologie de l'épi de blé dur (Flandrin, 1949).

### b. Le grain du blé dur

Le grain de blé dur est un fruit indéhiscent appelé caryopse et qui est composé de trois parties (Feillet, 2000) (Figure 6):

- **L'albumen** représente 80 à 85% du grain. Il est constitué d'une couche à aleurone riche en protéines, pentosanes, éléments minéraux et de lipides ainsi que de l'albumen amylicé qui forme les réserves nutritionnelles de l'embryon et qui est composé d'amidon et d'une matrice protéique.
- **Les enveloppes de la graine** représente 13 à 17% de la masse totale du grain et sont constituées de quatre couches de tissus formant le péricarpe interne, le péricarpe externe, le testa et l'épiderme nucellaire.
- **Le germe** est issu de la fusion des gamètes mâles et femelles. Il représente 3% de la masse totale du grain, riche en protéines de types albumines et globulines. Le germe. est constitué de l'axe embryonnaire qui se développera en tigelle et radicule et du scutellum qui se développera pour donner le cotylédon.



**Figure 6:** Anatomie du grain du blé dur (Surget et Barron, 2005).

#### 4. Cycle de développement

Le cycle de développement du blé dur est constitué de trois périodes successives, une période végétative, une période de reproduction et une période de maturité. Différentes échelles de notation des stades phénologiques ont été développées pour normaliser l'évaluation du développement du blé, les plus utilisées sont l'échelle Feekes (Large, 1954) et l'échelle Zadoks (Zadoks et al., 1974) (Tableau 3).

**Tableau 3:** Les différents stades de développement du blé dur (Soltner 2005).

	Stades	Feekes	Zadoks	Caractéristiques
	Levée		7	Sortie du coléoptile
			10	1ère feuille traversant le coléoptile
Levée	1 feuille	1	11	1ère feuille étalée
	2 feuilles		12	2ème feuille étalée
	3 feuilles		13	3ème feuille étalée
	Début tallage	2	21	Formation de la 1ère talle
	Plein tallage	3	22	
			23	
Tallage	Fin tallage	4	24	2 à 3 talles
			25	
	Début Montaison (Épi à 1 cm)	5	30	Sommet de l'épi distant à 1 cm du plateau de tallage
	1 nœud	6	31	1 nœud      Elongation de la tige
	2 nœuds	7	32	2 nœuds
	Gonflement	8	37	Apparition de la dernière feuille
	L'épi gonfle la gaine de la dernière feuille.	9	39	Ligule juste visible (méiose mâle)
	Épiaison	10	45	Gaine de la dernière feuille sortie
		10-1	49-51	Gaine éclatée
Montaison		10-2	53	1/4 épiaison
		10-3	55	1/2 épiaison

		10-4	57	3/4 épisaison
		10-5	59	Tous les épis sortis
	Floraison	10-5-1	61	Début floraison
		10-5-2	65	Demi-floraison
		10-5-3	69	Floraison complète
Maturation	Formation du grain	10-5-4	71	Grain formé
		11-1	75	Grain laiteux
		11-2	85	Grain pâteux
		11-3	91	Grain jaune
		11-4	92	Grain mûr

**a. Période végétative:**

La période végétative s'étale du semis jusqu'au début de la montaison et correspond au développement des racines, des tiges et des feuilles et comprend trois phases:

➤ **Une phase germination – levée**

La germination se caractérise par l'émergence du coléorhize à l'origine du développement des racines séminales et de la coléoptile. Cette phase est tributaire des facteurs édaphiques (Chaleur, humidité et aération du sol) et de la faculté germinative des graines. La levée correspond à l'émergence de la première feuille à la surface du sol.

➤ **Une phase levée – tallage**

La phase levée – tallage correspond au développement de la première feuille fonctionnelle et la différenciation du bourgeon à l'aisselle de cette feuille d'une talle latérale primaire. D'autres talles primaires de la 2ème, 3ème et 4ème feuille se développent en formant le plateau de tallage. Les talles primaires émettent des talles secondaires susceptibles d'émettre des talles tertiaires. Le processus de ramification des talles est tributaire de la variété.

➤ **Une phase tallage-montaison**

La phase tallage-montaison est une phase transitoire entre la période végétative et reproductive. Elle débute par l'élongation et le redressement de la tige, ensuite la naissance des feuilles à l'aisselle des entre nœuds et finalement le gonflement de la gaine de la dernière feuille dite feuille étendard et le développement de l'épi (Stade gonflement). Cette phase est marquée par des transformations physiologiques importantes et elle est très critique par rapport aux stress hydrique et thermique.

## **b. Phase reproductive**

La période reproductive correspond au développement des organes reproducteurs. Cette période comprend deux phases:

### ➤ **Une phase montaison- épiaison**

Cette phase est marquée par la différenciation des épillets sur l'épi, l'apparition des glumelles, puis les anthères et ensuite les ovaires.

### ➤ **Une phase épiaison-floraison**

Cette phase est marquée par l'apparition des étamines hors des glumelles et par le processus de fécondation.

## **c. Période de maturation du grain**

La période de remplissage et de maturation des grains est répartie en trois étapes (Mazouz et Bouzerzour, 2006):

### ➤ **Une étape de formation du grain**

Après la fécondation, une multiplication cellulaire intense au niveau des différentes parties du sac embryonnaire engendre le développement des différents tissus du grain. Au cours de cette phase la plante subit des modifications fonctionnelles où le grain augmente de volume et de poids et atteint sa forme définitive: C'est le stade grain laiteux.

### ➤ **Une étape d'accumulation des réserves du grain**

Cette période est marquée par une remobilisation vers le grain d'une part des assimilats provenant de la photosynthèse des dernières feuilles et d'autre part des réserves antérieures accumulées au niveau de la tige et des feuilles non encore desséchées. Au cours de cette phase la teneur en eau reste constante (45% d'humidité) par contre la teneur en matière sèche augmente: C'est le stade grain pâteux.

### ➤ **Une étape de dessèchement du grain**

Durant cette étape, une perte progressive de l'humidité du grain est enregistrée atteignant une teneur en eau voisine de 15 à 16%. Au cours de cette phase le grain durcit et devient rayable à l'ongle, ensuite « cassant sous la dent ».

## **1. Exigences de croissance du blé dur**

### **a. Exigences édaphiques :**

La culture du blé dur nécessite un sol bien préparé ayant une texture fine, une structure stable, une bonne profondeur de 12 à 15 cm pour les terres limoneuses et 20 à 25 cm pour les autres types de terre et une richesse en colloïdes (Soltner, 2005). Le pH optimal du sol est entre 6 à 8. Le choix du précédent cultural est généralement des légumineuses alimentaires à fin d'enrichir le sol en azote organique.

### **b. Exigences climatiques**

#### **➤ Besoins en température**

La température conditionne le cycle de développement du blé dur. Les exigences totales en température varient entre 1800 et 2400°C. En conditions méditerranéennes, le blé dur a besoin au début de la germination d'une vernalisation avec des températures basses entre 0 et 3°C pendant 8 à 10 jours pour assurer sa croissance. Au début du cycle des températures entre 15 et 20°C sont optimales, de plus fortes températures même au-dessous de 30°C sont stressantes et au-dessus peuvent engendrer des dommages irréversibles en détruisant les organes et/ou la plante entière (DuPont et Altenbach, 2003).

#### **➤ Besoins en eau**

Les exigences du blé dur en eau varient de 450 à 650 mm. Les besoins en eau au début du cycle jusqu'à la phase fin tallage sont faibles. Cette phase est caractérisée par l'installation du système racinaire en profondeur et un excès d'humidité du sol engendre une asphyxie. Par contre dès la phase montaison jusqu'à la phase floraison, les besoins en eau deviennent considérables avec un minimum de 250 mm entre les mois de Mars et de Mai. Pendant ces phases des irrigations d'appoints peuvent être apportées afin d'éviter les pertes de rendements causées par la sécheresse due à un manque de pluies. A partir de la phase floraison de 30 à 35 jours les besoins en eau diminuent et le blé dur devient sensible à un excès d'eau. En conditions méditerranéennes, le blé dur est cultivé en pluviale et le rendement est tributaire de la pluviométrie. La sécheresse cause des pertes de rendements qui peuvent atteindre jusqu'à 70% selon l'année (Ben Naceur et al., 1999).

#### **➤ Besoins en photopériode**

La culture de blé dur est sensible au photopériodisme, nécessitant une certaine durée de jours longs au cours du cycle de développement. Les périodes d'éclaircissement agissent

directement sur le fonctionnement de la photosynthèse qui représente un facteur primordial pour assurer un bon tallage et garantir une bonne croissance jusqu'à la floraison (Soltner, 1998).

### ➤ **Exigences en fertilisations**

La culture de blé dur exige des fertilisants au cours de son cycle de développement pour assurer une production avec un bon rendement et une bonne qualité des grains.

La fertilisation azotée est essentielle dans la croissance du blé dur. Elle intervient essentiellement dans l'activité photosynthétique et dans les différentes phases du développement végétatif de la plante. Les exigences globales en Azote peuvent atteindre 3 kg par hectare et sont apportées d'une manière fractionnée: Une première fraction au tallage agissant sur le nombre de talles par plante, une deuxième fraction à la montaison influençant sur le nombre d'épis ainsi que sur la fertilité de l'épi et le dernier apport au stade épiaison en contribuant dans la remobilisation des réserves à partir des dernières feuilles et de la tige vers le grain et affectant la teneur en protéines.

La fertilisation phosphorée dépend de la richesse initiale en phosphore dans le sol. L'exigence totale du blé dur varie 60 à 90 kg de  $P_2O_5$ /ha selon la région (Aissa et Mhiri, 2002). Cet élément est essentiel dans le développement racinaire.

Les besoins du blé dur en sulfate de potassium varient de 50 à 100 kg par hectare selon région d'application (Aissa et Mhiri, 2002). L'apport en ce fertilisant est conditionné par sa teneur initiale dans le sol et il est important pour assurer une bonne production.

## **VIII. Etude de la diversité génétique**

La diversité génétique correspond à l'étendue de la variabilité chez une population, une espèce ou un groupe d'espèces qui sont soumis à plusieurs forces évolutives. Cette variabilité génétique est affectée par différents facteurs, dont la mutation et la migration contribuent à son augmentation. Par contre, la sélection et la dérive génétique engendrent plutôt sa diminution. La diversité génétique ou polymorphisme des différentes espèces est due à des variations alléliques des différents gènes localisés dans le génome. La variation allélique est d'autant plus importante chez les populations locales des différentes espèces que celles améliorées. Chez le blé dur, les populations locales sont caractérisées par une richesse allélique qui pourrait être exploitée dans des programmes d'amélioration génétique (Lopes et al., 2015) pour développer des variétés modernes aussi bien tolérantes aux stresses biotiques



et abiotiques qu'ayant une bonne qualité nutritionnelle. Egalement la richesse allélique est essentielle pour identifier des QTL associés à des traits d'intérêt. L'évaluation de la variabilité génétique est assurée généralement à travers trois types de marqueurs: Les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires.

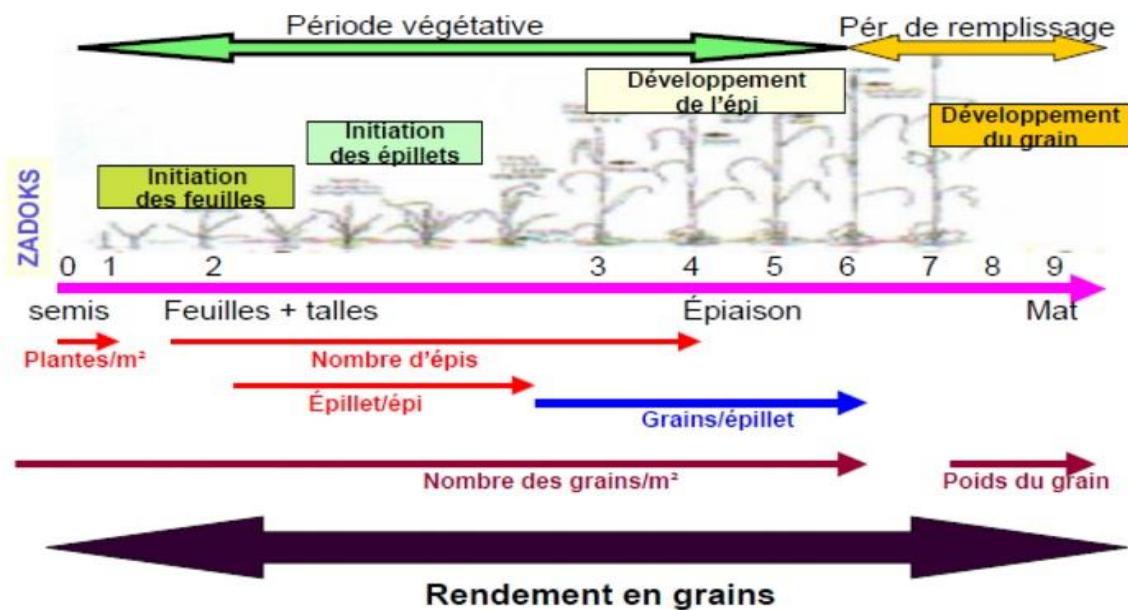
## **1. Moyens d'étude de la diversité génétiques**

### **a. Marqueurs morphologiques**

La caractérisation morphologique d'un matériel végétal est basée sur des observations et des mesures des traits quantitatifs et qualitatifs. Chez le blé dur, plusieurs caractères agromorphologiques, phénologiques, physiologiques et de qualité technologiques ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique dans différentes collections de différentes origines (Sourour et al., 2010; Mengistu et al., 2015; Abu-Zaitoun et al., 2018; Rapp et al., 2019). De plus, le développement des normes internationales, telles que celles de l'Union de Protection des Obtentions Végétales' (UPOV 1988) ont permis l'utilisation des critères standards pour l'examen des caractères distinctifs de l'homogénéité et de la stabilité des variétés de blé dur et ces critères ont été exploités dans différentes études de diversité phénotypique portant sur l'épi et le grain (Belhadj et al., 2015). La caractérisation morphologique est très utile pour la sélection du germoplasme ayant des traits qualitatifs et/ou quantitatifs désirés pouvant faire l'objet de programme d'amélioration génétique.

#### **➤ Caractères agro-morphologiques**

Les caractères agro-morphologiques les plus utilisés dans des études de diversité génétiques sont généralement associés à la sélection de germoplasme ayant une bonne production sous des conditions défavorables. En effet, parmi ces caractères; le rendement en grains est considéré le plus important critère, c'est un trait quantitatif complexe résultant de l'interaction de plusieurs composantes tout le long du cycle de développement de la plante, des conditions environnementales affectant la physiologie durant le cycle végétatif ainsi que des génotypes utilisés (Figure 7). Bien d'autres caractères morphologiques sont également utilisés telle que la hauteur de la plante, la morphologie de l'épi, les caractères propres à la feuille (la surface foliaire, la glaucescence et l'enroulement) dont plusieurs auteurs ont montré leurs fiabilités dans la sélection des variétés de blé dur tolérantes à la sécheresse.



**Figure 7:** Différentes composantes du rendement tout le long du cycle du développement du blé dur (Sayar et al., 2007).

➤ **Caractères phénologiques**

Chez le blé dur, la précocité aussi bien à l'épiaison qu'à la maturité est un critère désiré par les sélectionneurs, du fait qu'elle est considérée comme un mécanisme d'échappement ou d'esquive aux stress abiotiques (Stress hydriques et thermiques) dus au changement climatique qui caractérise surtout les régions méditerranéennes. Les populations locales possèdent généralement un cycle lent comparativement aux variétés modernes. Toutefois, il existe une grande variabilité pour ces traits.

➤ **Caractères physiologiques**

Plusieurs critères physiologiques d'évaluation de la tolérance du blé dur aux stress de l'environnement ont été utilisés conduisant à la distinction de la diversité génétique des populations étudiées.

Parmi ces critères, on distingue: la teneur en chlorophylle moyennant la mesure de l'indice SPAD qui s'est montré corrélée à la teneur en chlorophylle de type a des feuilles, laquelle est aussi corrélée à sa teneur en azote (Francis et Piekielek, 1998). Cet indice a été largement utilisé dans la sélection des accessions de blé dur tolérantes à la sécheresse et à d'autres types de stress (hautes températures, maladies fongiques, etc.).

D'autres critères tels que la fluorescence chlorophyllienne en mesurant plusieurs paramètres:  $F_o$  (Rendement de fluorescence minimale du PSII),  $F_m$  (Rendement de fluorescence maximale du PSII) et  $F_v$  (Rendement de fluorescence variable du PSII), dont le rapport  $F_v/F_m$  est un indicateur de l'état fonctionnel du transfert d'électrons au niveau des membranes photosynthétiques PSII. Ce rapport pourrait être utilisé pour détecter les conditions de stress dans la plante et mesurer le degré de résistance aux conditions contraignantes de l'environnement (Havaux et al., 1988).

### ➤ **Quelques caractères de qualité technologiques**

La production mondiale de blé dur (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) est majoritairement destinée à la consommation humaine sous forme de pâtes et à une moindre mesure, de couscous et de bourghoul. Par conséquent, les variétés de blé dur doivent répondre à des exigences élevées en matière de caractères de qualité du grain et de la semoule. La teneur en protéines ainsi que leurs qualités sont considérées comme critères principaux, du fait qu'elles sont responsables de l'élasticité et de la résistance physique des pâtes. Par ailleurs, d'autres caractères présentent autant d'importances tels que la force du gluten mesurée par le test de sédimentation (SDS) et conférant aux pâtes une meilleure qualité de cuisson, la couleur de la semoule et sa teneur en pigments jaunes qui jouent un rôle nutritionnel et technologique, le poids de mille grains et le poids spécifique. Différents travaux ont pu démontrer la prédominance de l'effet génotype pour la couleur de la semoule et sa teneur en pigments, et le SDS.

Par contre un effet de l'environnement important est observé pour le poids de mille grains, le poids spécifique et la teneur en protéines. Certaines études ont montré que les variétés modernes sont plus riches en pigments jaunes, en protéines et ont un taux de SDS élevé. Toutefois d'autres études mentionnent que les populations locales présentent une plus grande richesse pour la plupart des critères de qualité. La diversité génétique des populations locales pour les traits de qualité technologique pourrait être exploitée dans la sélection de génotypes ayant les traits de qualité désirés. De plus, la variabilité allélique pour chaque trait pourrait aider à identifier des QTLs qui pourraient être utilisés dans la sélection assistée.

Bien que les différents types de marqueurs morphologiques sont facilement observables et mesurables. Toutefois, ces marqueurs sont fortement influencés par l'environnement. Leur utilité est aussi réduite à cause de leur nombre limité et de leur faible niveau de polymorphisme (Andersen et Lübberstedt, 2003).

### **b. Marqueurs biochimiques**

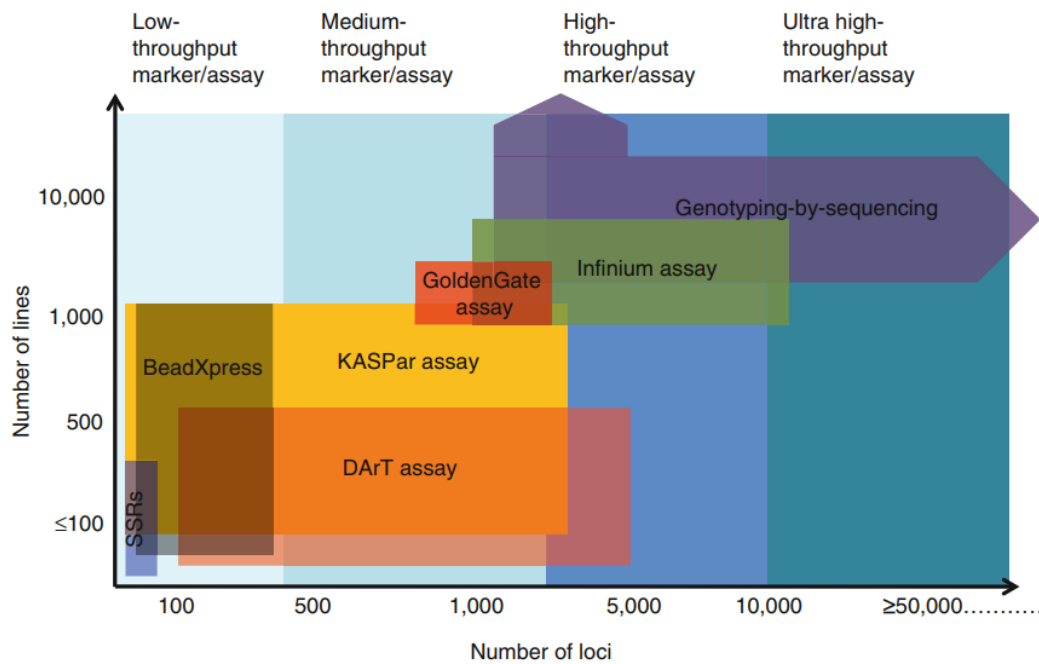
Les iso-enzymes ont été les premiers marqueurs biochimiques utilisés chez le blé dur. Cette méthode se base sur le polymorphisme enzymatique qui caractérise les génotypes utilisés due aux variations alléliques des enzymes. Toutefois, leurs applications présentent quelques inconvénients dus au nombre limité de marqueurs disponibles ainsi de la possibilité que certains allèles peuvent être confondus à une même iso-enzyme.

Par ailleurs, d'autres marqueurs biochimiques ont été utilisés tels que les différents types des protéines de réserve, notamment les gliadines et les gluténines qui ont été performantes pour évaluer la diversité génétique. Plusieurs études de diversité ont démontré que ces protéines présentent un taux de polymorphisme élevé.

### **c. Marqueurs moléculaires**

Les marqueurs moléculaires présentent plusieurs avantages par rapport aux marqueurs morphologiques et biochimiques. En effet, ces marqueurs correspondent au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. De faible quantité d'échantillons d'ADN quel que soit le stade de développement de la plante ainsi que de l'organe sont suffisants pour étudier la diversité génétique chez les différentes espèces. Egalement, ce type de marqueurs sont insensibles aux variations des conditions environnementales et sont largement utilisés chez les céréales dans les programmes d'amélioration génétique et de la sélection assistée (Andersen et Lübberstedt, 2003).

Différents types de marqueurs moléculaires ont été utilisés dans plusieurs études de diversité chez différentes espèces (Mir et al., 2013). Ces marqueurs n'ont cessé d'évoluer depuis les plus classiques jusqu'aux technologies de génotypage les plus développées à très haut débit (Figure 8).



**Figure 8:** Evolution des technologies des marqueurs moléculaires chez les plantes (Mir et al., 2013).

#### ➤ Marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Les marqueurs moléculaires de type RFLP sont considérés comme marqueurs de première génération développés par Botstein et al., (1980) dont le principe est basé sur une digestion de l'ADN par des enzymes de restriction spécifiques suivie d'une hybridation avec des sondes marquées radioactives ou fluorescentes (Botstein et al., 1980). Le polymorphisme détecté par les RFLPs est due à des mutations dans les sites de reconnaissance des enzymes de restriction ou à des délétions ou des insertions de plusieurs nucléotides.

Les marqueurs RFLPs présentent plusieurs avantages, notamment une reproductibilité élevée, une nature co-dominante, l'absence d'informations de séquence préalables et une spécificité de élevée du locus.

Cette technique a été utilisée dans l'étude de la diversité génétique ainsi que le développement de la carte génétique de plusieurs espèces cultivées telles que le blé tendre (Chao et al., 1989), l'orge (Graner et al., 1991) et le blé dur (Autrique et al., 1996). Certains marqueurs RFLPs ont été également utilisés pour la cartographie des traits d'intérêt et ont été très utile dans la sélection assistée (Gupta et al., 2010). Toutefois, cette méthode est coûteuse et laborieuse.

➤ **Marqueurs de type RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou microsattélites**

Les RAPDs sont les premiers marqueurs génétiques basés sur l'amplification en chaîne par polymérase ou «polymerase chain reaction» PCR, développés au début des années 90s (Williams et al., 1990).

Cette technique consiste à réaliser une réaction PCR sur l'ADN des individus étudiés, en utilisant une amorce de séquence arbitraire.

La technique RAPD a été utilisée chez différentes espèces végétales pour évaluer la diversité génétique des populations et des espèces, pour étudier les relations phylogénétiques entre espèces / sous-espèces et cultivars et pour construire des cartes génétiques (Gupta et al., 1999). Chez le blé dur, ces marqueurs ont été largement appliqués pour étudier la diversité génétique (Karaca et Izbirak, 2008; Abd-El-Haleem, et al., 2009) et l'identification de marqueurs associées à certains traits d'intérêt tels que la résistance à la septoriose (Cao et al., 2001), la qualité technologique (Blanco et al., 1998), et d'autres traits agronomiques. Cependant, ces marqueurs sont dominants et ne peuvent pas distinguer les individus homozygotes des hétérozygotes et ne sont pas reproductibles.

➤ **Marqueurs de type SSRs (Random Amplified Polymorphic DNA) ou microsattélites**

Les SSRs sont composés de répétitions de séquences di, tri ou tétranucléotides en tandem uniformément répartis sur le génome entier d'une espèce en plusieurs exemplaires (Bruford et al., 1998; Morgante et Olivieri, 1993). Les SSRs sont codominants, spécifiques de locus, stables et reproductibles et sont donc parmi les marqueurs les plus largement utilisés par les généticiens et les améliorateurs.

De nombreux travaux ont démontré qu'un nombre réduit de SSRs étaient efficaces pour décrire la diversité génétique chez plusieurs espèces (Gupta et al., 2010). Ces marqueurs ont été utilisés chez le blé pour l'évaluation de la diversité génétique entre les populations/espèces et/ou cultivars de différentes origines écogéographiques (Bertin et al., 2004; Medini et al., 2005), pour analyser la structure des populations (Eltaher et al., 2018), pour cartographier des QTLs associés à certains caractères d'intérêts agronomiques, technologiques et ceux impliqués dans les stressés biotiques et abiotiques (Pirseyedi et al., 2018; Singh et al., 2018), et également ils ont été largement utilisés dans les programmes de sélection assistée (Kuchel et al., 2007). Toutefois, cette méthode reste coûteuse et laborieuse.

➤ **Marqueurs de type AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism's)**

Cette technique combine à la fois la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction, la fixation d'adaptateurs spécifiques aux enzymes utilisées et la PCR sélective des fragments de restrictions (Vos et al., 1995). L'utilisation des marqueurs AFLPs est considérée comme une technique de génotypage robuste, fiable, reproductible, stable et peu coûteuse.

Chez le blé dur, cette technique a été utilisée pour étudier la diversité génétique (Seyedimoradi et al., 2016), les relations phylogénétiques (Maccaferri et al., 2007), les cartes génétique de liaison (Alsaleh et al., 2015) et l'identification de gènes et de QTLs associées à des traits d'intérêts sur le plan agronomique, qualité technologique (Blanco et al., 1998) et stresses biotiques et abiotiques (Rampino et al., 2017).

➤ **Marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism)**

Les marqueurs SNPs connus sous le nom de marqueurs de polymorphismes mono-nucléotidiques sont considérés comme des marqueurs moléculaires de troisième génération, fréquemment utilisés aussi bien dans le règne animal que végétal. Les SNPs sont principalement bi-alléliques, polymorphes et résultent soit de substitution/mutation ponctuelle, soit d'insertion/délétion ponctuelle de nucléotides entraînant des différences dans les séquences d'ADN qui sont détectées suite à l'alignement de régions génomiques similaires des génotypes différents de la même espèce ou d'espèces différentes.

Les SNPs se trouvent essentiellement dans les régions codantes des gènes ainsi que dans les régions régulatrices. Au cours de ces dernières années, ces marqueurs ont été largement utilisés dans les études de diversité génétiques chez le blé. Cavanagh et al., (2013) ont développé 9,000 SNPs liés à des gènes pour évaluer la diversité génétique d'une collection de 2,994 accessions de blé tendre en estimant un taux de polymorphisme similaire entre les populations autochtones et les variétés cultivées.

D'autres travaux de Ren et al., (2013) ont pu étudier la structure d'une collection de 150 accessions de blé dur de différentes origines utilisant 946 SNPs et ont pu confirmer les résultats de Cavanagh avec un taux de polymorphisme plus élevé chez les variétés améliorées (98,6%) que chez les populations autochtones (79,9%).

Il est à noter également que chez le blé dur, les SNPs ont été efficaces dans l'élaboration de la carte consensus du blé dur (Maccaferri et al., 2015), le développement de carte génétique à haute densité (Avni et al., 2014) et l'identification de nouveaux marqueurs SNPs

associés à des traits d'intérêt dans les programmes d'amélioration génétique (Zhang, et al., 2008; Colasuonno, et al., 2014).

➤ **Marqueurs de type DArT (Diversity Array Technology)**

La technologie des matrices de diversité «Diversity Array Technology» DArT est basée sur l'hybridation de puces qui permet le typage simultané de plusieurs centaines de loci polymorphes répartis sur le génome entier sans information de séquence au préalable (Jaccoud et al., 2001).

Les marqueurs DArTs sont bi-alléliques et se comportent principalement de manière dominante ou parfois de manière co-dominante. Ces marqueurs détectent généralement des polymorphismes dus à des modifications simples de paires de bases (SNP) au sein de sites de restriction reconnus par les endonucléases, ou dus à des insertions / délétions (InDels) ou des réarrangements (Jaccoud et al., 2001).

Le principe de cette technologie consiste à réduire la complexité du génome à travers la production des représentants génomiques suite à une digestion avec des enzymes (Fayaz et al., 2019), une amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisant des amorces complémentaires aux adaptateurs, un clonage des fragments amplifiés dans un vecteur, une seconde amplification PCR utilisant des amorces complémentaires au vecteur, une hybridation avec des puces et une lecture des intensités de signal d'hybridation.

Cette méthode est considérée prometteuse et à haut débit du fait qu'elle requiert une faible quantité d'ADN, analyse simultanément des centaines de marqueurs DArTs couvrant tout le génome sans aucune information de séquence. Elle se caractérise par une excellente reproductibilité, une utilisation facile, économique et se prête à l'automatisation avec une étendue génomique à faible réplique.

Ces marqueurs ont été développés notamment chez les principales espèces cultivées, comme le riz (Jaccoud et al., 2001), l'orge (Wenzl et al., 2004), le blé (Akbari et al., 2006; Peleg et al., 2008), le sorghum (Mace et al., 2009) et bien d'autres espèces.

Chez le blé dur, ces marqueurs ont permis de détecter les régions génomiques soumises à une sélection au cours de l'évolution (Laidò et al., 2013), de comparer entre les génomes des différents types de blé (Jing et al., 2009), d'étudier la diversité génétique et la structure aussi bien des variétés autochtones (Fayaz et al., 2019) que des cultivars (Laidò et al., 2013), d'établir des cartes génétiques à haute densité (Peleg et al., 2008), d'identifier des QTLs associées à des traits d'intérêts tels que la force du gluten (Kumar et al., 2013), la teneur en



caroténoïdes (Colasuonno et al., 2014) et également d'utiliser ces marqueurs dans la sélection moléculaire assistée (Gupta et al., 2010).

#### ➤ **Génotypage avec la technologie GoldenGate**

Illumina GoldenGate est une méthode de génotypage utilisant des marqueurs SNP personnalisés ou standards sur l'ensemble du génome. Le principe de cette technologie consiste en une extension d'allèles spécifiques, ensuite une amplification par PCR suivie d'une hybridation sur un réseau de billes chargées d'amorces spécifiques et différentes dont le nombre est variable en fonction de l'étude désirée. Cette technologie peut être appliquée pour plusieurs espèces cultivées en utilisant soit la technique BeadArray ou la technique VeraCode (Thomson et al., 2012). Elle peut être classée en se basant sur le niveau de multiplexage comme suit: (i) GoldenGate BeadArray permettant le génotypage simultané de loci à 96, 192, 384, 768, 1 536 et 3 072 SNP dans une assez grande collection, (ii) GoldenGate VeraCode (BeadXpress) permettant le génotypage de plexes 48, 96, 192 et 384, et (iii) GoldenGate indexing permettant le génotypage simultané de 96 à 384 SNP. Il est à noter que cette technologie a été utilisée dans diverses applications, telles que la cartographie d'association, la cartographie des liaisons et l'analyse de la diversité des espèces cultivées telles que le riz (Thomson et al., 2012), le blé tendre (Akhunov et al., 2009), le blé dur (Trebbi et al., 2011), l'orge (Rode et al., 2012), ainsi que d'autres espèces cultivées.

#### ➤ **Génotypage avec la technologie KASPar (Competitive Allele-Specific PCR)**

La technologie KASPar est un système de génotypage développé par la plateforme Kbioscience UK (<http://www.kbioscience.co.uk/>) pour des analyses de polymorphisme spécifique d'allèle. Elle est basée sur une PCR compétitive spécifique d'un allèle pour un SNP donné, suivie de la détection du SNP via le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Le système de génotypage est simple, économique et flexible et ne nécessite pas un séquençage pour identifier les SNP (Chen et al., 2010). Cette technologie a été utilisée pour des études de diversité génétique et de cartographie génétique pour différentes espèces y compris le blé (Allen et al., 2011).

#### ➤ **Système de marqueurs à très haut débit**

Certaines approches modernes de la génétique et de la sélection, telles que les études d'association pangénomique (GWAS) et la sélection pangénomique (GWS) ou la sélection génomique (GS), nécessitent le génotypage de vastes populations comportant un grand

nombre de marqueurs. De telles études nécessitent des systèmes de marqueurs à très haut débit.

#### • **Génotypage utilisant «Illumina Infinium Assay»**

Infinium d'Illumina basée sur la technologie BeadChip™ est une technologie de génotypage de SNP à haute densité pour le génome entier permettant le génotypage simultané de centaines de milliers de SNP. L'un des avantages de ce système est qu'il permet à la fois de mesurer simultanément l'intensité du signal et les modifications de la composition allélique. Cette technologie implique l'utilisation simultanée de BeadChips de 12, 24, 48 ou 96 sections, chaque section d'un BeadChip contenant 1,1 million de billes portant des oligonucléotides ayant des fonctions connues (Steemers et Gunderson, 2007). Les tests Infinium ont déjà été développés et utilisés dans les plantes cultivées. Par exemple, dans le soja, la puce Illumina Infinium iSelectSoySNP50 contenant 44 299 SNP informatifs a été utilisée pour résoudre le problème de l'origine de l'hétérogénéité génomique chez William 82 cultivars de soja (Haun et al., 2011). Dans le maïs, une puce Infinium 50 K SNP contenant des SNP dans environ deux tiers de tous les gènes du maïs fournissant une densité de marqueur moyenne de 1 marqueur tous les 40 kb a été développée (Ganal et al., 2011). Malgré la robustesse et la disponibilité d'Infinium d'Illumina dans des plateformes qui pourrait faciliter l'application de marqueurs SNP dans l'amélioration génétique, cette technologie n'a pas été utilisée chez le blé.

#### • **Génotypage par séquençage (GBS)**

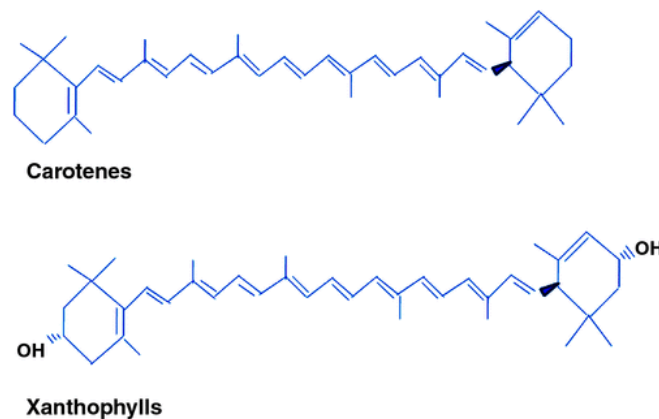
Le développement des plateformes de génotypage par séquençage (GBS) et l'évolution des technologies de séquençage de nouvelles générations (NGS) ont permis de fournir la découverte et la caractérisation inégalées de polymorphismes moléculaires grâce au potentiel à identifier et à génotyper simultanément les SNPs. Le principe de cette technologie consiste à l'utilisation d'enzymes de restriction (ER) pour réduire la complexité des génomes, suivie d'un séquençage ciblé de proportions réduites, de sorte que chaque marqueur puisse être séquencé avec une couverture élevée chez de nombreux individus à un coût faible et avec une grande précision. Globalement, le processus de GBS implique les étapes séquentielles suivantes: (i) isolement d'ADN de haute qualité, (ii) sélection d'une ER appropriée et de son adaptateur, (iii) préparation de banques pour NGS, (iv) séquençage à une extrémité de chaque librairie de 48 ou 96 plexes par les plateformes de NGS telles que Genome Analyzer II ou HiSeq 2000 d'Illumina Inc. ([www.illumina.com/systems.ilmn](http://www.illumina.com/systems.ilmn)), (v) évaluation / filtrage de la qualité des séquences, (vi) alignement des séquences, et (vii) codification des SNP.

Cette technologie est une approche de séquençage robuste, rentable, hautement multiplexée et pouvant être appliquée pour plusieurs espèces (Elshire et al., 2011). Récemment le GBS est devenu clairement la plateforme de choix pour le génotypage de marqueurs SNP et ne cesse d'être développé et utilisé dans de nombreuses cultures, y compris le blé dur pour la construction de carte génétique (Avni et al., 2014; Holtz et al., 2016), l'étude de la diversité génétique (Baloch et al., 2017).

## IX. Evaluation des caroténoïdes chez le blé dur

### a. Définition et propriétés des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles appartenant à la famille des terpénoïdes en C40 et sont responsables de la couleur jaune-orange chez les plantes et les microorganismes. Les animaux sont incapables de les synthétiser, ils doivent être procurés à travers leur alimentation. Les caroténoïdes comprennent deux classes chimiques (Figure 9): i) les carotènes, qui sont des hydrocarbures insaturés et sont représentés par deux formes, l' $\alpha$ -carotène et la  $\beta$ -carotène; et ii) les xanthophylles, qui sont des dérivés hydroxylés des carotènes munis d'un ou plusieurs groupes oxygénés et sont représentés principalement par cinq formes, la lutéine, la zéaxanthine, la violaxanthine, l'anthéroxanthine et la néoxanthine. Cent formes de caroténoïdes ont été décrits jusqu'à nos jours. Chez les plantes, les caroténoïdes sont situés dans des organites spécialisés dits plastides (Figure 10).



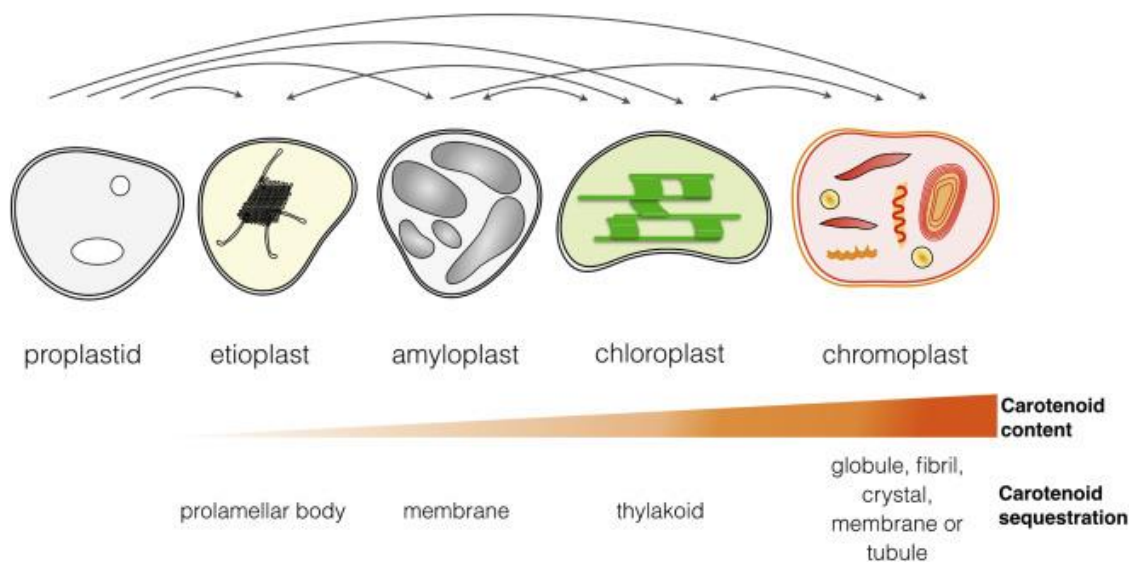
**Figure 9:** Structure de base des carotènes et des xanthophylles (Ficco et al., 2014).

Différents types de plastides présentent des capacités différentes de synthèse et de séquestration des caroténoïdes (Figure10). En effet on distingue chez les étioplastes des quantités limitées de caroténoïdes (lutéine et violaxanthine) à cause d'une faible expression de l'enzyme phytoène synthase (PSY) malgré leur importance dans la formation et la fonction

des étioplastes. Chez les amyloplastes, les caroténoïdes principalement sous forme de xanthophylles, lutéine, zéaxanthine et violaxanthine sont synthétisés et stockés avec des quantités faibles dans les membranes d'amyloplaste (Zhai et al., 2016) due à une concurrence dans les apports de carbone pour la synthèse d'amidon et de caroténoïdes (Cao et al., 2015).

Chez les chloroplastes des niveaux élevés de caroténoïdes dont les plus abondantes sont la lutéine, le  $\beta$ -carotène, la violaxanthine et la néoxanthine sont accumulés essentiellement dans les membranes thylakoïdiennes en fonctionnant principalement en tant que pigments photosynthétiques et photoprotecteurs (Ruban, 2016) et en assurant une meilleure adaptation aux stress environnementaux (Solovchenko et Neverov, 2017).

Par contre, chez les chromoplastes, la régulation de la biogenèse exerce une profonde influence sur l'accumulation de caroténoïdes. Ils sont considérés comme les principaux organites d'accumulation totale des caroténoïdes (Sun et al., 2018).

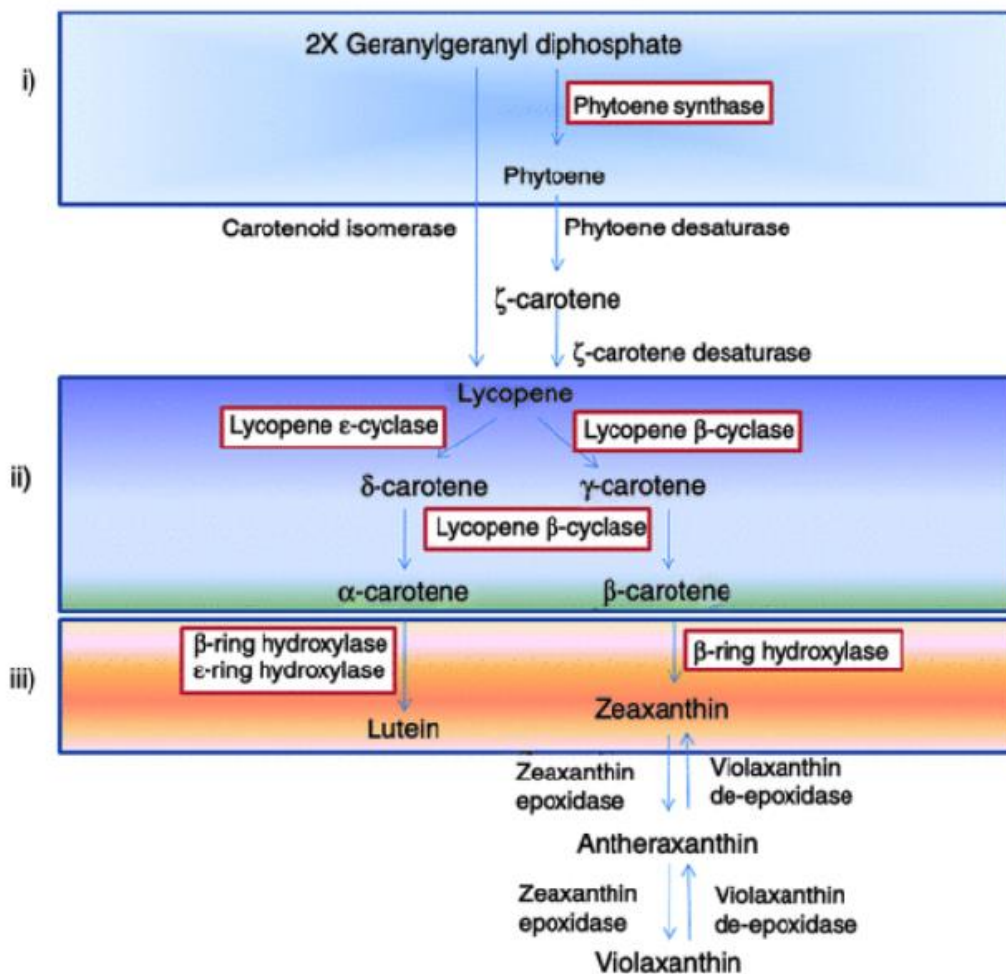


**Figure 10:** Accumulation des caroténoïdes dans les différents types de plastides chez les plantes (Sun et al., 2018).

## b. Voie de biosynthèse des caroténoïdes

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est très complexe. Elle a été presque complètement élucidée grâce aux travaux sur l'*Arabidopsis thaliana*, le riz, le maïs et certaines plantes ornementales (Moise et al., 2013). La première étape du processus de biosynthèse est la condensation de deux molécules de pyrophosphate de géranylgeranyle pour former du phytoène (Figure 11), après la catalyse par la phytoène synthase (PSY). A partir de ce point, le phytoène subit une série de quatre réactions de désaturation conduisant à la

production de lycopène, médiées par les quatre enzymes: La phytoène désaturase (PDS), la zéta-carotène isomérase (Z-ISO), la zéta-carotène désaturase (ZDS) et la caroténoïde isomérase (CRTISO). Une cyclisation du lycopène par l'intermédiaire de l'activité de la lycopène cyclase ( $\epsilon$ -LCY) génère la formation de l' $\alpha$ -carotène ou du  $\beta$ -carotène. Sous l'action des hydrolases, l' $\alpha$ -carotène se transforme en lutéine, et le  $\beta$ -carotène en zéaxanthine. Ce dernier peut subir une double époxydation réversible des cycles, qui est médiée par la zéaxanthine époxydase, pour former de la violaxanthine, précurseur de l'acide abscisique (ABA).



**Figure 11:** Voie de biosynthèse des caroténoïdes (Ficco et al., 2014).

### c. Importance des caroténoïdes

Chez les plantes, les caroténoïdes sont des pigments qui jouent un rôle important dans la photosynthèse (Hashimoto et al., 2016), et constituent la première barrière contre le stress photo-oxydant en protégeant l'appareil photosynthétique de plusieurs façons. En effet, les caroténoïdes atténuent les effets nocifs associés à une lumière intense en dissipant l'excès

d'énergie sous forme de chaleur, en piégeant les radicaux libres et en protégeant les membranes de la peroxydation lipidique (Peñuelas et Munné-Bosch, 2005).

Les caroténoïdes sont indispensables via le cycle des xanthophylles de désactiver les états de triplets des molécules de chlorophylle, de neutraliser l'oxygène singulet et d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent causer des dommages oxydatifs irréversibles suite aux différents types de stress biotiques et abiotiques (Figure 12).

Une autre fonction essentielle des caroténoïdes est de servir de précurseurs de phytohormones apocaroténoïdes telles que l'acide abscisique et les strigolactones qui sont des régulateurs de croissance, du développement et des réactions au stress chez les plantes (Hou et al., 2016).



**Figure 12:** Rôle des caroténoïdes dans la désactivation de l'état triplets des molécules de chlorophylle et de la neutralisation de l'oxygène singulet (<https://www.youscribe.com/catalogue/documents/art-musique-et-cinema/adaptation-et-acclimatation-de-plantes-a-l-39-environnement-418599>)

Il a été démontré que les caroténoïdes grâce à leur puissante fonction anti-oxydante, ils ralentissent le vieillissement des graines et retardent la perte de leur viabilité en limitant le niveau des radicaux libres et en réduisant l'oxydation des lipides.

Par ailleurs, les caroténoïdes et leurs dérivés sont associés à d'autres processus ayant un impact positif sur la nutrition et la santé humaine. Ils exercent principalement une fonction anti-oxydante et peuvent également agir par le biais d'autres mécanismes; par exemple, le  $\beta$ -carotène a une fonction pro-vitamine A, sa consommation est utile chez les personnes ayant une carence en vitamine A. La lutéine / zéaxanthine constitue le pigment maculaire de l'œil.

Des apports de lutéine contribuent à la réduction de la progression de la maladie oculaire maculaire liée à l'âge et de la cataracte. Il a été prouvé par des recherches récentes que la lutéine améliore les fonctions connectives chez les patients atteints d'Alzheimer et

prévient les maladies cardiovasculaires ainsi que certains types de cancer (Eggersdorfer et Wyss, 2018).

#### **d. Les pigments jaunes chez le blé dur**

Chez le blé dur, la teneur en caroténoïdes du grain ou pigments jaunes est due à la présence de xanthophylles dans l'endosperme, principalement la lutéine qui peut représenter 86 à 94% des caroténoïdes totaux, ainsi que d'autres caroténoïdes en faibles quantités allant de 3 à 5% tels que la zéaxanthine, la  $\beta$ -cryptoxanthine et les carotènes (l' $\alpha$ -carotène et le  $\beta$ -carotène) (Schwarz, 1978; Panfili et al., 2004; Fratianni et al., 2005; Lopes et al., 2015).

Au cours des dernières décennies, malgré que la teneur en caroténoïdes est relativement faible chez le blé dur comparativement à d'autres végétaux et fruits, toutefois la teneur en lutéine est plus élevée chez le blé dur (0.567-6.22 mg/kg de MS) que celle de l'emmer (0.451-5.21mg/kg MS), le spelt (1.03-2.71mg/kg MS) et le blé tendre (0.22-2.88 mg/kg MS) (Shewry et Hey, 2015).

Ces caroténoïdes en plus de leur rôle protecteur en tant qu'antioxydant et en tant que précurseurs de la vitamine A, la teneur en pigment jaune est responsable de l'intensité de la couleur jaune de la semoule qui est largement appréciée par les consommateurs et de ce fait est devenue un critère exigé sur le plan commerciale dans l'évaluation de la qualité de la semoule pour la fabrication des pâtes et d'autres produits alimentaires dérivés.

#### **e. Evaluation de la teneur en pigment jaune**

La lutéine est le principal caroténoïde dans le grain de blé (Lopes et al., 2015; Roselló et al., 2018) qui confère une couleur jaune naturelle à l'endosperme et aux produits dérivés de la farine. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer la teneur en pigments jaunes chez le blé dur. La couleur jaune de la farine est un indicateur indirect de la teneur en caroténoïde.

La couleur de la farine est mesurée par trois indices selon la commission internationale de l'éclairage (CIE, [www.cie.co.at/](http://www.cie.co.at/)): indice du jaune ( $b^*$ ), indice du brun ( $a^*$ ) et indice de vitrosité ( $l^*$ ) à l'aide d'un colorimètre, dont les valeurs positives de  $b^*$  indiquent le degré de jaunissement.

Il a été prouvé par plusieurs travaux qu'il existe une corrélation très significative entre la valeur du  $b^*$  nommé aussi indice du jaune (IJ) ou indice du pigment jaune et la teneur totale en caroténoïdes (TCC) (Blanco et al., 2011). L'indice du jaune (valeur du  $b^*$ ) est généralement utilisé pour une estimation rapide de la teneur totale en caroténoïdes et donc de

la teneur en caroténoïde chez les variétés de blé dur cultivées et joue un rôle important dans la détermination de la valeur commerciale et nutritionnelle des produits finis, ainsi que dans les programmes de sélection de germplasm pour les teneurs élevées en caroténoïdes.

Plusieurs autres méthodes ont été utilisées pour l'estimation de la teneur en caroténoïdes. Parmi les quelles la méthode d'extraction des caroténoïdes totaux avec l'eau saturée en n butanol (WSB) en utilisant la méthode référence AACC 14-50-01 dont la teneur de la lutéine est mesurée par un spectrophotomètre (Abdel-Aal et Rabalski, 2012). Une autre méthode plus précise, la chromatographie liquide de haute performance (HPLC), qui permet de déterminer la composition des différents types de caroténoïdes dans le grain et de les quantifier. Toutefois, étant donné que la majorité des caroténoïdes dans les grains de blé dur sont de la lutéine (Panfili et al., 2004), plusieurs travaux ont montré qu'il existe une corrélation positive et élevée de l'ordre de 0,94 à 0,98 entre la méthode HPLC et l'extraction des caroténoïdes totaux avec l'eau saturée en butanol pour l'estimation de la lutéine (Abdel-Aal et Rabalski, 2012; Fratianni et al., 2005).

En effet, les méthodes chromatographiques telles que la chromatographie liquide de haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UPLC) appliquées pour le blé pour estimer la composition des caroténoïdes sont des méthodes coûteuses et nécessitent beaucoup de temps. Généralement pour évaluer une grande collection de blé dur pour le contenu en caroténoïdes, les méthodes indirectes telles que l'indice du jaune ( $b^*$ ) ainsi que l'extraction avec l'eau saturée en n butanol (WSB) sont des méthodes rapides, efficaces et rentables. L'indice du jaune est largement utilisé par les sélectionneurs et les industriels.

## **X. Contrôle génétique de la teneur en pigment jaune**

La teneur des caroténoïdes est un trait quantitatif contrôlé par plusieurs gènes à effet additif (Tableau 4). Ce caractère possède une héritabilité élevée allant de 0.85 à 0.97 (Elouafi et al., 2001; Clarke et al., 2006; Van Hung et Hatcher, 2011).

Les progrès significatifs réalisés dans la compréhension de la voie de biosynthèse, la connaissance des mécanismes de régulation ainsi que la maîtrise des techniques d'estimation des caroténoïdes dans le grain de blé dur ont facilité l'identification de certains gènes et de protéines affectant l'expression et la teneur en pigments jaunes chez le blé dur (Zhai et al., 2016). Ces gènes sont localisés sur certains groupes de chromosomes et sont associés essentiellement à l'expression des enzymes biosynthétiques des caroténoïdes.



Le gène PSY1 est considéré comme un gène candidat majeur responsable de la variation de la teneur en pigments jaunes (TPJ) dans les grains de blé (Patil et al., 2008). Ce gène code pour la phytoène synthase qui est le plus important élément régulateur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Moise et al., 2013). Plusieurs études ont montré et validé que les loci PSY1A et PSY1B de la phytoène synthase sont de puissants gènes candidats qui co-ségrèguent avec des QTL associés à la teneur en pigments jaunes (TPJ) et à l'indice du jaune (valeur du b\*) et sont situés respectivement sur les chromosomes 7AL et 7BL (Pozniak et al., 2007; He et al., 2008; Patil et al., 2008; Zhang et al., 2008; Singh et al., 2009).

D'autres études ont indiqué la contribution d'autres gènes affectant la TPJ dans les régions distales des chromosomes 7A et 7B, tels que le gène de la sous-unité géranylgeranyl transférase I (GGT) qui a été cartographié dans les régions distales du chromosome 7BL (Crawford et al., 2008). Ce gène code pour une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse du squelette terpénoïde, fournissant le précurseur du géranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP) pour la biosynthèse des caroténoïdes, et pourrait constituer un gène candidat supplémentaire.

De plus, le gène Cat3-A1 situé sur la partie distale du chromosome 7AL, codant pour une enzyme catalase qui régule l'accumulation de peroxyde d'hydrogène dans le grain de blé en développement et agit sur la teneur de la lutéine (Crawford et Francki, 2013b; Li et al., 2015a).

Le gène LCYE responsable de la conversion du lycopène en lutéine a été considéré également comme un gène candidat dont plusieurs loci sont localisés sur les chromosomes 3A et 3B affectent la variation de l'indice du jaune (valeur du b\*) et de la teneur en lutéine (Crawford et Francki, 2013a).

Le gène ZDS localisé sur le chromosome 2A codant pour l'enzyme  $\delta$  Zeta carotène désaturase qui est une enzyme clé de la biosynthèse des caroténoïdes a montré également une association élevée avec les teneur en pigments jaunes dans le grain de blé dur (Dong et al., 2012).

Plus récemment, deux gènes codant pour la diphosphomévalonate décarboxylase (DMAPD) et l'aldéhyde oxydase (AO) ont été identifiés, co-localisés avec le QTL majeur pour la teneur en pigments jaunes (TPJ), respectivement sur les chromosomes 5BL et 7AL (Colasuonno et al., 2014). Six gènes candidats liés à la biosynthèse du squelette terpénoïde se situent dans les intervalles QTL associés à quatre traits liés à la couleur chez le blé tendre (Zhai et al., 2016).

**Tableau 4:** Gènes et marqueurs moléculaires associés à la teneur en pigments jaunes sur les génomes A et B du blé.

Locus	Marqueur	Allèle	Chromosome	Référence
Psy-A1	YP7A	PsyA1a, PsyA1b	7AL	He et al., 2008; Ravel et al., 2013.
	YP7A-2	PsyA1a, PsyA1b, PsyA1c	7A	He et al., 2009; Ravel et al., 2013; Crawford et al., 2011
	Psy-A1_STS	Psy1-A1o Psy-A1e, Psy-A1p, Psy-A1a Psy-A1c, Psy-A1t	7A	Singh et al., 2009 Crawford et al., 2011
	Psy-A1_R_49	Psy-A1a, Psy-A1k, Psy-A1ka, Psy-A1kb, Psy-A1e, Psy-A1ca, Psy-A1cb, Psy-A1p, PsyA1ra, Psy-A1rb, Psy-A1j, Psy-A1t	7A	Ravel et al., 2013
Psy-B1	YP7B-1	Psy-B1a, Psy-B1b	7BL	He et al., 2009a; Ravel et al., 2013
	YP7B-2	Psy-B1c		He et al., 2009b
	YP7B-3	Psy-B1d		He et al., 2009b
	YP7B-4	Psy-B1e Psy-B1a, Psy-B1aa, Psy-B1b, Psy-B1ca, Psy-B1m, Psy-B1d		He et al., 2009b Ravel et al., 2013
Zds-A1	YP2A-1	Zds-A1a, Zds-A1b	2AL	Dong et al., 2012
e-LCY (lutein)		e-LYC3Aa, e-LYC3Ab	3A	Crawford et Francki, 2013
TaCat A1	TaCat A1	TaCat A1a TaCat A1b TaCat A1c	7AL	Li et al., 2015

## XI. Effet des conditions environnementales sur la teneur en pigments jaunes

Les critères de qualité du grain du blé dur ne cessent d'évoluer en fonction de la pression du marché et des préférences des consommateurs. Cette qualité est tributaire des variations dues aux conditions climatiques. Ces conditions prédominent surtout dans les régions du bassin méditerranéen, dont la Tunisie fait partie, qui sont caractérisées par une irrégularité des pluies, des pics de température touchant la phase terminale du cycle de développement de la plante, et une prolongation des années de sécheresse. Dans ces régions, le blé dur est une source de protéines, de glucides et de micronutriments tels que les minéraux, les vitamines et les antioxydants, y compris les caroténoïdes. Le développement de programmes de bio fortification et d'amélioration génétique visant les caroténoïdes est recommandé vu leur importance dans la santé, la nutrition, et le commerce.

Les études menées pour évaluer les caroténoïdes dans plusieurs environnements et sous différentes conditions de stresses abiotiques sont rares.

En effet, tous les travaux effectués pour évaluer les différents traits de qualité ont montré que la teneur en pigments jaunes chez le blé dur est hautement héritable et que l'effet génétique est prédominant (Elouafi et al., 2001; Clarke et al., 2006). Toutefois, l'effet de l'environnement ainsi que les facteurs influençant la variabilité des teneurs en pigments jaunes restent encore non élucidés clairement (Schulthess et al., 2013). Certains auteurs ont démontré que l'augmentation de la température au cours de la phase de remplissage du grain augmente la teneur en pigments jaunes qui pourrait être expliquée par une réduction du poids de mille grains, ce dernier engendre un effet de concentration des caroténoïdes dans le grain, et que les précipitations ainsi que l'irrigation n'ont aucun effet sur ce trait (Rharrabti et al., 2003; Clarke et al., 2006; Guzmán et al., 2016). Au contraire, Güler, (2003) a plutôt montré que l'irrigation est associée à une augmentation des teneurs en pigments jaunes (Güler, 2003). D'autres auteurs ont plutôt suggéré que le stress hydrique augmente la concentration du pigment jaune (Guttieri et al., 2001; Pena et Pfeiffer, 2005; Fratianni et al., 2013; Li et al., 2013).

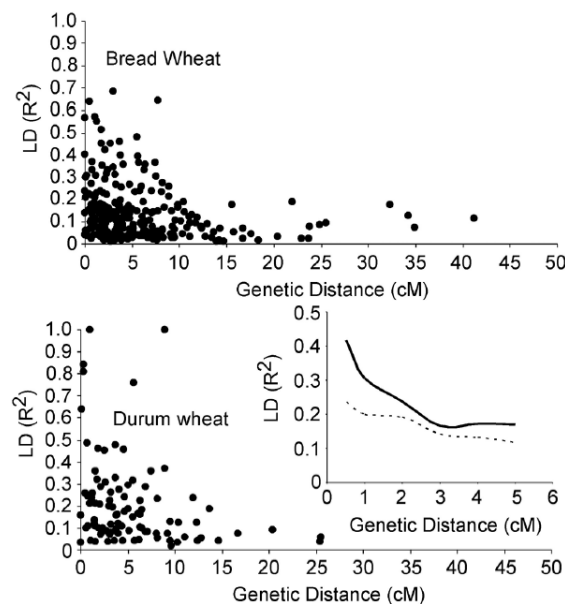
## **XII. Etude d'association pan- génomique (GWAS)**

L'étude d'association pan-génomique ou GWAS «Genome-wide association mapping» est considérée comme une stratégie complémentaire ou alternative à la cartographie des QTL bi- parentale traditionnelle. Elle est basée sur le déséquilibre de liaison (LD pour « linkage disequilibrium ») (Flint-Garcia et al., 2003; Somers et al., 2007), pour identifier les associations entre génotype et phénotype dans des populations constituées d'individus non apparentés (Remington et al., 2001; Yu et Buckler, 2006). Cette technologie utilise les événements de recombinaison qui se produisent tout au long de l'histoire évolutive d'un matériel génétique. Le GWAS présente un certain nombre d'avantages par rapport à la cartographie de liaison traditionnelle (Sukumaran et Yu, 2014), notamment l'utilisation de large populations locales, le potentiel d'augmenter la résolution des QTL, la possibilité de détecter un plus grand nombre d'allèles qui est tributaire de la nature de la population utilisée, et la réduction du temps de la recherche en éliminant les étapes de développer des populations bi-parentales (Flint-Garcia et al., 2003; Yu et Buckler, 2006). Plusieurs types de populations ont été utilisés dans des études d'association chez le blé dur telles que les NILS, les RILs et plus rarement les populations locales qui sont caractérisées par une richesse allélique et pourrait être exploitées dans les programmes d'amélioration génétique. pour des traits complexes ayant un intérêt économique.

Plusieurs études antérieures ont montré que les marqueurs de type SSR et de type SNP sont les marqueurs de choix lors des études d'association, en raison de leur capacité à détecter la variabilité génétique (Stich et al., 2006). Avec le développement de plateformes de génotypage à haut débit, le GWAS est devenu de plus en plus utilisée pour identifier avec précision des locus responsables de caractères complexes y compris la teneur en pigments jaunes chez le blé dur, en offrant une densité de marqueurs plus élevée, une résolution plus élevée et une meilleure couverture du génome (Cui et al., 2017). Toutefois, malgré que les premières études d'association avaient démontré un inconvénient potentiel d'identifier de fausses associations positives (erreurs de type I) en ne tenant pas compte de la structure de la population ainsi que la relation entre les individus, l'approche GWAS est suggérée comme une méthode efficace pour étudier la base génétique des caractères complexes en détectant plus de loci (N'Diaye et al., 2018), en capturant les interactions épistatiques et en réduisant le taux d'erreur de type I.

## 1. Résolution de la cartographie d'association

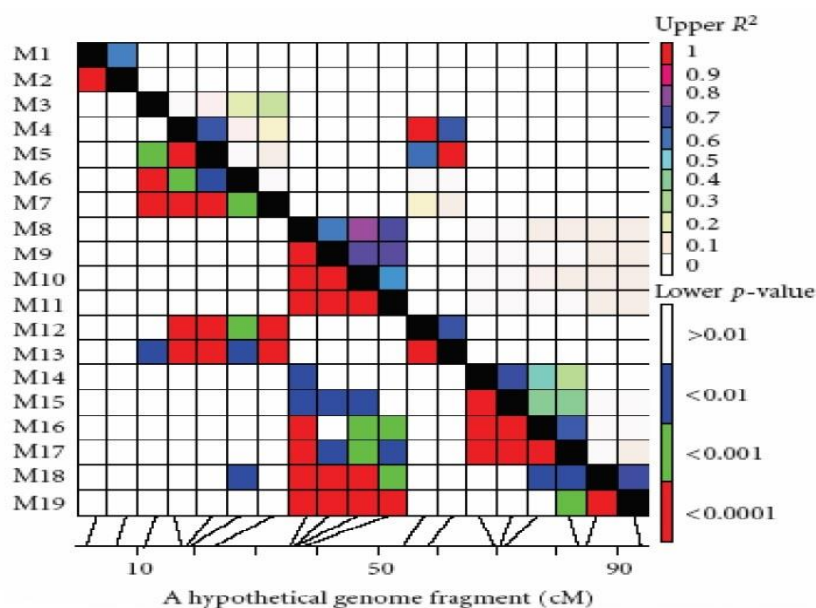
Le degré de résolution de la cartographie d'association dépend de l'étendue du LD (Remington et al., 2001). Une résolution est considérée élevée lorsque le LD diminue rapidement avec l'augmentation de la distance génétique (Figure 13).



**Figure 13:** Étendue du déséquilibre de liaison chez le blé tendre et le blé dur. La chute du LD est visualisée en traçant LD ( $R^2$ ) en fonction de la distance génétique (cM) (Somers et al., 2007).

Le déséquilibre de liaison est une mesure des fréquences alléliques par paire sur deux sites polymorphes, où les allèles hautement corrélés seraient en déséquilibre de liaison (Nordborg et Tavaré, 2002; Gaut et Long, 2003). Le LD est couramment mesurée à l'aide de  $D'$  (le coefficient de déséquilibre de liaison normalisé) et/ou de  $R^2$  (le coefficient de corrélation entre les deux locus) (Gupta et al., 2005; Zhao et al., 2005; Somers et al., 2007). La mesure du  $R^2$  est privilégiée pour la détermination de la corrélation des marqueurs avec le QTL d'intérêt et la résolution de l'étude d'association, en raison de sa capacité à rendre compte de l'histoire mutationnelle et recombinante (Flint-Garcia et al., 2003), ainsi que du fait qu'il est moins sensible à la taille de la population alors que la mesure  $D'$  reflète seulement l'historique des recombinaisons et présente une sensibilité à la taille de la population.

Deux méthodes sont utilisées pour visualiser le LD: i) la première méthode est basée sur les courbes de chute du DL «LD decay plots» (Figure 13), qui sont établies en utilisant la valeur de  $R^2$  ou de  $D'$  en fonction de la distance génétique (en cM) ou physique (en pb) entre toutes les paires des loci pour chaque chromosome ou pour le génome entier. La distance à laquelle le DL chute à des valeurs de  $R^2$  inférieures à 0.1 jusqu'à 0.2 est considérée comme la distance dans laquelle le DL est conservé par liaison génétique et cette distance est proportionnelle à la recombinaison (Flint-Garcia et al., 2003). ii) la deuxième méthode est basée sur les matrices de déséquilibre «Disequilibrium matrix» utilisant comme vecteur les valeurs du  $R^2$  et leurs probabilités et permet de visualiser les blocs de loci qui sont en DL significatif (Figure 14).



**Figure 14:** Matrice de déséquilibre de liaison hypothétique. Les valeurs DL sont affichées par paires de loci, affichant  $R^2$  au-dessus de la diagonale et leurs probabilités («p

values») correspondantes au-dessous de la diagonale. Chaque cellule représente la comparaison de deux paires de loci, les codes couleurs indiquent la présence d'un DL significatif. Un code à barre coloré pour les niveaux et le seuil de signification pour les deux diagonales est affiché (Abdurakhmonov et Abdukarimov, 2008).

## **2. Facteurs affectant le déséquilibre de liaison (DL)**

Plusieurs facteurs génétiques affectent l'étendue du DL. Certains d'entre eux augmentent le DL tels que:

i) le mode de reproduction autogame dans une population où les individus sont homozygotes à un locus donné et le taux de recombinaison est plus faible (Morrell et al., 2005; Rostoks et al., 2006).

ii) la sélection qui engendre la dérive génétique par une réduction de la taille de la population, l'augmentation du taux d'apparenté entre les individus sélectionnés et donc des fréquences alléliques favorables, et aussi l'augmentation de l'effet d'auto-stop (hitchhiking) responsable de la fixation des fréquences des allèles flanquant les loci sous sélection (N'Diaye et al., 2018).

iii) la structure de la population engendrée par des individus qui diffèrent en terme de fréquences alléliques et qui constituent des sous populations. Cela pourrait engendrer de fausses associations entre marqueurs et phénotype due à une surestimation du DL (Pritchard et Rosenberg, 1999).

iv) l'admixture («admixture») due à la migration entre populations divergentes ayant chacune des fréquences alléliques propres, et l'hybridation entre ces populations, même si elles sont en équilibre de liaison crée un important déséquilibre de liaison qui décroît d'une génération à une autre.

Toutefois, d'autres facteurs diminuent ce déséquilibre de liaison dont principalement le taux élevé de recombinaison et de mutation. En effet l'étendue du DL n'est pas uniforme sur tout le génome et pour toutes les populations.

Plusieurs travaux ont démontré qu'il existe une variabilité du DL entre les chromosomes telles que pour le blé tendre de 1 cM sur le chromosome 2D à 5cM sur le chromosome 5A (Breseghello et Sorrells, 2006) et pour le blé dur un LD sur plusieurs régions génomiques de 2-3 cM (Somers et al., 2007) jusqu'à 20 cM (Maccaferri et al., 2005). Cette différence est due à des recombinaisons à l'intérieur du génome. Pour le blé aussi bien tendre que dur, les

recombinaisons se font préférentiellement dans les régions distales qui expliqueraient les niveaux faibles de DL observés dans ces régions.

### **3. Structure de la population**

La structure d'une population est la résultante de plusieurs facteurs tels que la sélection, la migration, le flux génétique, l'admixture et la mutation. Les analyses de cartographie d'association (AM) et/ou pangénomique (GWAS) sont affectées par les relations entre les individus au sein des populations et entre celles-ci. En effet, plusieurs études ont détecté de fausses associations positives, qui sont responsables des erreurs de type I suite à une surestimation du DL due à la non prise en compte de la structure de la population (Flint-Garcia et al., 2003; Gupta et al., 2005).

Différentes méthodes ont été utilisées pour estimer la structure de la population. Certaines d'entre elles sont basées sur une classification d'individus en estimant la distance génétique par paire entre individus (Nei, 1972). D'autres approches sont plutôt basées sur la modélisation bayésienne telles que les méthodes utilisant l'analyse structure via le logiciel structure ou l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC), où les fréquences alléliques sont utilisées pour estimer la probabilité qu'un individu appartienne à une sous-population particulière. Les différentes sous-populations inférées peuvent être intégrées dans des modèles statistiques pour des études de cartographie d'association (Pritchard et al., 2000) et de GWAS chez plusieurs espèces cultivées, tels que l'orge (Rostoks et al., 2006) et le blé (Breseghello et Sorrells, 2006).

### **XIII. Association pan génomique pour la teneur en pigment jaune**

Au cours des dernières décennies, chez le blé dur, de nombreux locus à caractères quantitatifs (QTL) liés à la couleur de la farine et à la teneur en pigments jaunes du grain ont été identifiés sur différents chromosomes à l'aide de populations biparentales (Patil et al., 2008; Zhang et al., 2008; Blanco et al., 2011; Roncallo et al., 2012; Crawford et Francki, 2013a; Colasuonno et al., 2014). Il a été rapporté depuis 2003 jusqu'à 2016 l'identification de 37 QTL pour la couleur jaune de la semoule (IJ) et 74 QTL pour la teneur en pigments jaunes (Roselló et al., 2018). Deux QTL majeurs localisés sur les parties distales des chromosomes 7A (Psy-A1) et 7B (Psy-B1) sont responsables de la plus importante variabilité phénotypique de la teneur en pigment dans le grain aussi bien du blé dur que du blé tendre (Campos et al., 2016; Patil et al., 2018). Il existe également d'autres QTL mineurs contribuant à cette variation phénotypique du pigment jaune détectés sur les chromosomes 3A, 4A et 5A (Hessler

et al., 2002), 2A, 4B et 6B (Pozniak et al., 2007), 1A, 3B et 5B (Patil et al., 2008), 4B et 6B (Zhang et al., 2008), 3B et 5B (Howitt et al., 2009), 1A, 1B, 3B et 4A (Zhang et Dubcovsky, 2008). Cependant, peu de QTL identifiés ont été utilisés pour la sélection assistée par marqueurs dans les programmes d'amélioration génétique pour ce trait. La plupart des études d'association ont plutôt validé des QTL précédemment décrits sur des chromosomes spécifiques, tels que les travaux de Reimer et al., (2008) utilisant 93 accessions de blé dur issues de programmes d'amélioration de différentes origines, qui ont confirmé des QTL déjà connus sur les chromosomes du groupe 7 et ont identifié de nouveaux marqueurs sur les chromosomes des groupes 1, 2 et 3 (Reimer et al., 2008).

Récemment, le développement des plateformes de génotypage à très haut débit couvrant tout le génome ont montré leurs performances aussi bien dans des études de diversité génétique et de structure de population ainsi que le GWAS pour identifier des QTL liés aux différents traits d'intérêt économique chez plusieurs espèces.

Chez le blé, le GWAS a été démontré efficace pour identifier de nouvelles régions génomiques et disséquer la base génétique d'importants caractères morphologiques (Kidane et al., 2017), agronomiques, notamment le rendement en grains et ces composantes (Sukumaran et al., 2018b), l'architecture des racines (Alahmad et al., 2019), la tolérance à la sécheresse et à la température (Qaseem et al., 2018), ainsi que la qualité du grain et de la semoule (Fiedler et al., 2017; Bhatta et al., 2018) et la teneur en pigments jaunes dans le grain et la semoule (Kumar et al., N'Diaye et al., 2017; 2018; N'Diaye et al., 2018). Toutefois, les dernières études des GWAS pour la teneur en pigments jaunes dans le grain et la semoule du blé dur ont utilisé des lignées issues de programmes d'amélioration (N'Diaye, et al. 2017; N'Diaye, et al. 2018). Des études rares ont utilisé les populations locales connues par leurs richesses alléliques (Roselló et al., 2018) ainsi que l'interaction génotype - environnement pour détecter et valider des QTL associés à la teneur en caroténoïdes.



## **CHAPITRE 2: Matériels et méthodes**

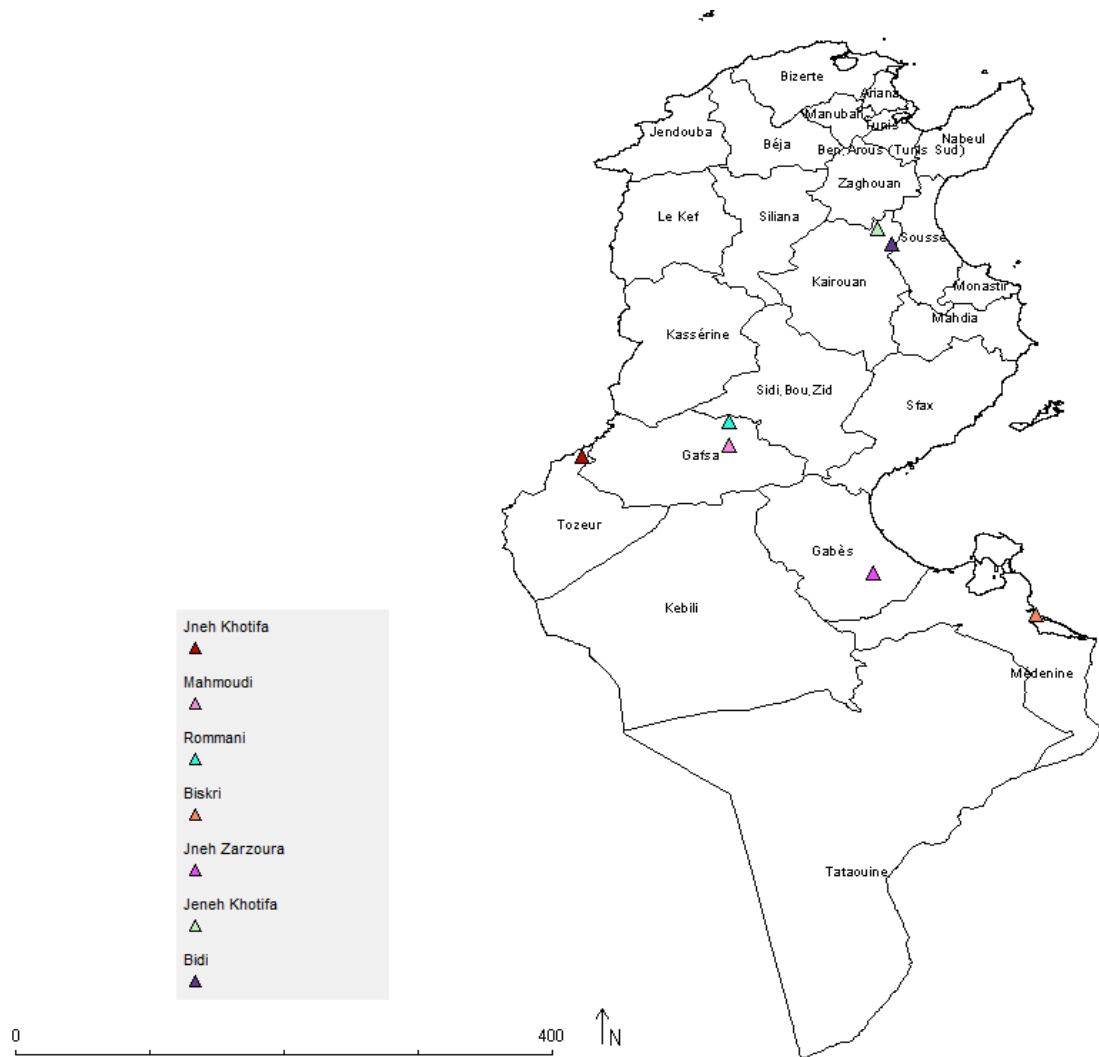
## I. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de 3 ensembles de matériel génétique de blé dur:

**Ensemble 1:** Un total de 189 lignées pures issues de six populations locales ou «landraces» de blé dur, connues sous le nom de Mahmoudi, Rommani, Jenah Zarzoura, Bidi, Jenah Khotifa et Biskri (Tableau 5), collectées dans l’Oasis de Mareth, le Centre et le Sud de la Tunisie entre 2009 et 2010 (Figure 15). Ces accessions sont conservées à la Banque Nationale des Gènes de la Tunisie (BNGT). Les populations locales Bidi, Mahmoudi, Rommani et Jenah Zarzoura sont représentées par 30 lignées chacune. Les populations locales Biskri et Jenah Khotifa sont représentées par deux populations chacune: Biskri1 (30 lignées), Biskri2 (7 lignées), Jenah Khotifa1 (29 lignées) et Jenah Khotifa2 (4 lignées).

**Tableau 5:** Liste et taille des populations locales de blé dur Tunisien collectées dans l’Oasis de Mareth, le Centre, et le Sud Tunisien (Ensemble 1).

Populations locales	Nombre des lignées	Province
Bidi	30	Kairouan
Biskri1	30	Gafsa (Djebel ouled ouhiba)
Biskri2	7	Medenine (Zarzis)
Jenah Khotifa1	29	Kairouan
Jenah Khotifa2	4	Tozeur (El Frid)
Jenah Zarzoura	30	Matmata (Oasis of Mareth)
Mahmoudi	30	Gafsa (Snad)
Rommani	30	Gafsa (Djebel ouled ouhiba)
Total	189	



**Figure 15:** Localisation géographique des populations locales de blé dur collectées dans l’Oasis de Mareth, le Centre et le Sud Tunisien (Ensemble 1).

**Ensemble 2:** Un total de 40 accessions (Tableau 6) constitué de six variétés améliorées tunisiennes, sept lignées élites de l’ICARDA/CIMMYT et 27 populations locales de blé dur tunisien (15 d’entre elles sont représentées par une accession chacune; Jenah Khotifa, Biskri et Chetla sont représentées par deux accessions chacune; Bidi et Rommani sont représentées par trois accessions chacune).

**Tableau 6:** Liste des populations locales de blé dur tunisien, des variétés modernes tunisiennes et des lignées élites de l'ICARDA/CIMMYT.

Populations locales	N	Origine	ID	Pedigree
Agili	1	BNGT	IG 23903	-
Aouadi	1	BNGT	IG 23908	-
Arbi	1	BNGT	IG 23903	-
Azizi	1	BNGT	IG 23904	-
Bayadha	1	BNGT	IG 23905	-
Bidi	3	BNGT	IG 19553; IG 23906; IG 23929	-
Biskri	2	BNGT	IG 19551; IG 23907	-
Chetla	2	BNGT	IG19555; IG19557	-
Chili	1	BNGT	IG 23908	-
Derbessi	1	BNGT	IG 23909	-
Hmira	1	BNGT	IG 23910	-
Jneh khotifa	2	BNGT	IG 23915; 999	-
Mahmoudi	1	BNGT	IG 23911	-
Richi	1	BNGT	IG 23912	-
Rommani	3	BNGT	IG 19552; IG 19554; IG 19558	-
Sbei	1	BNGT	IG 23913	-
Souri	1	BNGT	IG 23914	-
Swabei	1	BNGT	IG 23916	-
algia				
Tounsia	1	BNGT	IG 19559	-
Ward bled	1	BNGT	IG 23917	-
Inrat69 *	1	BNGT	IG 23919	Mahamoudi/Kyperounda
Karim *	1	BNGT	IG 23924	Jori“S”/Anhinga“S”//Flamingo“S”
Khiar *	1	BNGT	IG 23922	Chen/Altar 84
OmRabii*	1	BNGT	IG 23921	Jori C69/ Hau
Nasr *	1	BNGT	IG 23923	GoVZ512/Cit//Ruff/Fg/3/Pin/Gre//Trob
Maali*	1	BNGT	IG 23920	CMH80A.1060/4/T.TURA/CMH74A.370//CMH77.774/3/ YAV79/5/RAZZAK/6/ DACK/YEL//KHIAR
<b>ICARDA/CIMMYT elite lines</b>				
	1	ICARDA	MCHCB-102	OmRabi3/T.urartu500651/ch5//980947/3/Otb4//Oss11/Rf m6
IcaJoudy1*	1	ICARDA	MCHCB-100	Atlast1/961081//Icasyr1
Nachit *	1	ICARDA	DAWRYT-106	Ameddkul1/T. <i>dicoccoides</i> Syrian collection//Loukos
Zeina4 *	1	ICARDA	MCHCB-154	GdoVZ512/Cit//Ruff/Fg/3/Src3
Louiza *	1	ICARDA	--	Rscn39/Til1
Ammar 6 *	1	ICARDA	IDYT37-5	ICAMORTA0472/Ammar7
Ammar 10 *	1	ICARDA	MCHCB-99	Lgt3/Bicrecham1

\*: Accessions marquées avec\* sont des lignées avancées; --: Lignées hybrides sans identifiant; - : Accessions sans pedigree, ID: Identifiant de l'accession; NGBT: Banque Nationale des Gènes de Tunisie; ICARDA: «International center for Agricultural research in Dry Areas».

**Ensemble 3:** (Tableau 7) Un total de 207 populations locales de blé dur collectées de différentes régions de la Méditerranée et de l'Asie occidentale: Maroc (17 accessions), Algérie (14 accessions), Tunisie (13 accessions), Libye (9 accessions), Égypte (12

accessions), Liban (10 accessions), Syrie (11 accessions), Jordanie (11 accessions), Palestine (10 accessions), Irak (11 accessions), Iran (12 accessions), Afghanistan (16 accessions), Yémen (10 accessions), Grèce (18 accessions), Chypre (10 accessions), Italie (12 accessions) et Éthiopie (11 accessions). Ces accessions sont choisies au hasard dans la banque de gènes de l'ICARDA (Tableau 7).

**Tableau 7:** Nombre des accessions de populations locales de blé dur originaires de différentes régions de la Méditerranée et de l'Asie Centrale reçues de la banque de gène de l'ICARDA (Ensemble 3).

Origine Géographiques	Nombre des accessions
Afghanistan	16
Chypre	10
Algérie	14
Egypte	12
Ethiopie	11
Grèce	18
Iran	12
Irak	11
Palestine	10
Italie	12
Jordanie	11
Liban	10
Lybie	9
Maroc	17
Syrie	11
Tunisie	13
Yemen	10

## II. Site et Dispositif expérimental

Les essais expérimentaux ont été menés en plein champs dans deux sites contrastés:

**La station** de l'Institut National de Recherches Agronomiques de Tunis (INRAT) à Mornag: Ce site appartient à l'étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver doux, la pluviométrie est entre 400 à 450 mm /an. Le sol est caractérisé par une texture argilo-limoneuse ayant un bon drainage et une bonne perméabilité.

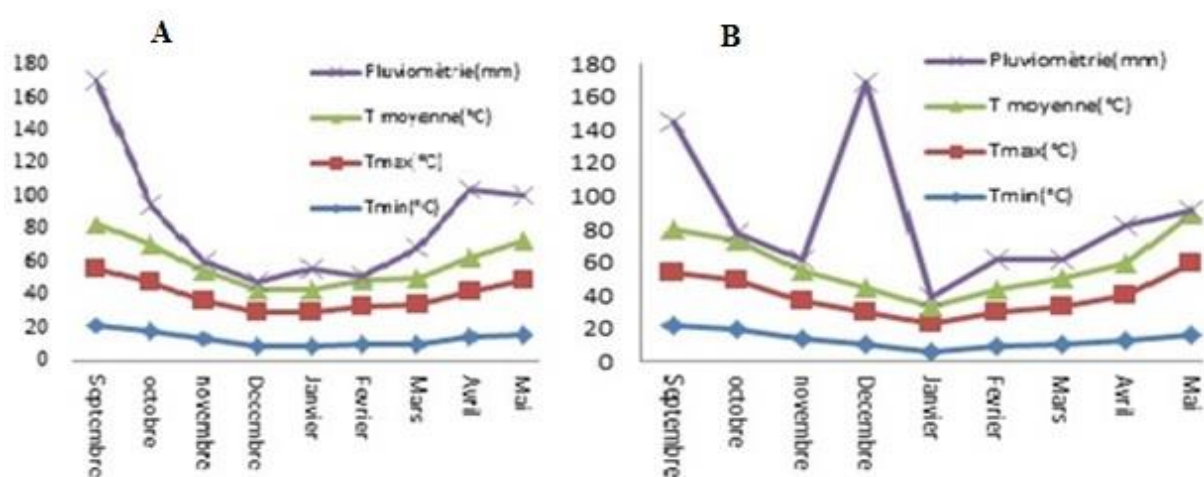
**La station** de l'Institut National des Grandes Cultures (INGC) de Chebika, Kairouan: Ce site appartient à l'étage bioclimatique aride supérieur à hiver froid, la pluviométrie est +/- 200 mm/an (Figure 16). Le sol est caractérisé par une texture limoneuse fine avec une bonne capacité de rétention d'eau. Toutefois, un manque de précipitation et une élévation de température engendrent un dessèchement rapide du sol causant des fentes de retrait qui pourraient limiter l'approvisionnement en eau à la culture.

Le dispositif expérimental utilisé dans les deux stations est le dispositif alpha lattice simple avec deux répétitions utilisant la formule suivante:

$$T=S*K$$

T= Nombre des géotypes; S= Nombre de blocs par répétition; K= Nombre de plots par bloc.

Dans notre étude le nombre de géotypes (T) utilisé est de 196 accessions composé de 189 lignées issues des populations locales (Ensemble 1 dans matériel végétal) et 7 lignées élités de l'ICARDA/CIMMYT, le nombre de blocs par répétition (S) est 14 et le nombre de plot par bloc (K) est 14.



**Figure 16:** Variation des températures minimales, maximales et des précipitations à la station de l'INGC Chebika, Kairouan durant (A) La campagne agricole 2015-2016 et (B) La campagne agricole 2016-2017 (Source INGC, Chebika Kairouan).

### III. Conduite de l'essai

Un premier essai de 196 géotypes randomisés en 14 blocs et 14 plots par bloc dans chaque répétition a été conduit en mode pluvial à la station de l'INRAT à Mornag pendant deux campagnes agricoles successives 2015 (environnement 1) et 2016 (environnement 2).

Le même essai a été installé à la station INGC à Chébika, Kairouan sous deux régimes hydriques contrôlés par un système d'irrigation goutte à goutte pendant deux campagnes agricoles 2016 et 2017. Le premier régime hydrique est à 100% de l'évapotranspiration totale (ETR) permettant une humidité du sol optimale (environnement 3, année 2016; environnement 4, année 2017) et le deuxième régime hydrique appliqué est à 25% de

l'évapotranspiration totale (ETR) induisant des conditions de stress hydrique à la culture étudiée (environnement 5, année 2016; environnement 6, année 2017).

Le sol a été préparé avec un labour profond croisé, un amendement de 100 kg/ha de DAP et un désherbage manuel pour les monocotylédones et chimique pour les dicotylédones.

Le semis à raison de 350 grains/m<sup>2</sup> a été effectué manuellement à la fin du mois de Novembre à la station de Chébika, Kairouan pour les deux campagnes 2016 et 2017, soit le 20 Novembre et 25 Novembre, respectivement. Tandis que la période de semis avec la même dose à la station de Mornag a été accomplie au début du mois de décembre (le premier Décembre pour les deux campagnes agricoles 2015 et 2016). La taille des plots est de 2 m<sup>2</sup> (Quatre lignes de 2 mètre de long avec un espacement de 0.25 mètre).

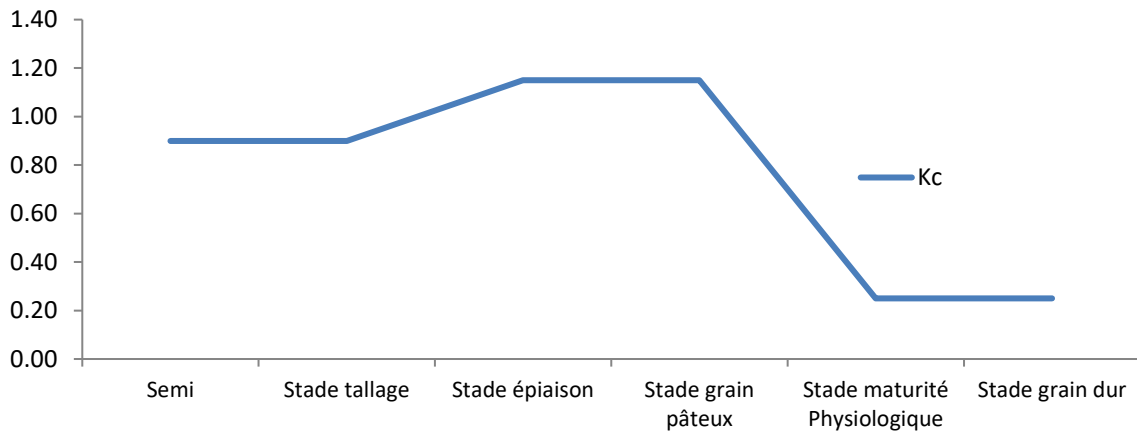
Trois apports fractionnés du fertilisant amonitre (33%N) ont été apportés à raison de 100 kg/ha au début de la phase tallage, 150 kg/ha au début de la phase montaison et 150 kg/ha au stade gonflement des épis. Des traitements antifongique et insecticide ont été appliqués au cours du cycle de développement des génotypes utilisés afin de contrôler les dégâts que peuvent causer les maladies fongiques redoutables telles que la rouille, l'oïdium et la fusariose et d'éviter les pertes dues aux insectes tels que les pucerons.

#### **IV. Gestion de l'irrigation des essais à la station INGC de Chebika, Kairouan**

Le contrôle des apports en irrigation d'eau pour les deux essais installés à la station de l'INGC, Chébika Kairouan est établi en fonction de la réserve en eau stockée dans le sol, des précipitations et de l'évapotranspiration réelle (ETR). La gestion des apports en eau a été assurée par la station.

$ETR = K_s * ETM$ ; où  $K_s$  est le coefficient de stress; estimé à 1 dans les conditions optimales et à 0.25 en cas de stress hydrique; l'ETM est l'évapotranspiration maximale.

$ETM = K_c * ETo$ , où  $K_c$  est le coefficient cultural qui varie de 1.15 à 0.25 durant le cycle de croissance de la culture des céréales (Figure 17) et l'ETo est l'évapotranspiration de référence.



**Figure 17:** Evolution du coefficient cultural ( $K_c$ ) au cours du cycle de développement de la culture du blé dur. Source: INGC, Chébika Kairouan.

Les irrigations ont été apportées tous les 10 jours à partir de l'irrigation initiale pendant la phase début tallage appliquée pour tous les essais (Tableau 8, tableau 9).

Les apports sont calculés de la manière suivante:

- $I \text{ (mm}^3\text{)} = \sum (\text{ETR mm/j}) * s$ ;  $s$  = la surface de la parcelle, il est à noter que 1mm est l'équivalent de  $1\text{l/m}^2$  et  $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ ;

Les précipitations affectent les apports d'irrigations et de ce fait l'estimation de  $I$  devient comme suit:  $I' \text{ (mm}^3\text{)} = (\text{ETR} - \text{Peff}) * s$ ; avec  $\text{Peff} = 80\%$  de la pluie totale.

**Tableau 8:** Apports des irrigations pour les deux essais installés à l'INGC Chébika Kairouan durant la campagne 2015-2016 avec un régime hydrique à 100% ETR et un régime hydrique à 25% ETR.

Date	100% (cm <sup>3</sup> )	25% (cm <sup>3</sup> )
23/11/2015	45	11.25
01/12/2015	45	11.25
07/01/2016	30	7.5
19/01/2016	12	3
01/02/2016	23	5.75
15/02/2016	40	10
02/03/2016	30	7.5
15/03/2016	50	12.5
29/03/2016	53	13.25
29/03/2016	32	8



**Tableau 9:** Apports des irrigations pour les deux essais installés à l'INGC Chébika Kairouan durant la campagne 2016-2017 avec un régime hydrique à 100% ETR et un régime hydrique à 25% ETR.

Date	100% (cm <sup>3</sup> )	25% (cm <sup>3</sup> )
25/12/2016		
03/01/2017	40	10
13/01/2017	27.6	6.9
23/01/2017	48.8	12.2
02/02/2017	56	14
13/02/2017	77.6	19.4
22/02/2017	83.2	20.8
04/03/2017	76.8	19.2
14/03/2017	125.6	31.4
24/03/2017	95.38	23.84
03/04/2017	124.8	31.2
13/04/2017	127.2	31.8
24/04/2017	127.2	31.8

## V. Caractérisation génotypique des populations locales de blé dur utilisant la méthode DArtseq™.

### 1. Extraction de l'ADN génomique

Cinq jeunes feuilles fraîches d'une plante individuelle pour chaque accession de la collection de blé dur utilisée dans le cadre de ce travail ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN génomique. Ces feuilles sont coupées, lyophilisées, broyées en poudre fine en utilisant un broyeur à bille Mixer Mill MM300® (Qiagen) et placées dans des tubes de 2 ml.

L'extraction de l'ADN génomique a été assurée par la méthode modifiée CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium) au laboratoire «Genetic Analysis Service for Agriculture (SAGA), CIMMYT, Mexique» (Hoisington et al., 1992). Pour chaque accession 50 mg du broyat est nécessaire pour extraire une quantité de 50 à 100 µg d'ADN. Un volume de 1 ml de tampon CTAB préalablement chauffé à 65 ° C est ajouté. Le mélange est homogénéisé en agitant doucement. Suite à une incubation des échantillons à 65 ° C pendant 90 minutes avec un balancement doux et continu suivi d'un refroidissement pendant 5 à 10 minutes. 500 µl de chloroforme: octanol (24: 1).est ajouté. Cette étape nécessite un bercement doux et continu du mélange pendant 10 minutes. La centrifugation à 3500 tours / minute à la température ambiante pendant 10 minutes a permis de séparer le mélange en une phase aqueuse jaune et une phase organique verte. Un volume de 750 µl de la phase aqueuse est transvasé dans un nouveau tube auquel un volume de 5 µl RNase est ajouté. Le nouveau mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes. Pour précipiter l'acide nucléique, un ½ volume. d'isopropanol (2-propanol) glacé est ajouté. Une étape de centrifugation à 3500 tours

/ minutes à la température ambiante pendant 30 minutes est nécessaire pour récupérer l'ADN précipité sous forme de culot au fond du tube.

## **2. Contrôle de qualité et de la quantité de l'ADN**

La qualité de l'ADN génomique des échantillons a été déterminée par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1%. L'agarose est dissout dans une solution TBE 1X. Le mélange est homogénéisé d'une manière continue à chaud jusqu'à l'ébullition. Une fois refroidi à une température de 55°C, le gel est coulé dans un moule jusqu'à la solidification. 20 µl. de chaque ADN extrait préalablement mélangé avec le bleu de dépôt sont déposés dans les différents puits du gel agarose préparé. Après la migration électrophorétique des échantillons d'ADN à une vitesse de 100 mA pendant 10 minutes, le gel est coloré avec 1 µg / ml de bromure d'éthidium (100 µl de 10 mg / ml de bromure d'éthidium dans 1000 ml de H<sub>2</sub>O) pendant 20 minutes, en agitant doucement et finalement il est lavé avec H<sub>2</sub>O pour être visualiser dans un transilluminateur UV et ensuite photographier.

La quantification de l'ADN génomique a été déterminée par un spectrophotomètre NanoDrop 8000 V 2.1.0 qui permet de mesurer 96 échantillons de 1 µl en même temps. Plusieurs dilutions ont été établies pour obtenir une concentration de 50 ng/ µl en utilisant la formule suivante:

$$C_i * V_i = C_f * V_f.$$

C<sub>i</sub>: Concentration initiale; C<sub>f</sub>: Concentration finale.

V<sub>i</sub>: Volume initial; V<sub>f</sub>: Volume final.

La pureté de l'ADN est mesurée par les ratios A260/280.

## **3. Génotypage utilisant la méthode DArTseq™**

La méthode DArTseq™ («Diversity Array Technology») est une technologie de génotypage à très haut débit dont la plateforme est actuellement installée au CIMMYT, Mexique. Elle est basée sur une combinaison de deux enzymes de restriction (PstI et HpaII) pour réduire la complexité du génome et générer une représentation génomique des échantillons (Akbari et al., 2006; Sansaloni et al., 2011).

L'ADN génomique est soumis à un processus de digestion et de ligation avec un adaptateur spécifique du site de restriction enzymatique de PstI étiqueté avec 96 codes à barres différents, ce qui permet de multiplexer 96 échantillons d'ADN en une seule voie de l'instrument Illumina HiSeq2500 (Illumina Inc., San Diego, Californie, États-Unis). Les

fragments amplifiés sont séquencés jusqu'à 77 bases, générant environ 500 000 lectures uniques par échantillon. Un fichier FASTQ (lectures complètes de 77 pb) est filtré avec un score de qualité Phred de 30, ce qui représente 90% précision des appels de base pour au moins 50% des bases. Un filtre supplémentaire est appliqué sur le code à barres des séquences en utilisant un score de qualité Phred de 10, ce qui représente 99,9% de la précision des appels de base pour au moins 75% des bases. DArTsoft 14 a été utilisé pour générer des tableaux de scores des Silico-DArT sous forme de données (1/0), indiquant les variations de présence / absence (PAV) pour les marqueurs et il a été utilisé pour générer des appels alléliques aux marqueurs SNP.

Les marqueurs DArTseq ont été cartographiés à l'aide de la carte consensus version 4.0 ([www.diversityarrays.com](http://www.diversityarrays.com)) développée par DArT Pty. Ltd., Australie, et du génome de référence de blé issu de la base de données («the International Wheat Genome Sequencing Consortium» (IWGSC WGA v0.4), disponible en ligne sur <https://urgi.versailles.inra.fr/download/iwgsc/>). Les données brutes DArTseq ont été filtrées selon le critère des marqueurs; fréquence des allèles mineurs > 5% et des données manquantes ≤ 20%.

#### **4. Mesure de la diversité génétique**

Les DArTseq sont des marqueurs dominants couvrant tout le génome. Dans cette étude pour décrire la diversité génétique, nous avons utilisé les critères suivants:

- i) Le niveau du polymorphisme PIC («Polymorphic Information Content»);
- ii) La fréquence des allèles rares MAF («Minor allele frequency»);
- iii) Le taux moyen d' hétérozygotie observé ( $H_o$ ); et
- iv) Le taux moyen d' hétérozygotie attendue ( $H_e$ ).

\*Le niveau du polymorphisme PIC est le pourcentage des loci polymorphes dans une population à étudier (Powell et al., 1996). Les valeurs du PIC pour les marqueurs dominants varient de 0 à 0.5 (Botstein et al., 1980).

$$PIC = 1 - \sum_{i=0}^n f_i^2$$

Où :  $f_i$  représente la fréquence de l'allèle  $i$  à un locus donné.

\* le taux moyen d' hétérozygotie observé ( $H_o$ ) est la proportion des individus hétérozygotes dans une population.

\* le taux moyen d' hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) ou encore connu comme diversité génétique de Nei (GD) (Nei, 1973) est une estimation de l'étendue de la variabilité génétique dans une population. Cet indice reflète la proportion des loci qui sont hétérozygotes pour une population dans les conditions de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

## 5. Mesure de la différenciation entre les populations

Plusieurs approches ont été utilisées pour estimer la différenciation entre les populations. La première consiste à estimer la distance génétique entre les individus, nous avons utilisé dans ce travail la distance génétique de Reynolds qui estime la divergence génétique basée sur la dérive génétique et le coefficient du co-ancêtre (Reynolds et al., 1983), ainsi que la distance des allèles partagés ASD («Allele sharing distance») regroupant les individus partageant des allèles similaires (Gao et Martin, 2009).

La distance ASD entre les individus  $i$  et  $j$  est définie comme suit:

$$D_{ij} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L d_{ij}(l)$$

Où  $L$  est le nombre total des marqueurs,  $d_{ij}(l)$  est 0, 1 or 2, si l'individu  $i$  et  $j$  ont zero, un ou deux allèle(s) en commun à un locus  $l$ .

La distance de Reynolds est définie comme suit (Reynolds et al., 1983):

$$D = Ln(1 - \theta)$$

Avec  $\theta$  est coefficient du co-ancêtre;  $\theta = 1 - \frac{1}{2N}$ , où  $N$  est la taille de la population.

La deuxième approche consiste à décomposer la diversité génétique à plusieurs niveaux hiérarchiques en tenant compte des différentes composantes de la population (individus, sous-populations). Dans cette étude nous avons utilisé l'indice de fixation de Wright  $F_{st}$  qui est une mesure de la différenciation génétique des sous populations (Wright, 1922), cet indicateur varie de 0 à 1, dont la valeur de  $F_{st} = 0$  indique aucune différenciation et que les individus sont identiques, par contre la valeur de  $F_{st} = 1$  indique une forte différenciation. De plus nous avons effectué une analyse de la variance moléculaire AMOVA pour tous les niveaux de structure de la population.

$$F_{st} = 1 - (H_s/H_t)$$

$H_t$  = diversité génétique totale, avec  $H_t = H_s + D_{st}$

$H_s$  = diversité génétique intra-population

Dst= diversité génétique inter-population

## 6. Structure de la population

Dans cette étude nous avons utilisé deux méthodes pour établir la structure de population des 196 lignées de blé dur:

i) La classification hiérarchique basée sur une matrice de distance des allèles partagés «Allele sharing distance, ASD» entre les lignées pris deux à deux pour construire un dendrogramme (Gao et Martin, 2009).

ii) L'analyse bayésienne multi variée «Discriminant analysis of principal components, DAPC» qui permet de déterminer le nombre de groupes d'individus génétiquement apparentés (Jombart et al., 2010). Cette dernière méthode nécessite trois étapes: les données sont d'abord transformées à l'aide de l'analyse en composantes principales, puis les sous-groupes sont identifiés à l'aide d'une classification «K-mean», ensuite la discrimination entre les sous-groupes est optimisée à l'aide d'une analyse discriminante. Pour le regroupement de K-mean, le nombre optimal de groupes a été identifié en utilisant le critère d'information bayésien «Bayesian information criterion» (BIC) comme mesure de la qualité de l'ajustement. Le nombre de sous-groupes (K) a été testé entre 2 et 8 et la valeur K avec le BIC le plus bas a été retenue comme nombre optimal de groupes. Une analyse discriminante a ensuite été mise en œuvre en utilisant les groupes trouvés par K-mean (Schwarz, 1978).

## VI. Evaluation de différents caractères mesurés dans les champs des populations locales de blé dur

. Plusieurs variables phénologiques, physiologiques et agro-morphologiques ont été mesurées dans le cadre de ce travail.

### 1. Caractères phénologiques

Les données phénologiques enregistrées sont basées sur l'échelle de Zadoks.

➤ **La date d'épiaison (DE)** est estimée à l'échelle du plot pour chaque accession lorsque 50% des plantes sont épiées. La mesure de cette période est comme suit:

PE= DS-DE; PE: Période d'épiaison; DS: Date de semis; et DE= Date d'épiaison.

➤ **La date de maturité (DM)** est estimée visuellement également à l'échelle du plot pour chaque accession lorsque 50% des plantes ont atteint la maturité physiologique. La mesure de cette période est comme suit:

PM= DS-DM; PE: Période De maturité; DS: Date de semis; et DM= Date d'épiaison.

## **2. Caractères physiologiques**

### **a. Taux de chlorophylle (Unité SPAD)**

Le contenu relatif de la chlorophylle est mesuré sur la dernière feuille de chaque plante de chaque accession, à l'aide d'un appareil de mesure portatif (SPAD 502, Minolta, Spectrum Technologies In., Plainfield, IL, Japon) en unités SPAD. Ces unités sont linéairement liées à la concentration de la chlorophylle a. Il est à noter que dans ce travail les mesures ont été effectuées sur cinq feuilles de cinq plantes sélectionnées au hasard pour chaque accession et pour chaque feuille la moyenne de 3 mesures a été enregistrée.

### **b. La fluorescence chlorophyllienne**

La fluorescence de la chlorophylle est considérée comme un outil utile pour le criblage du blé dur en cas de sécheresse. Les mesures ont été effectuées sur l'extrémité de la feuille des cinq plantes sélectionnées pour chaque accession au stade montaison à l'aide d'un chlorophylle-fluorimètre portatif (Model OS30p+, Opti-sciences, Inc. Manufactures USA). Cet appareil fournit un ensemble de mesures:

- Fo, la fluorescence minimale qui correspond fluorescence à l'état initial des centres réactionnels du PSII à l'obscurité
- Fm, fluorescence maximale qui correspond Intensité de la fluorescence centres réactionnels du PSII;
- Fv, rendement de la fluorescence variable, calculé sous la forme  $F_m - F_o$ ;
- $F_v / F_m$ , rendement quantique maximal de la photosynthèse, calculé sous la forme  $(F_m - F_o) / F_m$ .

Ce rapport reflète l'efficacité du PSII à la conversion photochimique de la lumière. Des valeurs  $< 0.8$  est un indicateur de stress.

## **3. Caractères agro-morphologiques**

### **a. Surface foliaire (SF)**

La feuille drapeau de cinq plantes sélectionnées pour chaque accession est collectée au stade épiaison pour mesurer la surface foliaire en  $\text{mm}^2$  (SF,  $\text{mm}^2$ ). Les mesures de ce paramètre ont été effectuées en utilisant un planimètre (AM 300 Field Portable Leaf Area Meter – Opti-Sciences).

**b. Hauteur de la plante (H)**

La hauteur des plantes a été mesurée à l'aide d'une règle graduée depuis le ras du sol jusqu'aux extrémités des barbes des épis de cinq plantes par accession. La mesure de ce paramètre a été effectuée au stade fin épiaison.

**c. Longueur des épis (LE)**

La mesure de l'épi est effectuée à l'aide à un pied à coulisse à partir de la base du rachis jusqu'à l'extrémité de l'épi (LE, cm). La mesure de ce paramètre est réalisée au cours du stade de maturité et se base sur la moyenne de cinq épis du maître brin de cinq plantes sélectionnées de chaque accession.

**d. Longueur des barbes (LB)**

La mesure des barbes est effectuée à l'aide à un pied à coulisse à partir de la base jusqu'à l'extrémité des barbes de l'épi (LB, cm). La mesure de ce paramètre est réalisée au cours du stade de maturité et se base sur la moyenne de cinq épis du maître brin de cinq plantes sélectionnées de chaque accession.

**e. Nombre des épillets par épi (NEE)**

Le nombre d'épillets par épi est le comptage des épillets de part et d'autre du rachis et concerne les épis de chaque brin principal de cinq plantes sélectionnées.

**f. Taille des grains**

Un lot de semences de chaque génotype pris au hasard après homogénéisation est placé dans un système d'image numérique (SeedCount SC5000, Next Instruments, Australia) pour fournir plusieurs caractéristiques du grain. Cet équipement permet de mesurer la superficie des grains (TA, mm<sup>2</sup>), la longueur des grains (ST, mm), et la largeur des grains (SW, mm).

**g. Nombre des épis par mètre carré (NS)**

Le nombre des épis par mètre carré est déterminé suite à la récolte des deux rangs centraux au stade maturité, le comptage des épis correspondants qui sera converti en nombre des épis par mètre carré.

**h. Nombre des grains par épi (NGE)**

Le nombre de grains par épi est déterminé en faisant le battage des épis principaux des cinq plantes sélectionnées et le comptage des grains par épi.

#### **i. Poids des grains par épi (PGE)**

La mesure de ce paramètre est effectuée en pesant les grains de chaque épi du maître brin de chaque plante sélectionnée. L'étude a utilisé la moyenne de cinq par génotype (PGE, g). L'unité de mesure est en gramme.

#### **j. Rendement en grains (GY)**

L'estimation du rendement en grains a été basée sur les épis comptés au niveau des deux rangs centraux du plot (NS). Les grains obtenus suite au battage de ces épis à l'aide d'une batteuse à gerbe ont été pesés. Le poids mesuré est converti en kg/ha.

#### **k. Poids de milles grains (TKW)**

Le poids de 1000 grains (TKW) a été déterminé par comptage de 1000 grains à l'aide d'un compteur photoélectrique type Numigral et le pesage de ces graines par une balance de précision (model Precisa). Cette opération a été effectuée au laboratoire de qualité du CIMMYT.

#### **l. Poids spécifique (TW)**

Le poids spécifique a été déterminé en écoulant un lot de semences pris au hasard dans un trémie, ensuite le collecter dans un récipient d'un litre utilisant à l'aide d'un Nilémalitre et le peser à l'aide d'une balance de précision (model précisa). La valeur du poids mesurée est convertie en Kg/hl.

### **VII. Evaluation des caroténoïdes chez les populations locales de blé dur**

Deux méthodes d'évaluation ont été utilisées pour estimer la richesse en caroténoïdes, une méthode physique indirecte utilisant la mesure colorimétrique via l'indice du jaune ou valeur du  $b^*$  du grain et la méthode biochimique en dosant la teneur totale des caroténoïdes (TCC).

#### **1. Mesure de l'indice du jaune de la semoule (valeur du $b^*$ )**

Les grains de chaque accession sont broyés avec un broyeur de laboratoire (UDY Cyclone) en utilisant un crible de 0,5 mm. La couleur de la semoule obtenue est mesurée à l'aide d'un colorimètre Minolta (Minolta CR- 400 chromameter, Camera Co., Osaka, Japon) dont la réflectance comme retenu par la commission international de l'éclairément (CIE) fournit les indices suivants: l'indice de vitrosité ( $l^*$ ), l'indice du brun ( $a^*$ ) et l'indice du jaune ( $b^*$ ) (Blanco et al., 2011).



L'indice du pigment jaune b\* a été utilisé pour évaluer la teneur en pigments jaunes dans la semoule des génotypes selon la méthode référence «AACCI Method 14-22.01». Des lignées élités obtenues de l'ICARDA riches en caroténoïdes ont été utilisées comme témoins. Les indices du l\* et du a\* ont également été mesurés afin de voir leurs interactions avec l'indice du b\*. Toutes ces mesures ont été effectuées au laboratoire de qualité du CIMMYT, Mexique.

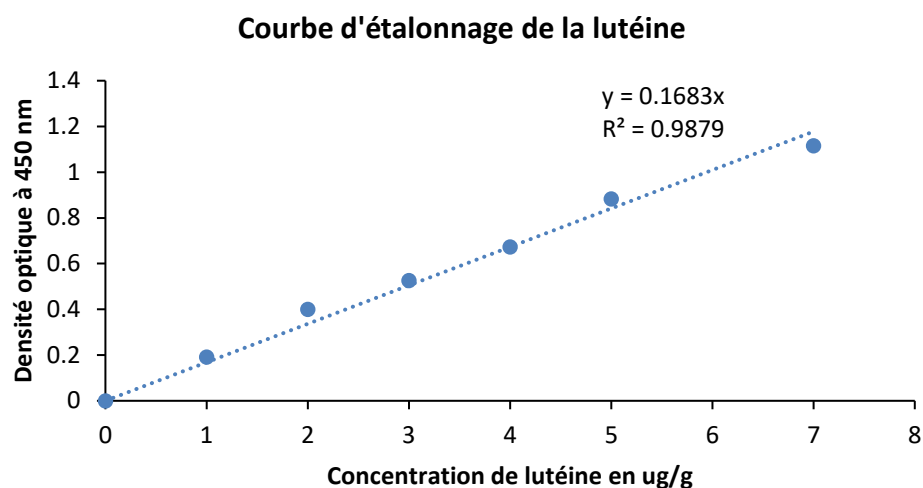
## **2. Mesure des caroténoïdes totaux contenus dans les grains (TCC)**

La mesure de la teneur en pigments jaunes dans les grains est étroitement liée à la teneur en caroténoïdes contenue dans l'endosperme des grains. La micro-méthode référence «AACCI Method 14-60.01» légèrement modifiée a été utilisée pour mesurer la teneur totale des caroténoïdes dans les grains de blé dur des génotypes étudiés (Abdel-Aal et Rabalski, 2012), qui est exprimée en micro grammes de lutéine par gramme de matière sèche (ppm). La méthode consiste à une extraction des caroténoïdes totaux à l'aide de l'eau saturée en n butanol (WSB). Pour chaque accession, 200 mg de semoule obtenue suite à un broyage des grains comme précédemment décrit dans le protocole de mesure de l'indice du b\* ont été placés dans un tube à centrifuger brun d'une capacité de 2 ml, auquel on a ajouté 1 ml de n butanol saturé d'eau. Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un «shaker» horizontal à une vitesse de 40 pendant 15 minutes, puis reposé pendant 1 heure à la température ambiante. Une centrifugation à une vitesse de 5000 g pendant 5 minutes a été effectuée pour collecter le surnageant. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 450 nm en utilisant un spectrophotomètre UV / Visible en triple. La teneur totale en pigment jaune a été calculée en faisant la moyenne de l'absorbance du surnageant de chaque échantillon à 450 nm et en la convertissant en teneur total en caroténoïdes (TTC) en utilisant la formule suivante (Ndolo et Beta, 2013):

$$\text{TCC } \mu\text{g/g} = (2 \cdot A) / S \cdot W$$

Où TCC = Teneur en lutéine  $\mu\text{g/g}$ ; A= Absorbance mesurée à 450 nm; S= Coefficient de régression  $R^2$  de la courbe d'étalonnage de la lutéine en fonction de l'absorbance à 450 nm) et W= Poids de la semoule utilisée pour chaque génotype.

Il est à noter que pour déterminer le S et la teneur en lutéine  $\mu\text{g/g}$  dans les grains pour chaque génotype, nous avons établi une courbe d'étalonnage utilisant différentes concentrations connues d'une solution de lutéine pure standard (Lutein analytical standard, Sigma-Aldrich) et leurs absorbances à 450 nm (Figure 18) (Abdel-Aal et Rabalski, 2012).



**Figure 18:** Courbe d'étalonnage de la lutéine µg/g en fonction de l'absorbance à 450 nm.

Les mesures de la teneur en lutéine contenu dans les grains des génotypes de blé dur utilisés dans ce travail ont été effectuées au laboratoire de qualité de l'ICARDA, Rabat uniquement pour les essais installés à Mornag pendant les deux campagnes 2015 et 2016. La classification des teneurs totales en caroténoïdes est basée sur les travaux d'Abdalla et al., (1993) (Tableau 10).

**Tableau 10:** Classification des accessions en groupes en fonction de la teneur en pigments jaunes chez le blé dur (Abdalla et al., 1993).

Classification des groupes	Echelle de classification
Teneur en pigment jaune faible	< 5
Teneur en pigment jaune moyenne	5 - 7
Teneur en pigment jaune forte	> 7

## VIII. Evaluation de quelques traits de qualité du grain chez les populations locales de blé dur

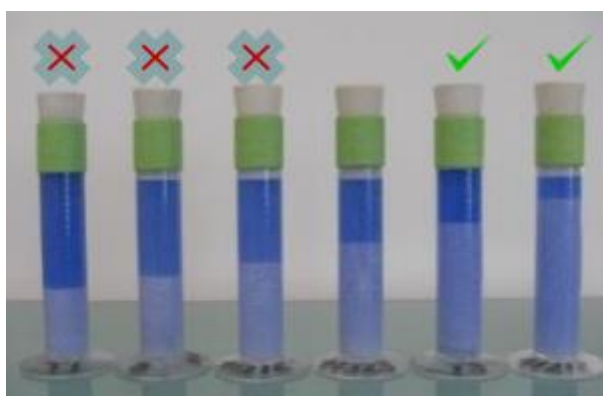
A part la teneur en pigment jaune en tant que critère nutritionnel et de qualité de la semoule, la teneur en protéines ainsi que la force du gluten sont aussi importants dans la nutrition et la détermination de la qualité boulangère et des produits dérivés à base de blé dur.

## 1. Mesure de la teneur en protéines des grains (Gpr)

La teneur en protéines dans les grains de la collection de blé dur a été mesurée par la méthode indirecte de spectroscopie dans le proche infrarouge (NIR Systems6500, Foss Denmark) calibrée selon la méthode officielle «AACC 39-10.01». Les teneurs en protéines des grains ont été calculées en rapportant l'humidité à 12,5%.

## 2. Mesure de l'indice de sédimentation (SDS)

L'indice de sédimentation par le Sulfate Dodécyl de Sodium (SDS) est une méthode biochimique simple et rapide qui est utilisée pour évaluer la force du gluten chez les génotypes de blé dur. Cet indice est mesuré en utilisant la méthode «AACCI Method 56-70.01» modifiée par le laboratoire de qualité du CIMMYT (Peña-Bautista et al., 1990). Une quantité faible de semoule à raison de 1 gramme a été placée dans un tube cylindrique de 25 ml (graduation de 0,1 ml et approximativement de 15 mm de diamètre interne), auquel on ajoute 6 ml d'une solution aqueuse de bleu de bromophénol 0.001% (eau/volume). Le mélange a été soigneusement homogénéisé (4-6 seconde) à l'aide d'un vortex, ensuite reposé pendant 5 minutes suite à une agitation modérée de 5 minutes. Nous avons ajouté 19 ml d'une solution fraîchement préparée d'un mélange de 17 parts d'une solution d'acide lactique (acide-eau;1:8, volume/volume) et de 48 parts d'une solution SDS (2 %, eau/volume, SDS) et immédiatement le mélange a été agité pendant 1 minute sur un agitateur mécanique horizontalement à une vitesse de 35 à 45 cycles / minute. Enfin les tubes cylindriques ont été placés verticalement et ont été laissés au repos pendant 14 minutes) (Figure 19). La mesure de la hauteur en mm correspond au volume de sédimentation en ml qui reflète la capacité de la matrice protéique de la semoule à gonfler due à la précipitation des protéines de réserves (gliadines et gluténines) (Tableau 11). Il est à noter que les essais ont été réalisés aux alentours de 20° C.



**Figure 19:** Evaluation de la force du gluten chez le blé dur au laboratoire de qualité du CIMMYT, Mexique. Les croix rouges indiquent une force de gluten faible à moyenne; les crochets verts indiquent une force de gluten forte.

**Tableau 11:** Classification des accessions en groupes en fonction de la force de gluten chez le blé dur (Peña-Bautista et al., 1990).

Type de force de gluten	Volume
Fort	> 10
Moyen	7-10
Faible	<7

## IX. Analyse d'association pan-génomique

### 1/ Evaluation des caroténoïdes chez les populations locales

L'évaluation des caroténoïdes a été déjà décrite précédemment dans le paragraphe VIII de matériel et méthodes.

### 2/ Détection des QTL pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes

La détection des QTL a été effectuée avec deux méthodes statistiques:

#### a. Les graphiques Q-Q ou «Q-Q plot»

Les graphiques sont établis sur la base des probabilités d'association entre marqueurs et traits observées en fonction de celles attendues. Quatre modèles statistiques ont été testé pour éliminer les erreurs de type I et celles de types II.

- Modèle linéaire naïf
- Modèle linéaire Mixte intégrant la parenté relative entre les lignées (K)
- Modèle linéaire mixte intégrant la structure de la population (Q)
- Modèle linéaire mixte en tenant compte de la structure de la population (Q) et de la parenté relative (K).

#### b. Les graphiques Manhattan ou «Manhattan plot»

Les graphiques Manhattan sont utilisé pour visualiser la localisation des QTL, différentes approches d'ajustement ont été utilisées pour déterminer le seuil de significativité.

- Approche 1: Les corrections Bonferroni
- Approche 2: Le taux des fausses découvertes ou «False discovery rate»

### **c. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques pour la partie phénotypique et l'étude GWAS ont été déterminé avec le paquet R «R package, open access»

## **Chapitre 3: Résultats et Discussions**

# **I. Diversité génétique et structure des populations locales de blé dur Tunisien**

## **1. Résumé**

La Tunisie, qui fait partie du centre secondaire de la diversité du blé dur, possède de riches populations locales inexploitées, qui sont continuellement perdues et remplacées par des cultivars modernes à rendement élevé.

Cette étude visait à étudier la diversité génétique et la structure de la population de 196 lignées de blé dur issues de six populations locales collectées en Tunisie à l'aide de la méthode «Diversity Array Technology» (DArTseq) et à comprendre les voies possibles d'introduction en les comparant avec les populations locales des pays voisins.

Au total, 16 148 marqueurs DArTseq polymorphes couvrant à la fois les génomes A et B ont été efficaces pour évaluer la diversité génétique et classifier les accessions. La classification hiérarchique basée sur les distances des allèles partagées (ASD) et l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC) nous ont permis de distinguer cinq groupes qui correspondaient bien à la nomenclature des populations par les agriculteurs. Il est intéressant de noter que les populations locales Mahmoudi et Biskri constituent le même pool génétique tandis que la population Jenah Zarzoura constitue un groupe complètement différent. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a montré que la variation génétique était entre les populations locales plutôt qu'à l'intérieur de celles-ci. L'analyse DAPC des populations locales Tunisiennes, Méditerranéennes et de l'Ouest de l'Asie a confirmé notre structure de population antérieure et a montré une similitude génétique entre les populations locales Tunisiennes et Nord-Africaines, à l'exception de la population Jenah Zarzoura qui est la plus éloignée.

La caractérisation génomique de la collection Tunisienne améliorera leur conservation et leur utilisation durable dans les programmes d'amélioration génétique à l'échelle nationale et mondiale.

**Mots-clés:** blé dur; populations locales Tunisiennes; centre de diversité; diversité génétique; structure de la population; Technologie DArTseq.

## **2. Introduction**

Le blé tétraploïde est originaire du Croissant Fertile, depuis 10 000 BP (Dvorak et Akhunov, 2005; Feldman et Levy, 2005). Il s'est dispersé par les migrations humaines vers différentes voies géographiques engendrant le développement de populations locales connues sous le nom de «landraces» (Bonjean, 2001; Haas et al., 2019), qui sont adaptées aux

conditions environnementales et climatiques de chaque région. Ce processus a induit une grande variabilité génétique et des modifications dans le contrôle des traits physiologiques, agronomiques et technologiques (Peng et al., 2011; Hughes et al., 2019).

La Tunisie, faisant partie du centre secondaire de diversité du blé dur (Vavilov, 1951), possède une richesse en populations locales comme il a été décrit par Bœuf, (1932). Plusieurs études ont mis en lumière l'existence d'une grande diversité chez les populations locales Tunisiennes sur la base des critères essentiellement morphologiques (Deghais et al., 2007; Sourour et Hajer, 2008; Sourour et al., 2010; Amine et al., 2011; Belhadj et al., 2015). Toutefois, malgré la fiabilité des outils moléculaires, de rares études moléculaires ont été effectués. Pourtant dans ce contexte Medini et al., (2005) ont démontré une diversité génétique élevée chez une collection de 40 cultivars anciens utilisant 15 SSRs (Medini et al., 2005).

Récemment, l'émergence des plateformes de génotypage à très haut débit (Rasheed and Xia 2019), y compris la technologique DArTseq<sup>TM</sup> a facilité les recherches dans le domaine de la génomique. Ces technologies de séquençage de prochaine génération (NGS) ont eu diverses applications chez différentes espèces cultivées (Wenzl et al., 2004; Yang et al., 2016; Alipour et al., 2017; Baloch et al., 2017; ; Sieber et al., 2017; Valdisser et al., 2017; Chen et al., 2018; Nadeem et al., 2018), indépendamment des connaissances du génome, de la taille du génome, de la ploïdie et du nombre d'individus à étudier (Mir et al., 2013; Rasheed et Xia, 2019). La technologie DArTseq<sup>TM</sup> a été utilisée dans différentes études de diversité génétique chez plusieurs céréales, particulièrement chez le blé tendre (Li et al., 2015b; Sehgal et al., 2015; Chen et al., 2018; Eltaher et al., 2018), mais elle n'a pas eu une large application chez le blé dur malgré sa robustesse et sa fiabilité à clarifier la structure de population de 91 accessions du Croissant Fertile en groupant les populations turques et syriennes dans un même pool génétique (Baloch et al., 2017), ainsi que de décrire la diversité génétique et la structure de la population d'une collection de 172 populations locales de blé dur originaires de 21 pays méditerranéens (Soriano et al., 2018). Pour faire face aux changements climatiques, il est conseillé d'utiliser la diversité génétique des populations locales de blé dur dans des programmes d'amélioration génétique visant l'obtention de variétés tolérantes aux changements prévus et ayant de bonne qualité nutritionnelle (Lopes et al., 2015).

La présente étude vise à:

1) caractériser pour la première fois la structure de la population et la diversité génétique entre et à l'intérieur de six populations locales Tunisiennes utilisant une nouvelle technologie DArTseq<sup>TM</sup>.



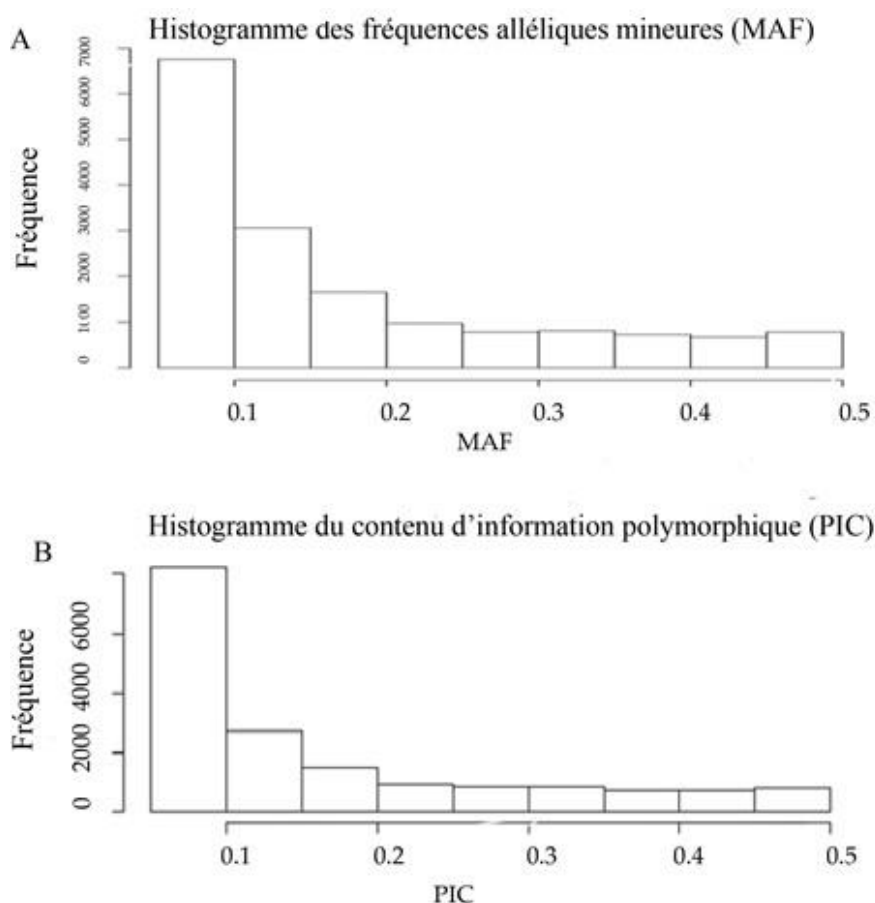
2) examiner le potentiel de classification erronée au sein de chaque population locale Tunisienne en les comparant avec une large collection de populations locales Tunisiennes différentes, des variétés améliorées Tunisiennes et des lignées élites issues de l'ICARDA et du CIMMYT.

3) Etudier la relation entre les six populations locales Tunisiennes et les populations locales étrangères originaires de différents pays du bassin méditerranéen et de l'Asie de l'Ouest utilisant la technologie à très haut débit DArTseq™ afin d'investiguer les voies d'introduction des populations locales Tunisiennes.

### **3. Résultats**

#### **a. Caractéristiques des marqueurs DArTseq**

Dans cette étude, un total de 110 856 marqueurs DArTseq ont été identifiés dans un ensemble de 196 lignées issues de six populations locales Tunisiennes de blé dur, dont 16 148 se sont révélés être de haute qualité et polymorphes, après avoir éliminé les marqueurs avec plus de 20% de données manquantes et avec moins de 5% de fréquence d'allèle mineur (MAF). Environ 10% des marqueurs avaient 0 allèles hétérozygotes. La moyenne de la valeur du contenu d'information de polymorphisme (PIC) des marqueurs DArTseq était de 0,165 avec une médiane de 0,105. La distribution de la majorité des MAF était comprise entre 0,05 et 0,15 (Figure 20).



**Figure 20:** Distribution des fréquences des (A) Allèles mineurs MAF et (B) contenus des informations polymorphiques (PIC) utilisant 16148 marqueurs DArTseq chez une collection de 196 lignées issues des six populations locales de blé dur.

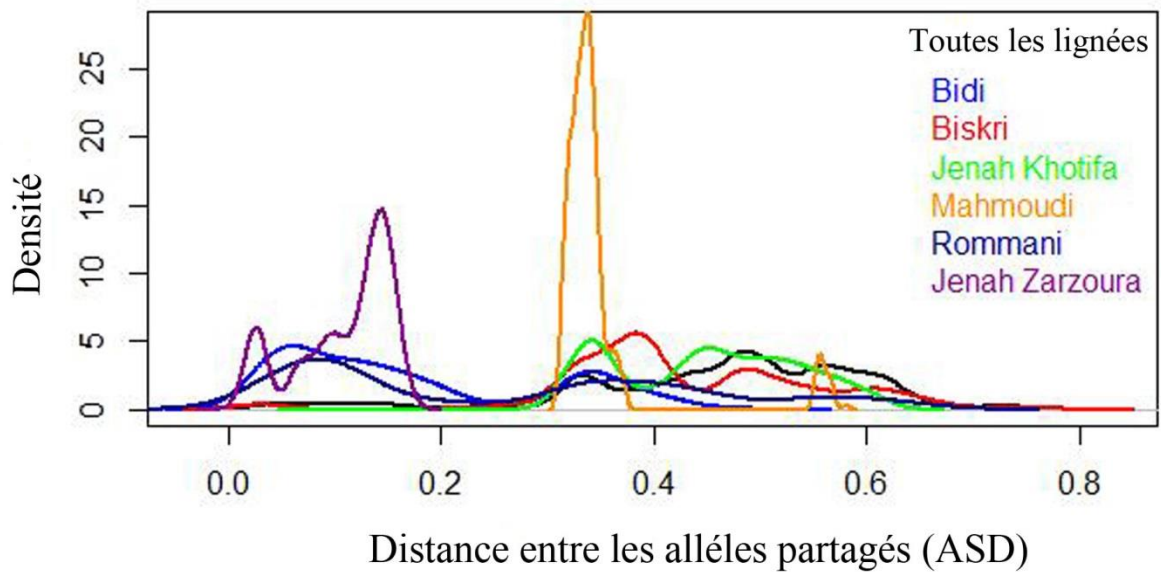
Les marqueurs DArTseq sont bien répartis sur les 14 chromosomes des génomes du blé dur, sur la base de la carte génétique consensus du blé tendre obtenue à partir de la base de données du Consortium du génome du blé (<https://urgi.versailles.inra.fr/download/iwgsc/>) (Tableau 12). La distribution de ces marqueurs est presque égale entre les génomes A (4201 marqueurs) et B (4659 marqueurs) avec le plus grand nombre de marqueurs observé sur les chromosomes 7A et 2B. Cependant, 7324 marqueurs ne sont pas attribués à aucun chromosome. Des valeurs similaires de diversité génétique ( $H_e$ ) sont observées pour les génomes A et B avec une moyenne autour de 0,25. La valeur maximale de l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) a été observée sur le chromosome 6 B (0,28) et la valeur minimale sur les chromosomes 3A, 4A, 5A et 5B (0,24). Pour tous les chromosomes, les valeurs d'hétérozygotie attendues ( $H_e$ ) étaient supérieures aux valeurs d'hétérozygotie observées ( $H_o$ ).

**Tableau 12:** Nombre des marqueurs DArTseq sélectionnés (n), L'hétérozygotie observée (H0) et l'hétérozygotie attendue (He) dans les 14 chromosomes des 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes de blé dur basée sur la carte génétique consensus du blé tendre.

Chromosome	Génome A			Génome B		
	n	He	Ho	n	He	Ho
1	562	0.27	0.15	658	0.26	0.14
2	569	0.25	0.14	864	0.27	0.13
3	633	0.24	0.14	777	0.26	0.14
4	511	0.24	0.16	429	0.25	0.16
5	587	0.24	0.18	639	0.24	0.16
6	452	0.25	0.15	573	0.28	0.15
7	797	0.25	0.14	719	0.26	0.15
Total	4201			4659		
Non assigner	7324	0.25	0.18			

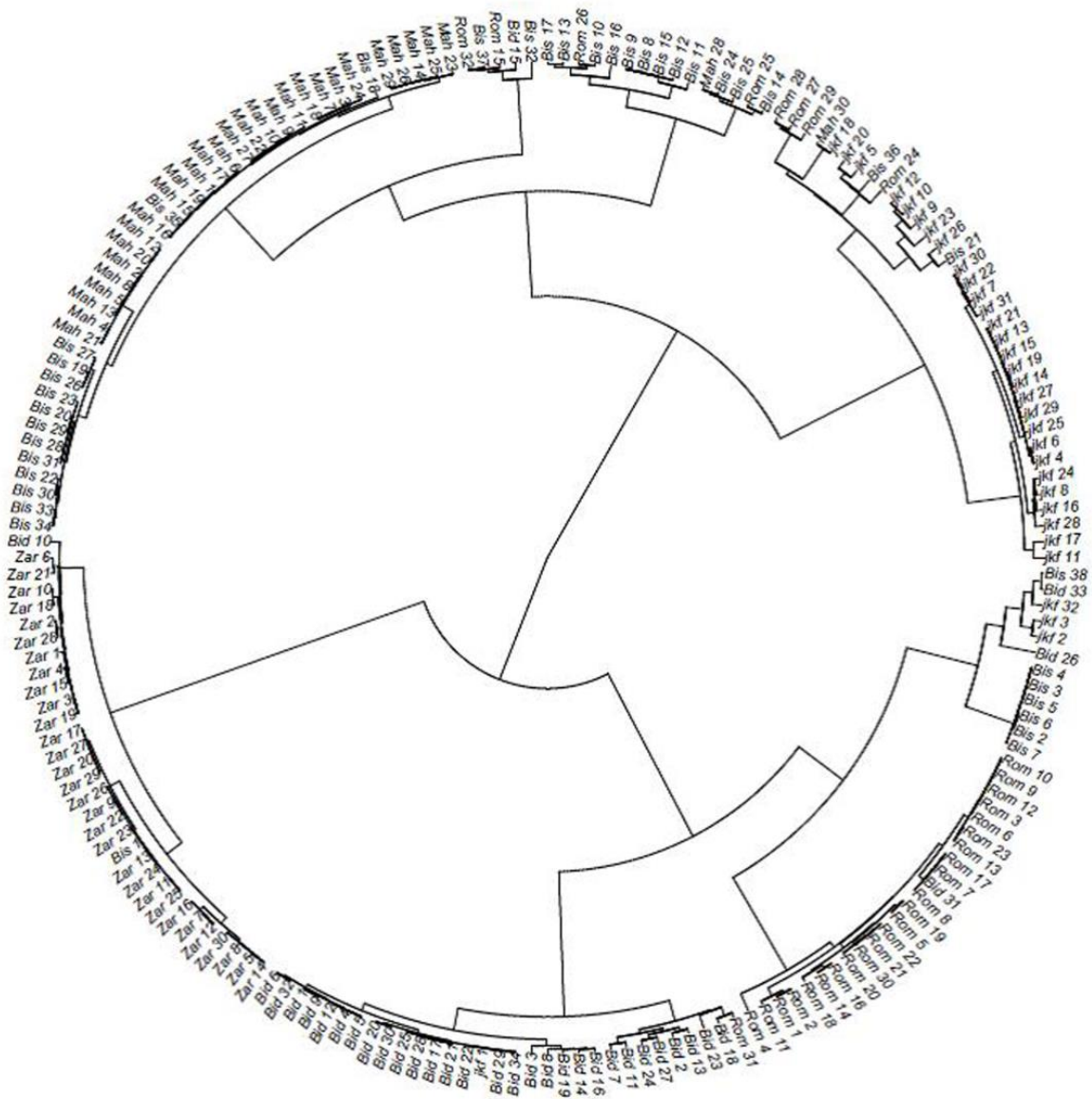
**b. Distance génétique et classification hiérarchique des populations locales Tunisiennes**

La distance des allèles partagés «Allele sharing distance» (ASD) entre les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes a varié de 0 à 0,79 avec une moyenne de 0,46 (Figure 21). Cependant, différentes distributions des distances ont été observées pour les différentes populations locales. Jenah Zarzoura a montré la distance la plus faible avec une moyenne de 0,1 et la plus faible variabilité entre ses lignées, allant de 0 à 0,16. Pour la population Bidi, la distance moyenne est de 0,17 avec une fourchette comprise entre 0,02 et 0,48. Pour la population Rommani, la distance moyenne est de 0,25 avec des valeurs comprises entre 0,02 et 0,63 et pour la population Mahmoudi, la distance moyenne est de 0,30 variant de 0,35 à 0,58. Les populations Biskri et Jenah Khotifa ont toutes les deux montré les distances moyennes les plus élevées, respectivement de 0,43 et 0,44, et les plus grandes variabilités atteignant 0,78 et 0,61 respectivement.



**Figure 21:** Distribution de la distance des allèles partagés de 196 lignées pures dérivées de six populations locales Tunisiennes de blé dur utilisant des marqueurs DArTseq.

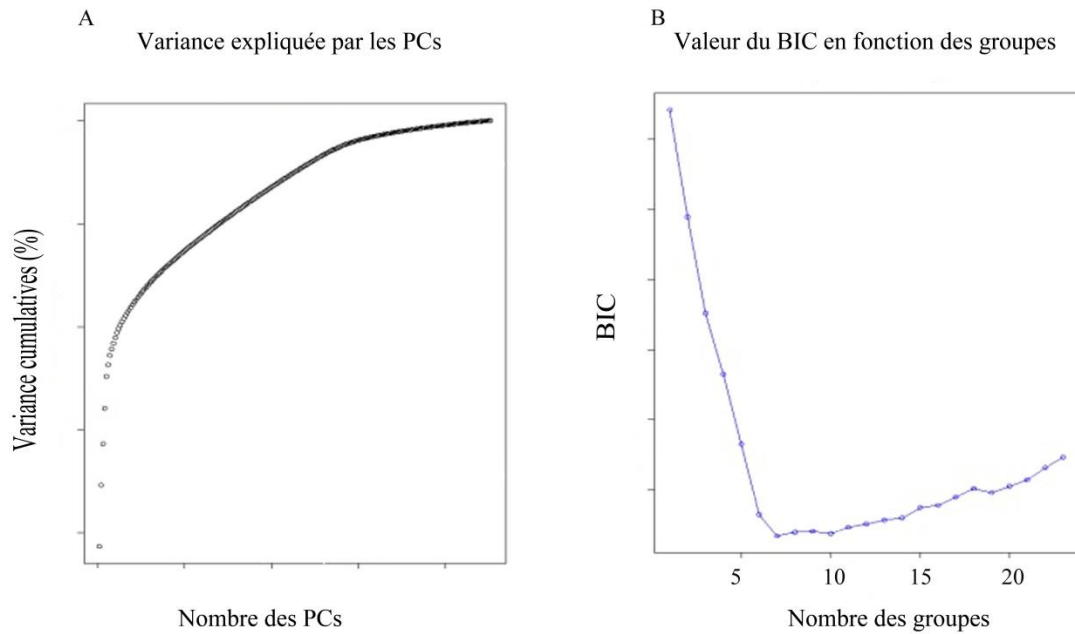
La classification hiérarchique des 196 lignées dérivées des six populations locales Tunisiennes a été réalisée en utilisant la méthode de distance des allèles partagés (ASD). Les résultats de l'analyse hiérarchique ont permis d'identifier cinq groupes distincts ainsi que les lignées faussement classées dans certaines populations locales. Le premier groupe comprend toutes les lignées de Jenah Zarzoura (Zar). Le second cluster contient principalement les lignées de Bidi (Bid). Le troisième groupe pourrait être divisé en deux sous-groupes, l'un contenant les lignées de Rommani (Rom), l'autre est composé d'un mélange de lignées des populations locales (sept de Biskri (Bis), trois de Jenah Khotifa (j kf) et deux de Bidi). Le groupe 4 renferme la majorité des lignées de Jenah Khotifa (j kf), mais contient également quatre lignées de Rommani, deux de Biskri et une de Mahmoudi. Le dernier groupe constitue le plus grand groupe et regroupe presque toutes les lignées de Biskri (Bis) et Mahmoudi (Mah) (Figure 22).



**Figure 22:** Arbre de classification hiérarchique des 196 lignées dérivées des six populations locales Tunisiennes de blé dur basé sur la distance génétique des allèles partagés (ASD). Bid: Bidi; Mah: Mahmoudi; Rom: Rommani; Bis: Biskri; jkf: Jenah Khotifa; Zar: Jenah Zarzoura.

### c. Structure des populations locales Tunisiennes

Les résultats de la DAPC («Discriminant Analysis of Principal Components») ont montré que 88 composantes principales (PC) expliquent 82% de la variance moléculaire totale. Le nombre optimal de groupes est obtenu avec  $K = 6$  en utilisant le critère d'information bayésien (BIC), qui divise les lignées en six sous-populations (figure 23).

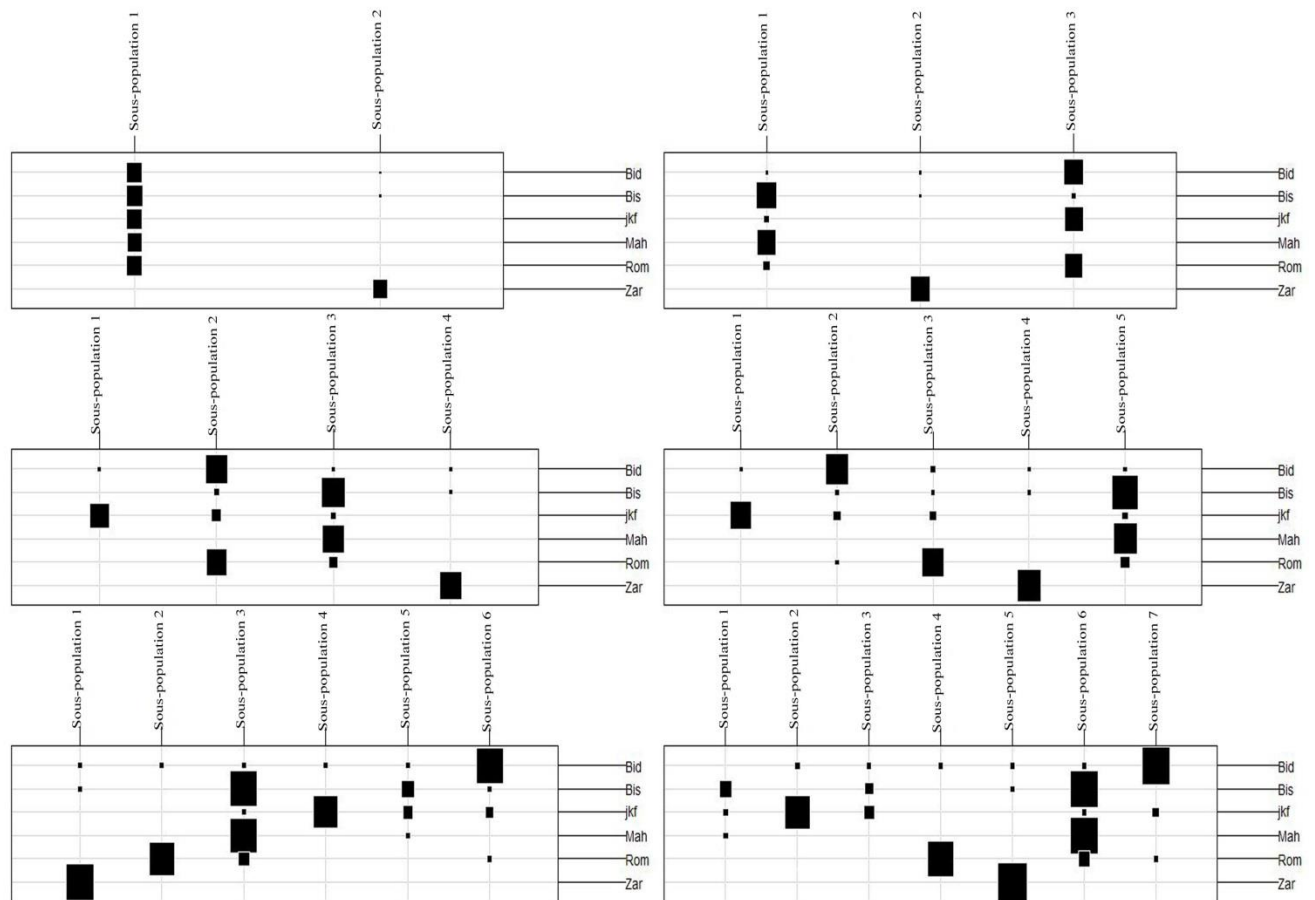


**Figure 23:** Nombre optimal des sous-populations utilisant l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC). (A): Variance cumulative expliquée par les PCs; (B): BIC en fonction du nombre de clusters. PC: Composantes principales; BIC: Critère d'information bayésien.

Le premier niveau de subdivision utilisant la structure de population hiérarchisée  $K = 2$  a clairement séparé les lignées de Jenah Zarzoura (Zar) de toutes les lignées des autres populations locales (Figure 24A). Lorsque  $K = 3$ , en plus de la sous-population distincte de Jenah Zarzoura, deux autres sous-populations ont été identifiées, l'une avec principalement Mahmoudi (Mah) et Biskri (Bis) et l'autre avec Bidi (Bid), Jenah Khotifa (j kf) et Rommani (Rom) (Figure 24B). Avec  $K = 4$ , une sous-population distincte contenant des lignées de Jenah Khotifa est apparue (Figure 24C); et lorsque  $K = 5$ , toutes les populations locales ont été attribuées à différentes sous-populations, à l'exception de Biskri et de Mahmoudi, qui sont restées groupées dans la même sous-population (Figure 24D). Le nombre de sous-populations  $K = 5$  a ensuite été choisi pour différencier les populations locales. Les sous-populations ont été nommées de la manière suivante: BID pour Bidi, BIS + MAH pour Biskri et Mahmoudi, JK F pour Jenah Khotifa, ROM pour Rommani et ZAR pour Jenah Zarzoura.

L'augmentation de  $K$  à 6 a entraîné la formation d'un petit groupe supplémentaire composé de 13 lignées, principalement de Biskri (7) et Jenah Khotifa (4), indiquant une éventuelle classification erronée de ces lignées (Figure 24E). L'image de la structure globale de la population a été maintenue pour les valeurs de  $K$  égale à 7 et à 8, les différentes

populations ont été classées à différentes sous-populations, à l'exception des populations Biskri et Mahmoudi, qui sont toujours groupées dans la même sous-population (Figure 24F).



**Figure 24:** Graphiques sous forme de tableaux comparant la distribution de la classification d'origine des populations locales aux sous-populations utilisant DAPC avec (A)  $K = 2$ ; (B)  $K = 3$ ; (C)  $K = 4$ ; (D)  $K = 5$ ; (E)  $K = 6$  et (F)  $K = 7$ .  $K$ : nombre de sous-populations; Bid: Bidi; Mah: Mahmoudi; Rom: Rommani; Bis: Biskri; jkf: Jenah Khotifa; Zar: Jenah Zarzoura.

Les résultats de l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) de  $K = 2$  à  $K = 7$  ont montré que la variance entre populations était élevée pour  $K = 2$  (31,92%), puis décroissante pour  $K = 3$  et  $K = 4$  (28,75% et 31,29%, respectivement) pour atteindre un plateau pour  $K = 5$  avec une valeur légèrement supérieure (31,77%). De plus, la variance entre les lignées au sein des populations a diminué de 11,32% pour  $K = 2$  pour atteindre des valeurs proches de 0% pour  $K = 5$ .

La comparaison des résultats AMOVA entre le nombre des populations avec  $K = 5$  et les groupes réels utilisant le nom vernaculaire de la population soutiennent clairement

l'hypothèse selon laquelle  $K = 5$  différencie mieux les lignées génétiquement que la caractérisation des populations locales basée sur leur nomenclature attribuée par les fermiers, ce qui entraîne une variance plus élevée entre les populations (31,77% pour  $K = 5$  et 28,79% pour les groupes réels), une variance inférieure entre les lignées de 68,23% pour  $K = 5$  et 70,39% pour des groupes réels et une variance inférieure entre les lignées au sein des populations (Tableau 13). Ainsi, ces résultats ont indiqué une variation génétique plus élevée entre les populations locales tunisiennes qu'à l'intérieur de celles-ci.

**Tableau 13:** Résumé de l'AMOVA pour la comparaison entre différents nombres de sous-populations  $K$  et les groupes réels composés des six populations locales Tunisiennes de blé dur.

Nombre de sous-populations	Variance		
	Entre les populations (%)	Entre les lignées à l'intérieur des populations (%)	Entre les lignées (%)
K=2	31.92	11.32	56.76
K=3	28.75	5.60	65.65
K=4	31.29	1.59	67.12
K=5	31.77	0.00	68.23
K=6	31.71	0.00	68.29
K=7	31.51	0.00	68.49
Groupes réels	28.79	0.82	70.39

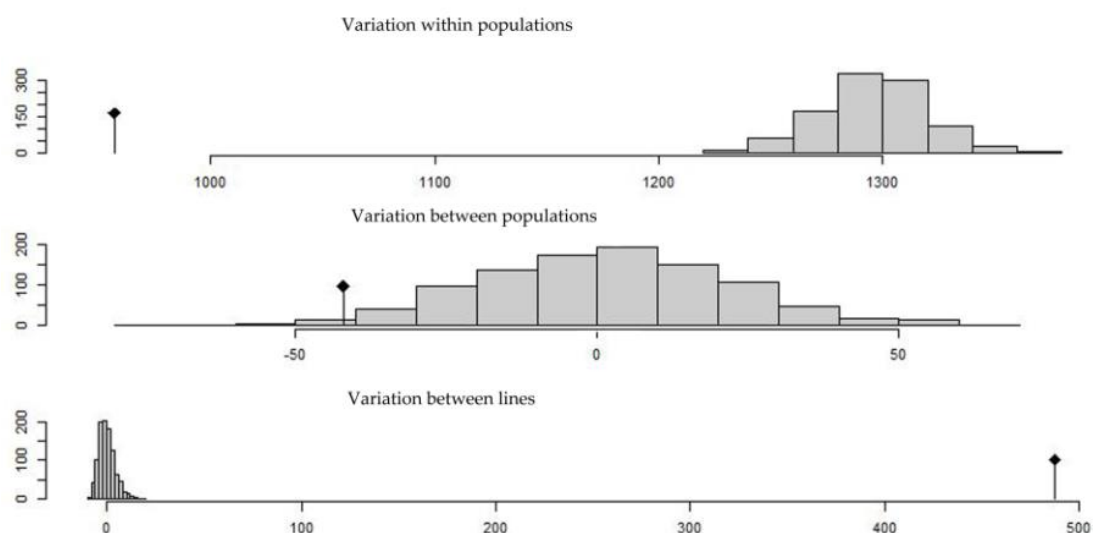
Les résultats d'AMOVA hiérarchique utilisant des subdivisions en strates hiérarchisées allant de  $K = 2$  à  $K = 5$  indiquent que la majeure partie de la variance moléculaire a été expliquée avec le premier niveau  $K = 2$  séparant Jenah Zarzoura des autres races locales (17,18%) et le cinquième niveau  $K = 5$  au sein des quatre groupes (26,62%) séparant Bidi, Rommani, Jenah Khotifa et le grand groupe constitué par Biskri et Mahmoudi. La variance moléculaire restante (variance entre les lignes) était également faible comparée aux résultats AMOVA non hiérarchiques (60,55%) en utilisant  $K = 5$  (Tableau 14).



**Tableau 14:** Résultats de l'AMOVA hiérarchique de  $K = 2$  à  $K = 5$  à l'aide de de subdivision en strates hiérarchisées chez les 196 lignées dérivées des six populations locales Tunisiennes de blé dur.

Sous - division des strates	Composantes de la variance	Pourcentage %
Variations entre $K=2$	271.63	17.18
Variations entre $K=3$ à l'intérieur de $K=2$	0	0
Variations entre $K=4$ à l'intérieur de $K=3$	13.46	0.85
Variations entre $K=5$ à l'intérieur de $K=4$	420.82	26.62
Variations entre les lignées avec $K=5$	957.20	60.56
Variations entre les lignées	0	0
Variations Totales	1580.63	100

Enfin, les composantes de la variance obtenues à partir de l'analyse AMOVA avec  $K = 5$  étaient significatives lorsqu'elles ont été testées à l'aide de permutations (Figure 25). Ces résultats montrent que la structure trouvée par nombre de groupes avec  $K = 5$  était valide et ne résultait pas d'un effet aléatoire.



**Figure 25:** Test de permutation d'AMOVA avec 1000 permutations pour le nombre de sous-populations  $K = 5$ .

#### **d. Diversité génétique et distance génétique entre les populations locales Tunisiennes**

La distance génétique (Tableau 15) entre les populations locales Tunisiennes montre que la sous-population de Jenah Zarzoura est la plus éloignée de toutes les autres populations, de Rommani (0,729), de Biskri et Mahmoudi (0,645), de Jenah Khotifa (0,682) et de Bidi (0,816). La sous-population de Jenah Khotifa était la plus semblable génétiquement à la plupart des autres variétés locales spécifiquement à Biskri et Mahmoudi (0,466).

**Tableau 15:** Distance génétique de Reynolds entre les populations locales Tunisiennes de blé dur sur la base du nombre de sous-populations  $K = 5$ .

Populations	BID	ZAR	BIS+MAH	JFK
ZAR	0,816			
BIS+MAH	0,624	0,730		
JFK	0,557	0,682	0,466	
ROM	0,729	0,820	0,645	0,577

BID: Bidi; JFK: Jenah Khotifa; ZAR: Jenah Zarzoura; BIS: Biskri; ROM: Rommani; MAH: Mahmoudi.

Les résultats des estimations de la diversité génétique dans chaque sous-population obtenues à partir de DAPC avec  $K = 5$  montrent que la diversité génétique la plus élevée est observée au sein des populations de Jenah Zarzoura et de Rommani ( $He = 0,27$ ). La diversité génétique la plus faible est observée au sein de la population Bidi ( $He = 0,12$ ). Biskri et Mahmoudi formant le même groupe dont 73 lignées ont montré une diversité génétique modérée ( $He = 0,23$ ). En se basant sur les valeurs de  $F_{ST}$ , Jenah Zarzoura indique une valeur de  $F_{ST}$  faible = 0,05. Ainsi, cette population présente une dérive génétique par rapport aux autres ayant une fixation d'allèles alternés avec des valeurs de  $F_{ST}$  supérieures à 0,25 (Tableau 16). Les résultats de la diversité génétique confirment ceux de la distance des allèles partagés (ASD) entre les lignées d'une même population, comme le montre la figure 24.

**Tableau 16:** Diversité génétique entre les populations locales Tunisiennes de blé dur en fonction du nombre de sous-populations  $K = 5$

Populations locales	n	He	$F_{ST}$
ZAR	32	0.27	0.05
JFK	25	0.20	0.47
BID	34	0.12	0.57
ROM	32	0.27	0.30
BIS+MAH	73	0.24	0.26

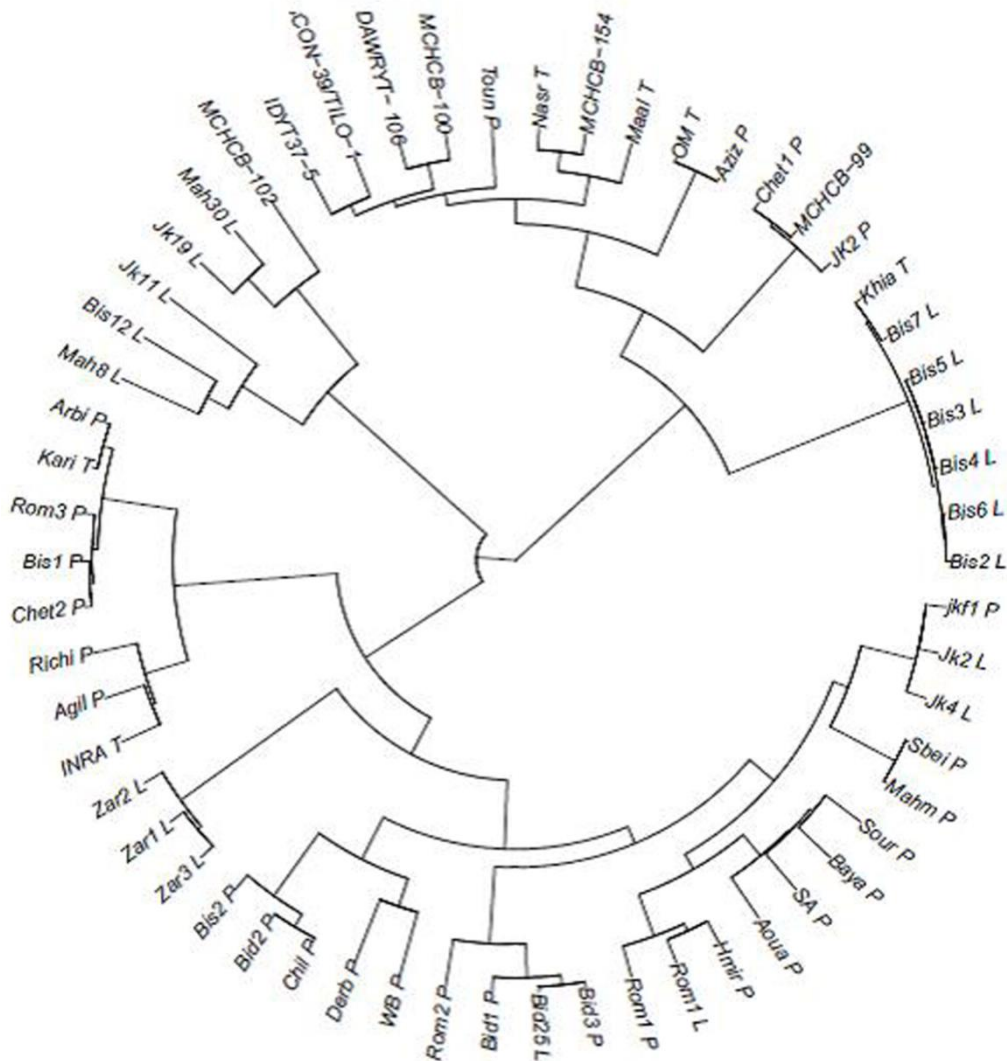
n: Nombre de lignes; He: Hétérozygotie attendue (diversité génétique);  $F_{ST}$ : mesure de la différenciation génétique. BID: Bidi; JFK: Jenah Khotifa; ZAR: Jenah Zarzoura; BIS: Biskri; ROM: Rommani; et MAH: Mahmoudi.

**e. Classification des lignées mal classées aux variétés locales cultivées et /ou aux variétés cultivées améliorées ou / et aux lignées élites ICARDA / CIMMYT**

Une analyse de classification hiérarchique basée sur la méthode ASD a été réalisée à l'aide d'un ensemble de 27 populations locales de variétés de blé dur Tunisien, de 6 variétés améliorées locales et de 7 lignées élites hybrides ICARDA / CIMMYT pour identifier les lignées potentielles non classées de l'étude précédente et la relation entre les variétés locales de blé dur Tunisien.

L'analyse du dendrogramme montre trois groupes principaux (Figure 26). Le groupe 1 contient la majorité des variétés améliorées locales et les lignées avancées de l'ICARDA et du CIMMYT, ainsi que trois variétés locales; Azizi (Aziz P), Chetla 1 (Chet1 P) et Jenah Khotifa 2 (JK2 P). Les six lignées mal assignées de Biskri (Bis) de l'ensemble 1 sont comprises dans ce groupe et sont regroupées avec la variété améliorée Khia (Khia T). Le groupe 2 contient la majorité des populations locales Tunisiennes ainsi que les deux variétés améliorées INRA69 (INRA T) et Karim (Kari T). Ce groupe est subdivisé en deux groupes. un petit groupe composé de six populations locales (Arbi (Arbi P), Rommani 3 (Rom3 P), Biskri 1 (Bis1 P), Chetla 2 (Chet2 P), Richi (Richi P), Agili (Agil P)) et les deux variétés améliorées Karim (Kar T) et INRA 69 (INRA T) et un grand groupe qui peut être divisé en deux sous-groupes, l'un d'eux constituant un groupe séparé avec uniquement les lignées de Jenah Zarzoura (Zar1 L, Zar2 L et Zar3 L) et l'autre est composé de la majorité des populations locales: Jenah Khotifa 1 (jkl1 P), Sbei (Sbei P), Mahmoudi (Mah P), Sour (Sour P), Bayadha (Baya P), Swabei Algia (SA P), Aouadi (Aoua P), Hamira (Hmir P), Rommani (Rom1 P), Bidi 1 (Bid1 P), Bidi 3 (Bid3 P), Rommani 2 (Rom2 P), Enclavé (WB P), Derbessi (Derb P), Chili (Chil P), Biskri 2 (Bis2 P) et Bidi 2 (Bid2 P). Ce dernier sous-groupe montre que les deux lignées de Jenah Khotifa (Jk2 L et Jk4 L) sont regroupées avec la population 1 de Jenah Khotifa (jkl1 P), la lignée de Rommani (Rom1 L) est groupée avec la population de Rommani (Rom1 P) et la lignée Bidi 25 (Bid25 L) est regroupée avec les populations Bidi (Bid1 P et Bid3 P). Le groupe 3 est divisé en 2 groupes; le premier groupe contient un mélange de lignées comprenant la lignée Jenah Khotifa 11 (Jk11 L), la lignée Biskri 12 (Bis12 L) et la lignée Mahmoudi 8 (Mah8 L) et le second groupe montre que les lignées non classées de Jenah Khotifa 19 (Jk19 L) et Mahmoudi 30 (Mah30 L), qui composaient le groupe de mélanges de l'étude précédente, sont regroupés avec la lignée élite hybride ICARDA / CTMMIT (MCHCB-102). Ces résultats montrent que la plupart des lignées incluses dans la sous-population mixte de l'analyse DAPC avec K = 6 sont groupées avec des variétés améliorées et

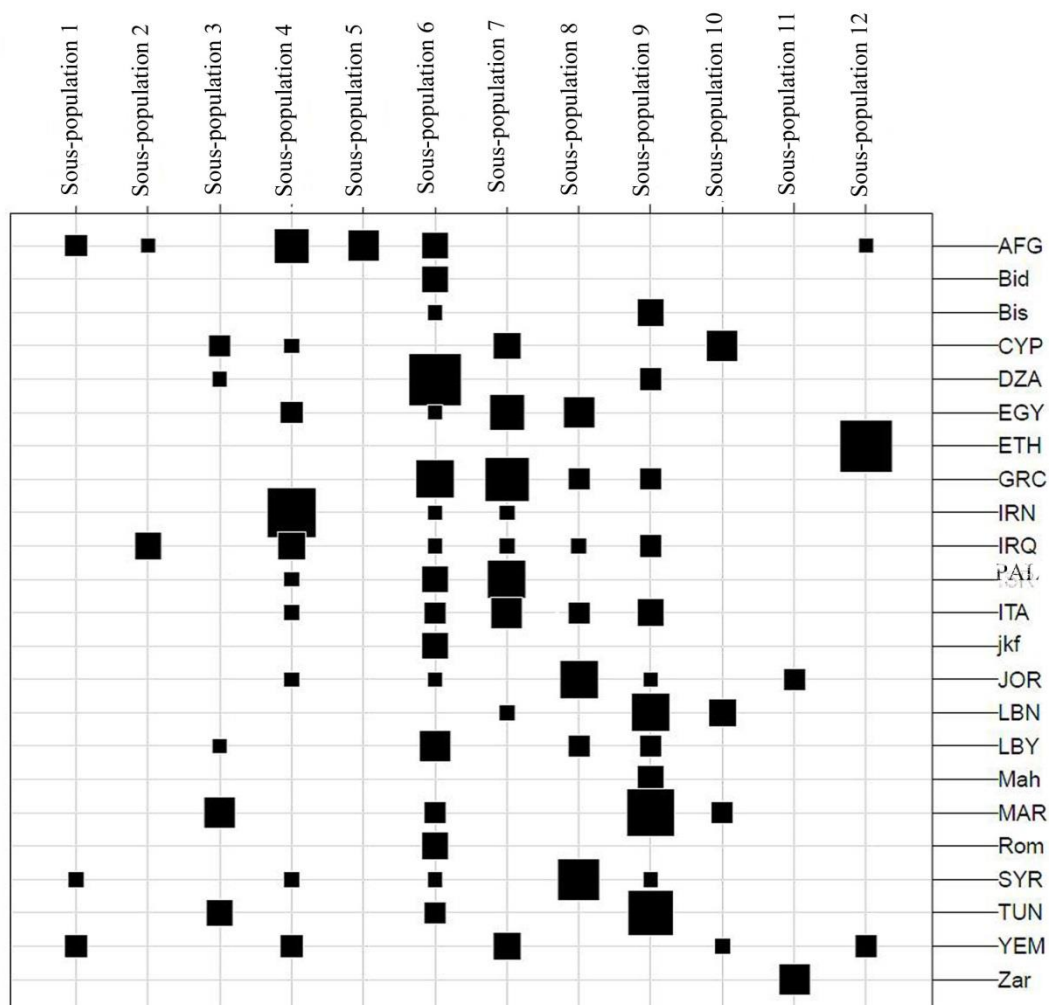
montrent également que certaines populations locales ayant le même nom local sont classées dans différents groupes.



**Figure 26:** Dendrogramme des variétés locales de blé dur Tunisien, des variétés locales améliorées et des lignées élites ICARDA / CIMMYT basé sur la distance génétique des allèles partagés (ASD). L: lignée; P: population; Variétés locales: Bid: Bidi; Mah: Mahmoudi; Rom: Rommani; Bis: Biskri; jkf: Jenah Khotifa; Zar: Jenah Zarzoura; Aziz: Azizi; Chet: Chetla; Sbei; Sour: Souri; Baya: Bayadha; SA: Swabei Algia; Aoua: Aouadhi; Hmir: Hamira; WB: WardBled; Derb: Derbessi; Chili: chili; Agil: Agili; Richi; Arbi; Toun: Tounsia; Variétés locales améliorées: OM: OmRabii; Nasr; Maal: Maali; Khia: Khia; INRAT: INRAT69; Kari: Karim; Lignées élites ICARDA / CIMMYT: MCHCB-102: lignée hybride ICARDA; MCHCB-100: IcaJoudy1; DAWRYT-106: Nachit; MCHCB-154: Zeina4; Con39 / Tilo-1: Louiza; IDYT37-5: Ammar 6; MCHCB-99: Ammar 10.

## **f. Comparaison des populations locales tunisiennes aux populations locales des régions de la Méditerranée et de l'Asie occidentale**

La structure de population des populations locales de la Méditerranée et de l'Asie occidentale, ainsi que quatre lignées représentant chacune des populations locales Tunisiennes de l'ensemble 1, a été évaluée à l'aide de la méthode DAPC. Le nombre optimal de groupements était  $K = 12$  sur la base du critère BIC en utilisant 66 PCs, qui explique 82% de la variation moléculaire totale. La sous-population 6 montre que les populations locales Tunisiennes Rommani (Rom), Jenah Khotifa (jkh) et Bidi (Bid) sont regroupées avec la majorité des populations locales Algériennes (8); la sous-population 12 comprend toutes les populations locales Ethiopiennes (11), une accession d'Afghanistan et deux accessions du Yémen; la sous-population 9 montre que les populations locales Tunisiennes Biskri (Bis) et Mahmoudi (Mah) sont toujours regroupées ensemble et sont regroupées avec les cinq populations locales restantes de la Tunisie et la majorité des populations locales Algériennes et Libanaises (6) et certaines populations locales Marocaines (3). La sous-population 11 comprend exclusivement la population locale Tunisienne Jenah Zarzoura (Zar) avec deux accessions originaire de la Jordanie (Figure 27). Les résultats de la structure de la population ont confirmé que la population locale nouvellement collectée, Jenah Zarzoura, constitue un nouveau pool génétique et que les populations locales Tunisiennes sont génétiquement plus proches des populations locales Nord-Africaines.



**Figure 27:** Diagrammes sous forme de tableau comparant la classification des populations locales Méditerranéennes, Asiatiques et Tunisiennes aux sous-populations utilisant DAPC avec  $K = 12$ . AFG: Afghanistan; CYP: Chypre; DZA: Algérie; EGY: Egypte; ETH: Éthiopie; GRC: Grèce; IRN: Iran, IRQ: Irak; APL: Palestine; ITA: Italie; JOR: Jordan; LBN: Liban; LBY: Libye; MAR: Maroc; SYR: Syrie; TUN: Tunisie; YEM: Yémen.

#### 4. Discussion

La disponibilité et l'utilisation des techniques de marqueurs moléculaires sont des outils importants pour mieux comprendre la diversité génétique.

Afin d'entreprendre la cartographie des associations et pour assurer une conservation efficace et une bonne gestion des ressources génétiques. Cette étude a démontré la robustesse de la technologie DArTseq en tant qu'outil fiable et rentable pour évaluer la diversité au sein

des populations locales et entre celles-ci ainsi que de les comparer à des populations locales étrangères de blé dur.

Cette technique a donné un grand nombre de marqueurs polymorphes et informatifs répartis également sur les génomes A et B, elle a permis une couverture élevée des génomes du germoplasme de blé dur Tunisien par rapport aux autres techniques moléculaires utilisées précédemment. Une couverture similaire des génomes du blé dur a été trouvée sur un panel de 170 accessions de blé dur (Sieber et al., 2017). Cette large couverture des génomes peut servir à entreprendre la cartographie d'association dans le matériel génétique étudié, notamment la recherche de nouvelles variations alléliques pour les caractères recherchés par les améliorateurs, tels que les QTL trouvés dans les chromosomes 7A et 2B, liés à la teneur en protéines (Marcotuli et al., 2017), la force du gluten, la teneur en pigment jaune (Patil et al., 2008; Colasuonno et al., 2014) la tolérance à la salinité et les composantes du rendement (Turki et al., 2015; Mangini et al., 2018). La technologie DArTseq ainsi que d'autres processus à haut débit et de génotypage par séquençage sont de plus en plus utilisés pour étudier la diversité génétique de différentes cultures, car ils permettent d'étudier la diversité génétique chez un grand nombre d'accessions et chez les espèces ayant des génomes complexes (Chen et al., 2018; Nadeem et al., 2018).

#### **a. Polymorphisme des marqueurs DArTseq chez les populations locales de blé dur Tunisien**

Le contenu des informations polymorphiques (PIC) révélé par les marqueurs DArTseq était en moyenne de 0,165 avec une distribution asymétrique par rapport aux valeurs basses. La même tendance de répartition a été retrouvée en utilisant la même approche pour 91 populations locales de blé dur du croissant fertile et pour 138 accessions de blé du Sud-Ouest de la Chine (Baloch et al., 2017; Chen et al., 2018). Ren et al., (2013) ont montré la même valeur PIC pour les accessions de blé dur de l'Afrique du Nord (0,168) en utilisant 946 marqueurs SNP dans le cadre d'une étude de la diversité génétique dans une collection mondiale de populations locales de blé dur. Des études récentes utilisant des marqueurs DArTseq ont rapporté des valeurs PIC supérieures pour la collection mondiale constituée des populations locales de blé dur (0,35) et pour des accessions provenant du croissant fertile central (0,26) (Baloch et al., 2017; Sieber et al., 2017). Une étude précédente portant sur 34 variétés anciennes de blé dur Tunisien avait indiqué une valeur PIC de 0,68 (Medini et al., 2005). Cette différence s'explique par la nature bi-allélique des marqueurs DArT pour

lesquels la valeur maximale pour le PIC est de 0,5 par rapport aux marqueurs SSR multi-alléliques avec la valeur PIC maximale de 1 (Botstein et al., 1980).

Les lignées des six populations locales Tunisiennes de blé dur ont montré un niveau modéré de diversité génétique ( $He = 0,25$ ), supérieur à celui présenté par un ensemble de collections mondiales de blé dur ( $He = 0,224$ ) utilisant les marqueurs SNP (Ren et al., 2013). Nos résultats ont confirmé des résultats antérieurs montrant que le croisement fertile, ainsi que les populations locales de blé dur de la Méditerranée orientale sont plus diversifiées (Oliveira et al., 2014; Soriano et al., 2018). Bien que plusieurs études aient révélées une grande diversité génétique chez les variétés locales Tunisiennes basée sur la caractérisation phénotypique (Sourour and Hajer 2008; Sourour, et al. 2010), le niveau modéré de diversité génétique pourrait s'expliquer par le fait que les lignées Tunisiennes de blé dur incluses dans cette étude sont dérivées de six populations locales qui sont collectées dans une zone géographique limitée du Centre et du Sud de la Tunisie.

#### **b. Diversité génétique et structure de population de la collection de blé dur Tunisien**

La méthode «ASD» utilisant les marqueurs DArTseq a permis de différencier les six populations locales Jenah Zarzoura, Biskri, Jenah Khotifa, Mahmoudi, Bidi et Rommani en montrant des distributions de distances différentes. Deux méthodes, l'analyse de classification hiérarchique basée sur les distances des allèles partagés (ASD) et l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC) ont été utilisées pour décrire la relation génétique et la structure de la collection Tunisienne de blé dur. La première méthode a classé le panel en cinq groupes correspondant principalement aux noms des populations attribués par les paysans et a permis de montrer que la population Jenah Zarzoura est la plus éloignée, et que les populations Mahmoudi et Biskri constituent le même pool génétique. L'étroit rapprochement entre Mahmoudi et Biskri a été rapporté depuis longtemps par Bœuf, 1932 sur la base de la couleur de la glume et de l'épi (Bœuf, 1932), ce qui pourrait être dû à l'échange de ces variétés entre les agriculteurs Algériens et Tunisiens (Miège, 1950). La distinction claire de Jenah Zarzoura pourrait être due à son confinement à une zone géographiquement limitée de l'oasis de Mareth ou à un mode d'introduction différent.

L'utilisation de la méthode multi variée DAPC pour évaluer la structure de la population a montré de meilleures performances et a permis une subdivision de la population similaire à celle d'autres études (Jombart et al., 2010; Kabbaj et al., 2017). Plusieurs approches moléculaires ont été utilisées pour évaluer la structure de la population chez les variétés



anciennes de blé dur, depuis les SSR jusqu'aux DArT (Ruiz et al., 2012; Soriano et al., 2016). Plus récemment, les approches GBS-SNP et DArTseq ont été principalement utilisées pour les études de structure de la population de blé hexaploïde (Alipour et al., 2017; Eltaher et al., 2018). Toutefois, dans la littérature la technologie DArTseq n'a pas eu une grande application chez le blé dur, malgré la robustesse de cette méthode dans la description de la structure de population de 91 accessions originaires du croissant fertile central et dans la classification des populations locales turques et syriennes dans le même pool génétique (Baloch et al., 2017). Dans ce travail, les résultats de l'analyse DAPC concordaient avec ceux de l'analyse de classification hiérarchique basée sur les ASD, malgré des différences mineures. Les deux méthodes ont montré une bonne adéquation entre le groupement et les noms des variétés attribuées par les paysans, ce qui reflète la capacité des agriculteurs et/ou paysans à différencier entre les variétés locales. Cependant, un petit groupe composé d'un mélange de populations locales est apparu ainsi que certaines lignées de populations différentes sont incluses dans différents groupes, ce qui pourrait être dû principalement à une mauvaise désignation des populations lors des missions de collecte et à des mélanges possibles dans les populations. Ces résultats confirment le caractère multi lignées des populations locales qui a été prouvé également par des études de caractérisations morphologiques et agronomiques (Jaradat, 2013). Cette hétérogénéité offre un important pouvoir tampon aux populations locales dans des environnements sujets à la sécheresse et aux fluctuations environnementales.

L'analyse AMOVA hiérarchique basée sur la subdivision en strates hiérarchiques allant de  $K = 2$  à  $K = 5$  est en accord avec les résultats de l'analyse DAPC et confirme le niveau élevé de variance moléculaire à  $K = 2$  (17,18%) et à  $K = 5$  (26,62%). Les résultats de l'analyse AMOVA sur la base des noms des populations locales ont indiqué une variation génétique plus élevée plutôt entre (28,79%) qu'à l'intérieur (0,82%) des populations locales Tunisiennes. Tenant compte de la structure de la population basée sur le nombre optimal de groupements  $K = 5$ , les résultats de l'AMOVA ont montré une augmentation du pourcentage de la variance génétique expliquée entre les populations locales (~ 31,77%) et une diminution de la variance génétique au sein de celles-ci. Soriano et al., (2016) ont révélé beaucoup de variabilité au sein des sous-populations (83%) qu'entre elles (17%) (Soriano et al., 2016) et Mangini et al., (2017) ont trouvé une plus grande diversité génétique au sein des deux populations locales Italiennes de blé dur «Bianchetta» et «Grano Ricco» (respectivement 9,5% et 9,4%) par contre une faible diversité génétique à l'intérieur de «Dauno III».

Cette étude nous a permis d'évaluer pour la première fois la diversité génétique au sein des populations locales de blé dur Tunisien et entre celles-ci en utilisant la technique DArTseq, ce qui nous a permis de montrer différents niveaux de diversité génétique dans les populations locales. Les populations de Jenah Zarzoura et de Rommani présentaient la diversité génétique la plus élevée ( $H_e = 0,27$ ) et la population Bidi, la diversité génétique la plus faible ( $H_e = 0,12$ ). La faible variation génétique au sein des populations locales pourrait être expliquée par la sélection des agriculteurs pour les traits souhaitables et / ou la pression des conditions environnementales. Par rapport aux autres populations locales, la population Jenah Zarzoura a montré une forte hétérozygotie attendue ( $H_e = 0.268$ ) et un faible indice de fixation ( $F_{ST} = 0.05$ ). Ainsi, cette petite différenciation pourrait être expliquée par: le confinement de cette population à un environnement spécifique dans l'oasis de Mareth, qui reflète l'isolement géographique de l'oasis de Mareth; les échanges de semences limités; et la pression de sélection exercée par les agriculteurs. Le plus souvent, les agriculteurs sélectionnent les meilleurs épis représentatifs d'une population pour former les lots de semences.

### **c. Origine du blé dur Tunisien**

La classification hiérarchique basée sur l'ASD a été étendue à 27 autres populations locales Tunisiennes, des variétés améliorées Tunisiennes, des lignées élites hybrides de l'ICARDA, ainsi que les lignées incluses dans le groupe mixte lorsque  $K = 6$  de l'ensemble 1. L'analyse du dendrogramme a montré une grande diversité génétique entre le matériel génétique étudié. Les six lignées de la population locale Biskri qui ont été mal classées dans la sous-population supplémentaire lorsque  $K = 6$  dans l'analyse de l'ensemble 1 précédente ont été groupées avec le cultivar moderne Khiair, et les deux lignées mal classées de Mahmoudi et Jenah Khotifa ont été regroupées avec la lignée élite reçue de l'ICARDA (MCHCB-102). Ces résultats confirment la possibilité de mélange dans certaines populations, ce qui pourrait être dû aux pratiques d'échange de semences et/ou de battage comme suggérées par d'autres études (Jaradat, 2013; Sahri et al., 2014). Cette étude génétique étendue confirme l'unicité de la population locale Jenah Zarzoura et la classification des lignées Jenah Khotifa, Rommani et Bidi avec leurs populations respectives, mais pas avec les autres populations du même nom. Cela pourrait être dû à une mauvaise désignation des populations locales lors de l'échange de semences entre agriculteurs ou lors des missions de collecte entreprises par les équipes de la banque nationale de gènes.

La Tunisie est considérée comme un centre secondaire de diversité pour le blé dur et les voies d'introduction de populations locales de blé dur en Tunisie et en Afrique du Nord sont toujours en cours de discussion. L'analyse DAPC incluant les populations locales de la Tunisie et d'autres régions des pays Méditerranéens et de l'Asie occidentale nous a permis de définir 12 groupes distincts, qui peuvent être utilisés pour mettre en évidence les relations entre les populations locales Tunisiennes et d'autres populations locales. La plupart des populations locales Tunisiennes conservées à la banque de gènes de l'ICARDA, ainsi que les lignées issues des populations locales récemment collectées en Tunisie, ont été regroupées avec les populations des pays voisins de l'Afrique du Nord et avec celles de la Grèce, de l'Italie et du Liban. Jenah Zarzoura est restée distincte de toutes les populations locales étudiées, à l'exception des deux populations locales originaires de la Jordanie. Ces résultats suggèrent que la plupart des populations locales Tunisiennes pourraient être obtenues à travers le Liban via la Grèce et l'Italie, tandis que Jenah Zarzoura a été obtenue via une autre voie d'introduction. Des rapports antérieurs ont montré deux types de dispersion du blé dur dans le bassin méditerranéen depuis le croissant fertile: au Nord par la Turquie, la Grèce et l'Italie et au sud par l'Afrique du Nord (Mac Key, 2005). Moragues et al., (2007) ont soutenu cette hypothèse et ont classé une collection de populations locales de blé dur originaires de différents pays méditerranéens en deux groupes (Moragues et al., 2007): (i) populations locales du Nord et Est du bassin Méditerranéen et (ii) populations locales de l'Afrique du Nord et de la Péninsule Ibérique. Plus récemment, Soriano et al., (2016) ont montré une dispersion Est-Ouest des populations locales du blé dur méditerranéen, qui ont été classées en quatre sous-populations (Soriano et al., 2016): (i) la Méditerranée orientale, (ii) les régions Balkaniques de l'Est et la Turquie, (iii) les régions Balkaniques de l'Ouest, et (iv) L'Égypte et la Méditerranée occidentale. Le regroupement des populations locales de l'Afrique du Nord avec l'Italie et la Grèce a également été confirmé par Olivera et al., (2012) et Nazco et al., (2012), et pourrait être expliqué par l'influence romaine sur la culture du blé dur en Afrique du Nord (Nazco et al., 2012; Oliveira et al., 2012). Le développement précoce des activités maritimes commerciales de Carthage en Méditerranée a renforcé les échanges des semences entre la Tunisie et les pays méditerranéens (Essid, 2012), ce qui pourrait expliquer le regroupement des lignées de Bidi, Jenah Khoutifa et Rommani avec la majorité des populations locales Algériennes (sous-population 6) et des lignées de Biskri et Mahmoudi avec des populations locales Libanaises et Marocaines (sous-population 9). De plus, nos travaux ont confirmé que les lignées des populations Biskri et Mahmoudi appartiennent au même pool génétique, par contre les lignées de la population Jenah Zarzoura constituent un

nouveau pool de gènes distant des autres populations locales Tunisiennes et étrangères. Ces lignées ont été regroupées avec seulement deux entrées de la Jordanie (sous-population 11). Une explication possible est que la population de Jenah Zarzoura, provenant de l'oasis de Mareth, située dans le sud de la Tunisie, près de la mer Méditerranéenne, aurait pu être introduite de l'Est par différents chemins, probablement de l'Égypte aux pays voisins et éventuellement reçues de la Palestine et de la Jordanie (Bonjean et Angus, 2001; Perrino et Porceddu, 1990), ou par l'introduction par les Phéniciens du Liban à Carthage entre le IXe et le IIe siècle av. J.-C. (Essid, 2012). Au cours de la période romaine (VIIe-IIIe siècles av. J.-C.), la Tunisie devint le grenier à pain de la péninsule italienne et la source de l'excellente qualité de la semoule issue du blé dur cultivé dans les pays de l'Afrique du Nord (D'Arcy, 1946). Les populations locales de la Tunisie et de l'Afrique du Nord ont également été attribuées aux introductions de Romains, qui ont contribué à la modernisation des systèmes d'irrigation et à l'extension de la culture du blé au Sud de la Tunisie (Essid, 2012).

## **II. Evaluation des caroténoïdes chez les populations locales de blé dur dans des environnements contrastés.**

### **1. Résumé**

Développer des variétés de blé dur riches en caroténoïdes (pigments jaunes) est devenue l'une des objectifs des améliorateurs, pour répondre aux exigences du marché pour une bonne qualité de semoule, malgré les contraintes climatiques. Dans ce contexte, nous avons évalué la teneur des caroténoïdes avec deux méthodes (l'indice du pigment jaune  $b^*$  et la teneur totale des caroténoïdes de la semoule) dans une collection de 187 lignées issues de six populations locales Tunisiennes et 7 lignées élites témoins reçus de l'ICARDA, dans six environnements utilisant le modèle alpha lattice avec deux répétitions: i) la localité Mornag sous des conditions pluviales durant deux années successives 2015-2016 (Environnement 1 et environnement 2) et ii) la localité Kairouan sous des conditions d'irrigation totale durant deux années successives 2016-2017 (100% de l'évapotranspiration ETR, Environnement 3 et Environnement 4) et sous des conditions de stress hydrique durant deux années successives 2016-2017 (25% de l'évapotranspiration ETR, Environnement 5 et Environnement 6). Nos résultats ont montré une grande variabilité aussi bien de l'indice du jaune (valeur du  $b^*$ ) que de la teneur totale en caroténoïdes entre les lignées de chaque population dans les six environnements. La comparaison des moyennes de l'indice du pigment jaune  $b^*$  entre les tous les environnements a montré que les conditions pluviales favorisent mieux l'expression des caroténoïdes et que certaines populations locales présentent des teneurs en caroténoïdes plus élevées que les variétés améliorées Tunisiennes, dont certaines lignées ayant des teneurs qui dépassent les lignées élites de l'ICARDA. L'héritabilité attendue  $H^2$  aussi bien de l'indice du pigment jaune  $b^*$  que de la teneur totale des caroténoïdes dans tous les environnements est très élevée, allant de 0.72 à 0.95 et de 0.89 à 0.95, respectivement. Cette étude a montré également un effet environnement prédominant et pas d'interaction environnement\*génotype pour ce caractère. L'analyse de régression progressive a révélé que les composantes de rendement contribuent en majorité dans l'augmentation de l'indice du pigment jaune. De plus, l'analyse «path» a démontré un effet direct positif du rendement en grain (0.3319) et des effets directs négatifs du nombre d'épis/m<sup>2</sup> (-0.6537) et du poids de milles grains (-0.4257) sur la teneur en pigment jaune. Cette étude a permis d'identifier des lignées issues des populations locales Tunisiennes très riches en caroténoïdes dont le potentiel est stable dans

tous les environnements, qui pourront être utilisées dans des programmes d'améliorations nationales et internationales.

**Mots clés:** Population locale Tunisienne, Indice du pigment jaune, caroténoïdes

## 2. Introduction

En Tunisie, le blé dur est la céréale la plus cultivée dans les régions pluviales. Elle représente 70% de la production totale de blé. La consommation pourrait atteindre 265 kg par an et par capita. Cette espèce est considérée comme une culture stratégique en raison de son importance socio-économique. Elle est principalement utilisée pour la fabrication de pâtes, mais elle constitue également la matière première pour la production d'autres produits traditionnels tels que les pains traditionnels, le couscous et le boulghour. Toutefois, la production présente des fluctuations interannuelles dues à l'irrégularité inter annuelle de la pluviométrie.

La perte de diversité génétique due au système d'intensification et d'utilisation des cultivars modernes homogènes de blé dur améliorés plus productifs (Newton et al., 2011), au détriment des populations locales, connus pour être bien adaptées aux conditions environnementales locales et à la gestion des pratiques traditionnelles, ont accentué leur vulnérabilité aux stress biotiques et abiotiques et même engendrer la perte de quelques traits de qualité. Récemment, l'amélioration de la qualité du grain de blé dur est devenue l'un des principaux objectifs des programmes d'amélioration génétique, en raison de la demande croissante du marché pour une bonne qualité de blé dur, malgré de nombreuses contraintes abiotiques tels que la sécheresse et le stress thermique et les contraintes biotiques.

Au cours des dernières décennies, la teneur en pigments jaunes ou caroténoïdes du grain, due à la présence de xanthophylles dans l'endosperme, principalement de la lutéine et d'autres composés apparentés (Hentschel et al., 2002), est devenue un critère important dans l'évaluation de la qualité de la semoule, la détermination de la valeur commerciale et de la qualité nutritionnelle des produits finis en mesurant l'indice du pigment jaune (YPI) (Ficco et al., 2014). La teneur totale en caroténoïdes dans le grain est également très importante pour la santé humaine en raison de ses propriétés anti oxydantes et d'être le précurseur de vitamine A. En effet la lutéine et la zéaxanthine ont été démontrées associées à la prévention de la dégénérescence maculaire et aux cataractes, mais aussi à la prévention de certains cancers et maladies cardio-vasculaires. En outre, ces pigments jaunes jouent le rôle de pigments secondaires dans la photosynthèse chez les plantes. ils sont impliqués dans la protection

photo-oxydante (Havaux, 2014) et servent également de précurseurs de l'hormone des acides abscissiques.

Bien que les niveaux de caroténoïdes dans le blé dur soient relativement faibles entre 4 et 8 ppm (Troccoli et al., 2000), toutefois il existe une variation génétique importante. Il a été démontré que les populations locales accumulent généralement des niveaux de caroténoïdes plus élevés. Certains auteurs ont décrit que la teneur totale des caroténoïdes est influencée par des facteurs environnementaux, par contre d'autres études prouvent le contraire. Cependant, malgré la prédominance de l'effet génétique de ce caractère et une héritabilité relativement élevée entre 0,85 et 0,97 qui ont été démontré par plusieurs travaux (Elouafi et al., 2001; Clarke et al., 2006; Roncallo et al., 2012), l'interaction génotype \*environnement reste non encore bien élucidée.

La présente étude a pour objectif de:

1) Evaluer pour la première fois les caroténoïdes (pigments jaunes) chez les différentes populations locales composées de 189 lignées de blé dur et celles des lignées élites reçues de l'ICARDA dans plusieurs environnements sous différents régimes hydriques différents en Tunisie.

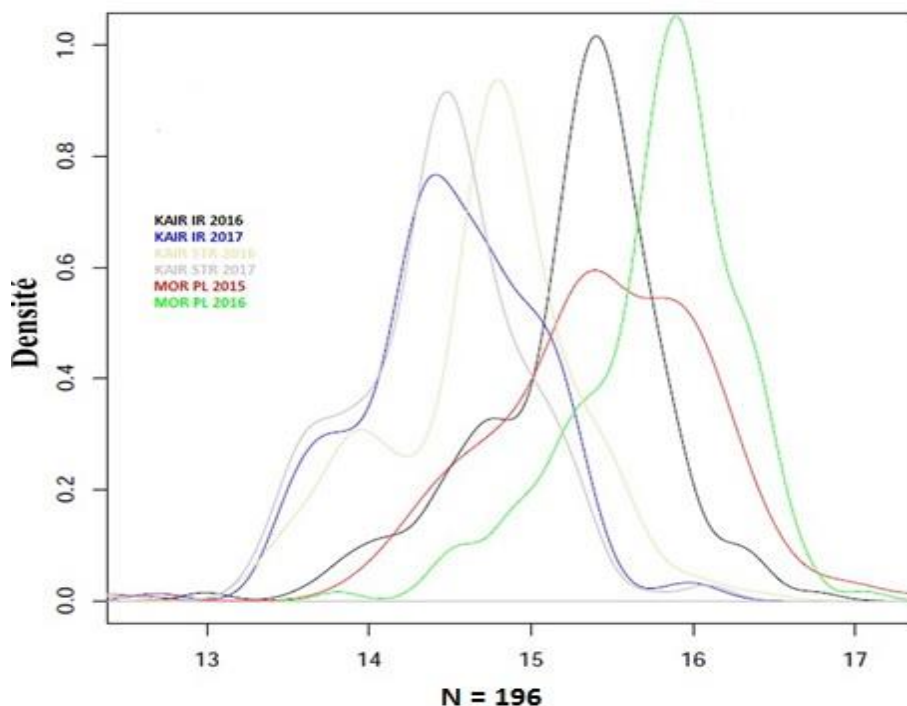
2) Etudier l'interaction génotype \* environnement pour le caractère teneur en caroténoïdes (pigments jaunes)

3) Déterminer les facteurs affectant la teneur totale en caroténoïdes (pigments jaunes).

### **3. Résultats**

#### **a. Evaluation de l'indice du jaune (b\*) de la semoule chez les lignées de blé dur local dans six environnements différents.**

L'évaluation de l'indice du jaune (valeur du b\*) de la semoule d'une collection de 196 accessions composé de 189 lignées de blé dur issues de six variétés locales (Ensemble 1) et de sept lignées élites témoins reçues de l'ICARDA a montré une variabilité importante entre les lignées dans les différents environnements étudiées (Figure 30). Toutefois, cette variabilité est moins prononcée dans les deux sites de Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2015 et de Kairouan en mode irrigué pendant la campagne 2017. Les résultats de la distribution de l'indice du jaune en fonction des différents environnements ont montré une densité faible ainsi qu'une distribution plus étalée pour ces deux sites mentionnant que la majorité des génotypes présentent des valeurs de b\* proches (Figure 28).



**Figure 28:** Variation de l'indice du jaune (valeur du b) chez les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes de blé dur dans six environnements; KAIR IR 2016: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 100% ETR pendant la campagne 2016; KAIR IR 2017: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 100% ETR pendant la campagne 2017; KAIR STR 2016 Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 25% ETR pendant la campagne 2016, KAIR STR 2017: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 25% ETR pendant la campagne 2017; MOR PL 2015: Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2015; MOR PL 2016 : Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2016.

La comparaison des moyennes de l'indice du pigment jaune  $b^*$  entre les différents environnements a montré que les valeurs les plus élevées sont enregistrées dans le site de Mornag où les essais sont conduits en pluvial, aussi bien pour la campagne 2015 que celle de 2016 (15.48 - 15.77, respectivement) (Tableau 17). Pour le site de Kairouan, en comparant l'indice du pigment jaune  $b^*$  entre les traitements pour chaque année, une augmentation de cet indice est observée en condition irrigué qui est plus visible en 2016, soit une moyenne de 15.25 en mode irrigué et une moyenne de 14.67 en mode stressé.



**Tableau 17:** Comparaison des moyennes de l'indice du jaune d'une collection de blé dur Tunisienne dans les six environnements.

Environnements	Indice du pigment jaune (valeur du b*)			
	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart
Kairouan IR 2016	15.25	12.99	16.75	3.76
Kairouan STR 2016	14.69	12.25	16.40	4.15
Kairouan IR 2017	14.51	12.69	16.08	3.39
Kairouan STR 2017	14.44	12.4	16.01	3.61
Mornag PL 2015	15.48	12.5	17.89	5.39
Mornag PL 2016	15.77	13.08	17.06	3.98

IR: Mode irrigué à 100% ETR, STR: Mode irrigué à 25% ETR; PL: Mode pluvial

La comparaison des moyennes de l'indice du jaune b\* pour chaque sous - population déjà identifiée par l'étude moléculaire dans le chapitre précédent a montré que les sous-populations Rommani ainsi que Biskri présentent les moyennes les plus élevées (15.41 et 15.04, respectivement) en considérant les six environnements comparativement aux autres populations locales étudiées (Tableau 18). La sous - population Rommani possède une moyenne de cet indice supérieur aux variétés Tunisiennes identifiées majoritairement comme Khiaar par l'étude moléculaire (15.30). Toutefois, les lignées ICARDA/CIMMYT utilisées comme témoins dans cette étude ont montré la moyenne la plus élevée de cet indice (15.45) en le comparant aux autres populations locales ainsi qu'aux variétés améliorées tunisiennes. Par ailleurs, parmi les 189 lignées issues variétés locales tunisiennes, certaines lignées de la sous-population Biskri présentent un indice du jaune de 16.46 proche d'une lignée élite ICARDA/CIMMYT utilisée comme témoin positif (16.68) et supérieur à la meilleure variété améliorée tunisienne (15.47).

**Tableau 18:** Moyenne de l'indice du jaune des six environnements pour chaque population locale, variétés améliorées tunisiennes et les lignées élites de blé dur de l'ICARDA.

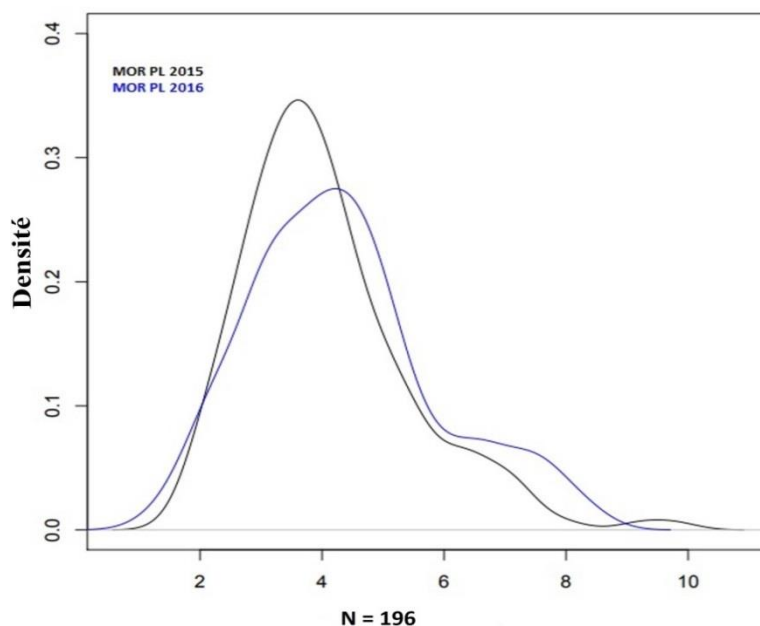
Indice du jaune de la semoule (valeur du b*)				
Population	Moyenne	Minimum	Maximum	E std
Bidi	14.46	14.10	15.59	0.33
Biskri	15.04	14.45	16.46	0.31
Lignées ICARDA/CIMMYT témoins	15.45	14.28	16.68	0.88
Jenah khotifa	15.23	12.97	15.84	0.70
Jenah Zarzoura	14.89	13.99	15.92	0.52
Mahmoudi	14.96	14.71	15.25	0.11
Rommani	15.41	15.08	15.92	0.21
Variétés améliorées Tunisiennes	15.30	15.08	15.47	0.14

E std: Erreur standard

**b. Evaluation de la teneur en caroténoïdes totaux (TCC) de la semoule chez les lignées locales de blé dur conduites en conditions pluviales.**

L'évaluation de La teneur totale en caroténoïdes chez les 196 lignées de blé dur locales dans le site de Mornag, où les essais sont conduit en pluvial, durant deux années successives 2015-2016 a montré une distribution similaire entre les deux années de ce caractère mentionnant une variabilité entre les génotypes qui est légèrement plus prononcée en 2015 (Figure 29).

La comparaison des moyennes de ce caractère entre les années a montré des valeurs proches, 4.71  $\mu\text{g/g}$  durant la campagne 2015 et 4.33  $\mu\text{g/g}$  durant la campagne 2016 (Tableau 19). Cependant durant la campagne 2015, nous avons trouvé des génotypes qui pouvaient avoir des teneurs très élevées en caroténoïdes qui pouvaient atteindre 14  $\mu\text{g/g}$  comparativement à la campagne 2016 où le maximum était de 8.43  $\mu\text{g/g}$ .



**Figure 29:** Variation de la teneur totale des caroténoïdes chez les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes de blé dur dans le site de Mornag durant deux campagnes successives 2015-2016. MOR PL 2015: Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2015; MOR PL 2016 : Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2016.

**Tableau 19:** Moyennes, maximum et minimum de l'indice du jaune dans les deux environnements à la station Mornag durant les campagnes agricoles 2015 et 2016.

Teneur totale en caroténoïdes			
Environnements	Moyenne	Minimum	Maximum
Mornag PL 2015	4.71	1.34	14.11
Mornag PL 2016	4.33	1.30	8.43

La comparaison des moyennes de la teneur totale en caroténoïdes exprimée en  $\mu\text{g/g}$  de lutéine entre les différentes populations au site de Mornag durant les deux campagnes 2015 - 2016 a montré que la population Biskri présente la teneur en lutéine la plus élevée ( $5.39 \mu\text{g/g}$ ) et que la population Bidi présente la teneur la plus faible ( $3.36 \mu\text{g/g}$ ) (tableau 20). En comparant les moyennes des populations locales aux variétés améliorées Tunisiennes, les populations Biskri et Jenah Khotifa ont montré des teneurs totales supérieures en caroténoïdes ( $5.39 - 4.84 \mu\text{g/g}$ , respectivement). Toutefois, les teneurs totales en caroténoïdes des différentes populations locales étudiées restent inférieures aux lignées élites de l'ICARDA/CIMMYT utilisées comme témoins ( $7.30 \mu\text{g/g}$ ). Sur la base des valeurs maximales des teneurs totales en caroténoïdes, le tableau c a montré que certaines lignées de

la population Jenah Khotifa présentent des valeurs plus élevées (8.36 µg/g) que les lignées élites témoins reçus de L'ICARDA (8.24 µg/g) (tableau 20). Par ailleurs, les trois populations Jenah Khotifa, Biskri et Mahmoudi renferment également des lignées ayant des teneurs totales en caroténoïdes (8.36 - 7.93 - 7.29 µg/g, respectivement) plus élevées que la variété améliorée Tunisiennes la plus riche en lutéine (6.69 µg/g).

**Tableau 20:** Moyenne, maximum et minimum de l'indice du jaune de différentes variétés locales et améliorées tunisiennes et des lignées témoins de blé dur évaluées à Mornag durant 2015 et 2016.

Teneur totale en caroténoïdes				
Population	Moyenne	Minimum	Maximum	E std
Bidi	3.36	1.33	4.95	1.09
Biskri	5.39	2.38	7.93	1.54
Lignées ICARDA/CIMMYT témoins	7.30	6.19	8.24	0.71
Jenah khotifa	4.84	2.31	8.36	1.61
Jenah Zarzoura	3.75	2.07	5.68	1.02
Mahmoudi	4.28	2.19	7.29	1.08
Rommani	3.38	1.77	5.25	1.039
Variétés améliorées Tunisiennes	4.74	3.14	6.69	1.06

E std: Erreur standard

### c. Etude de l'interaction génotype\*environnement pour l'indice du pigment jaune et de la teneur totale en caroténoïdes

L'étude de l'interaction entre les génotypes, le site et l'année pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes est basée sur l'étude de l'héritabilité étendue H2 et l'interaction entre différents environnements pour toutes les années.

#### ➤ Etude de l'héritabilité de l'indice du jaune, de la teneur totale en caroténoïdes du grain et d'autres traits de qualité du grain et des caractères agromorphologiques

L'estimation de l'héritabilité étendue H2 de l'indice du jaune du grain (valeur du b\*) chez la collection de 196 lignées dans les six environnements est très élevée. Elle est comprise entre 0,72 et 0,95. Le tableau 21 montre que l'héritabilité la plus élevée est enregistrée durant

la campagne 2017 dans le site de Kairouan aussi bien en mode irrigué qu'en mode stressé (0,95), alors que l'héritabilité la moins élevée est observée durant la campagne 2016 dans le site de Mornag conduit sous des conditions pluviales (0,72). Ces résultats reflète un effet génétique prédominant et un très faible effet environnement de ce caractère.

Par ailleurs, l'héritabilité étendue H<sup>2</sup> de la teneur totale des caroténoïdes (TTC) estimée dans uniquement deux environnements représenté par le site de Mornag en mode pluviale durant les deux campagnes 2015 et 2016 est très élevée, 0,85 et 0,9, respectivement. Ces résultats démontrent également la prédominance de l'effet génétique de ce caractère dans la collection de blé dur étudiée avec un effet environnement minime.

Concernant les autres traits de qualité du grain tels que la teneur en protéines (Gpr), le SDS, l'indice du a\* et l'indice du l\*, l'héritabilité étendue de la majorité de ces caractères est aussi élevée (Tableau 21). Néanmoins, les résultats ont montré des fluctuations plus prononcées de cette héritabilité pour la teneur en protéines allant de 0.56 dans le site de Mornag en 2016 jusqu'à 0.96 dans le site de Kairouan en mode stressé en 2017, alors que l'héritabilité des autres traits est très élevée quelque soit le site et le traitement.

Toutefois, la majorité des traits impliqués dans le rendement montrent une héritabilité plus faible, surtout pour le nombre d'épis/m<sup>2</sup> (NS) allant de 0.12 dans le site de Kairouan en mode irrigué en 2017 jusqu'à 0.42 dans le site de Kairouan en mode stressé en 2016. En effet, l'héritabilité du rendement en grain est variable d'une année à une autre avec un maximum de 0.69 dans le site de Mornag en 2015 et un minimum de 0.25 dans le site de Kairouan en mode stressé en 2016. Les deux composantes du rendement en grains, le nombre de grains / épi (NS) et le poids du grain / épi (NGE) ont montré une héritabilité plus élevée aux alentours de 0.76 dans le site de Kairouan en mode stressé en 2016 et faible aussi bien pour le nombre de grains par épi NS (0,28) dans le site de Mornag sous les conditions pluviales en 2016, que pour le nombre de grains par épi NGE (0,12) dans le site de Kairouan en mode irrigué en 2017.

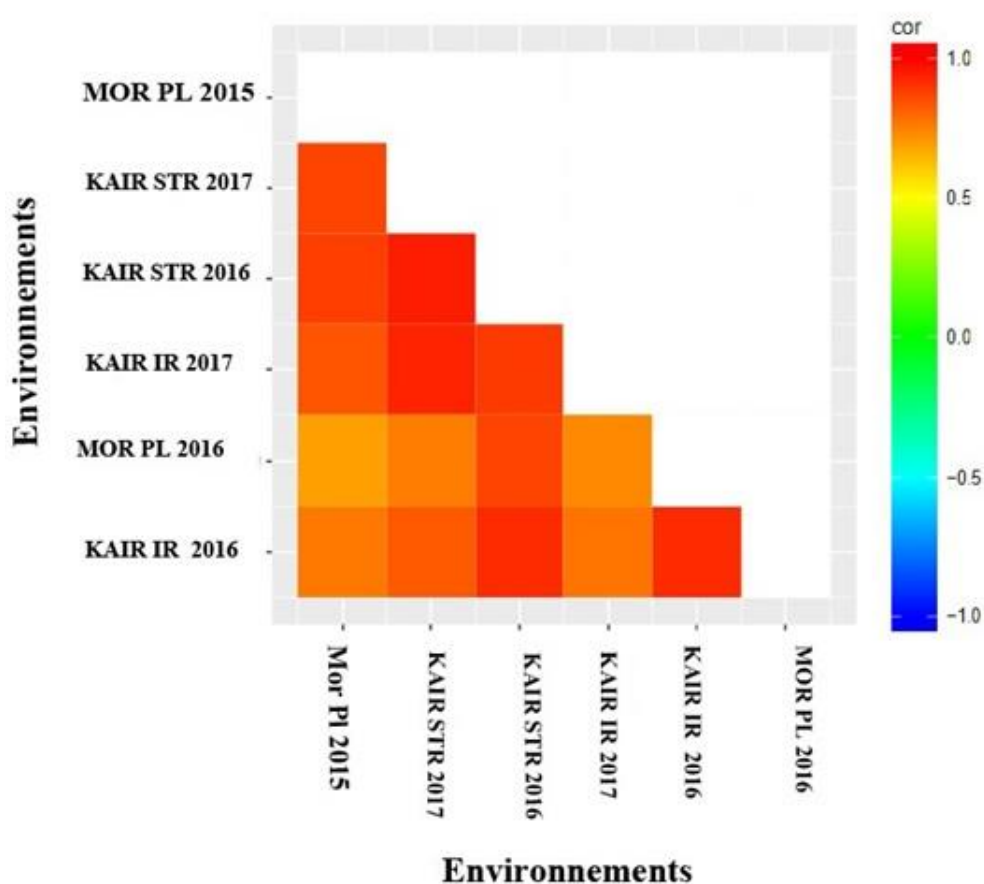
**Tableau 21:** Estimation de l'héritabilité étendue H2 pour l'indice du pigment jaune (valeur du b\*), la teneur total des caroténoïdes (TCC) et d'autres traits agro morphologiques et de qualité.

		<b>Héritabilité H2</b>					
<b>Sites</b>		<b>KAIR IR</b>	<b>KAIR IR</b>	<b>KAIR STR</b>	<b>KAIR STR</b>	<b>MOR PL</b>	<b>MOR PL</b>
<b>Année</b>		2016	2017	2016	2017	2015	2016
<b>Traits</b>							
<b>A</b>	<b>TTC</b>					0.86	0.98
	<b>b*</b>	<b>0.91</b>	<b>0.95</b>	<b>0.91</b>	<b>0.95</b>	<b>0.93</b>	<b>0.72</b>
	<b>a*</b>	<b>0.94</b>	<b>0.96</b>	<b>0.96</b>	<b>0.98</b>	<b>0.96</b>	<b>0.92</b>
	<b>l*</b>	<b>0.90</b>	<b>0.95</b>	<b>0.94</b>	<b>0.96</b>	<b>0.94</b>	<b>0.91</b>
	<b>Gpr</b>	<b>0.86</b>	<b>0.94</b>	<b>0.80</b>	<b>0.96</b>	<b>0.92</b>	<b>0.56</b>
	<b>SDS</b>	<b>0.93</b>	<b>0.97</b>	<b>0.97</b>	<b>0.99</b>	<b>0.95</b>	<b>0.9</b>
	<b>SDS INDEX</b>	<b>0.92</b>	<b>0.97</b>	<b>0.96</b>	<b>0.99</b>	<b>0.94</b>	<b>0.9</b>
<b>B</b>	<b>SL</b>	<b>0.91</b>	<b>0.95</b>	<b>0.95</b>	<b>0.98</b>	<b>0.8</b>	<b>0.88</b>
	<b>ST</b>	<b>0.87</b>	<b>0.87</b>	<b>0.92</b>	<b>0.95</b>	<b>0.83</b>	<b>0.65</b>
	<b>SW</b>	<b>0.91</b>	<b>0.93</b>	<b>0.94</b>	<b>0.97</b>	<b>0.88</b>	<b>0.71</b>
	<b>TA</b>	<b>0.84</b>	<b>0.88</b>	<b>0</b>	<b>0.89</b>	<b>0.85</b>	<b>0.16</b>
	<b>FLA</b>	<b>0.77</b>	<b>0.36</b>	<b>0.62</b>	<b>0.74</b>	<b>0.62</b>	<b>0.87</b>
	<b>H</b>	<b>0.96</b>	<b>0.95</b>	<b>0.86</b>	<b>0.96</b>	<b>0.95</b>	<b>0.95</b>
	<b>MLB</b>	<b>0.68</b>	<b>0.82</b>	<b>0.79</b>	<b>0.83</b>	<b>0.78</b>	<b>0.66</b>
	<b>MLE</b>	<b>0.82</b>	<b>0.80</b>	<b>0.89</b>	<b>0.85</b>	<b>0.82</b>	<b>0.8</b>
<b>C</b>	<b>HD</b>	<b>0.97</b>	<b>0.98</b>	<b>0.94</b>	<b>0.98</b>	<b>0.95</b>	<b>0.94</b>
	<b>MD</b>	<b>0.90</b>	<b>0.80</b>	<b>0.93</b>	<b>0.87</b>	<b>0.96</b>	<b>0.89</b>
	<b>SPAD</b>	<b>0.77</b>	<b>0.62</b>	<b>0.81</b>	<b>0.83</b>	<b>0.71</b>	<b>0.77</b>
<b>D</b>	<b>TT</b>	<b>0.47</b>	<b>0.26</b>	<b>0.6</b>	<b>0.57</b>	<b>0.29</b>	<b>0.47</b>
	<b>TFT</b>	<b>0.52</b>	<b>0.35</b>	<b>0.68</b>	<b>0.09</b>	<b>0.34</b>	<b>0.42</b>
	<b>NS</b>	<b>0.51</b>	<b>0.12</b>	<b>0.45</b>	<b>0.50</b>	<b>0.79</b>	<b>0.69</b>
	<b>NEE</b>	<b>0.69</b>	<b>0.71</b>	<b>0.67</b>	<b>0.65</b>	<b>0.61</b>	<b>0.61</b>
	<b>NGE</b>	<b>0.61</b>	<b>0.56</b>	<b>0.76</b>	<b>0.7</b>	<b>0.68</b>	<b>0.28</b>
	<b>PGE</b>	<b>0.57</b>	<b>0.53</b>	<b>0.74</b>	<b>0.65</b>	<b>0.67</b>	<b>0.3</b>
	<b>GY</b>	<b>0.58</b>	<b>0.56</b>	<b>0.25</b>	<b>0.66</b>	<b>0.69</b>	<b>0.32</b>
	<b>TKW</b>	<b>0.86</b>	<b>0.90</b>	<b>0.93</b>	<b>0.95</b>	<b>0.87</b>	<b>0.64</b>
	<b>TW</b>	<b>0.56</b>	<b>0.77</b>	<b>0.84</b>	<b>0.77</b>	<b>0.6</b>	<b>0.22</b>

A: Traits de qualité du grain; b\*: Indice du jaune; a\*: Indice du brun, l\*: Indice de luminosité; Gpr: Teneur des protéines des grains; SDS: Indice de sédimentation; B: Traits morphologiques; SL: Longueur de la graine; ST: hauteur de la graine, SW: Largeur de la graine; TA: Superficie totale de a graine; FLA: Surface foliaire; H: Hauteur de la plante; MLB: Longueur des barbes; MLE: Longueur de l'épi; C: Traits physiologiques; HD: Date d'épiaison; MD: Date de maturité; SPAD: Indice de chlorophylle; D: Traits agronomiques; KAIR IR 2016: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 100% ETR pendant la campagne 2016; KAIR IR 2017: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 100% ETR pendant la campagne 2017; KAIR STR 2016 Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 25% ETR pendant la campagne 2016, KAIR STR 2017: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 25% ETR pendant la campagne 2017; MOR PL 2015: Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2015; MOR PL 2016 : Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2016.

➤ **Etude de l'interaction entre les différents environnements pour l'indice du pigment jaune (valeur du b\*)**

L'évaluation des interactions génotype\*environnement utilisant la méthode des corrélations entre les six environnements basée sur les moyennes ajustées de l'indice du pigment jaune des 196 lignées dans chaque environnement a montré que les environnements sont corrélés positivement les uns aux autres (Figure 30). Ces résultats montrent qu'il n'y'a pas d'interaction génotype\* environnement pour la caractére étudié et que lignées présentent le même potentiel quelque soit le traitement (mode irrigué ou stressé) et/ou la localité (Mornag ou Kairouan).



**Figure 30:** «Heat map» des corrélations entre les environnements basé sur les moyennes ajustées dans chaque environnement. KAIR IR 2016: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 100% ETR pendant la campagne 2016; KAIR IR 2017: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 100% ETR pendant la campagne 2017; KAIR STR 2016 Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 25% ETR pendant la campagne 2016, KAIR STR 2017: Site Kairouan avec la modalité d'irrigation 25% ETR pendant la campagne 2017; MOR PL 2015: Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2015; MOR PL 2016: Site Mornag en mode pluvial pendant la campagne 2016.

**d. Etude des corrélations entre l'indice du pigment jaune et d'autres traits de qualité, physiologique et agro-morphologique dans les différents environnements**

Les corrélations moyennant le coefficient de Pearson entre l'indice du pigment jaune (valeur du  $b^*$ ) et plusieurs traits de qualité du grain, physiologiques et agro-morphologiques sont rapportées dans la figure 31.

Pour l'environnement 1 (Kairouan en mode irriguée en 2016) une forte corrélation positive hautement significative (seuil de signification  $< 0.01$ ) avec l'indice de vitrosité  $l^*$  (0,45), la largeur de la semence SW (0,36), le SPAD (0,36) et le poids de mille grains TKW (0,31), une corrélation modérée (seuil de signification  $< 0.05$ ) avec le rendement en grain GY (0,27), le rendement quantique Fv/Fm et l'indice de sédimentation SDS (0,21). Par contre une forte corrélation négative hautement significative (seuil de signification  $< 0.01$ ) avec avec l'indice du brun  $a^*$  (-0,65), la longueur de l'épi MLE (-0,51) et la longueur de la barbe MLB (-0,20).

Pour l'environnement 2 (Kairouan en mode irriguée en 2017), une corrélation positive significative (seuil de signification  $< 0.05$ ) est observée uniquement avec l'indice de vitrosité  $l^*$  (0,20) et des corrélations négatives hautement significatives (seuil de signification  $< 0.01$ ) avec l'indice du brun  $a^*$  (-0,57), la longueur de l'épi MNE (-0,31), la longueur de la barbe MLB (-0,34) et le nombre d'épillets/épi NEE (-0,31).

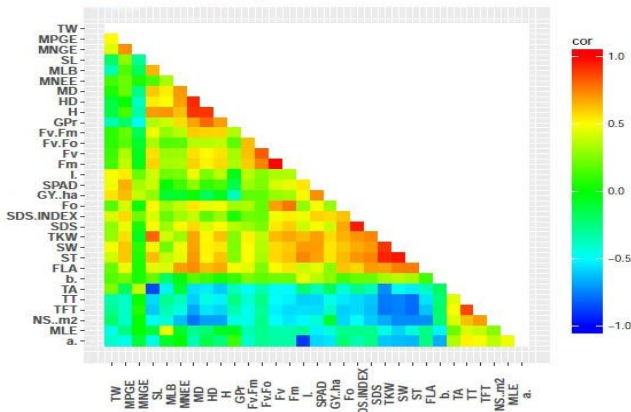
Pour l'environnement 3 (Kairouan en mode stressé en 2016), l'analyse des corrélations a montré que l'indice du pigment jaune (valeur du  $b^*$ ) est fortement corrélé (seuil de signification  $< 0.01$ ) avec le rendement en grains GY (0,24), l'indice de vitrosité  $l^*$  (0,36), le SPAD (0,31), la largeur de la semence SW (0,23) et le poids de milles grains TKW (0,20) mais plutôt une forte corrélation négative significative (seuil de signification  $< 0.01$ ) est observée avec l'indice du brun  $a^*$  (-0,65), la longueur de l'épi MLE (-0,23), la longueur de la barbe MLB (-0,23) et le nombre d'épillets/épi NEE (-0,20). Alors que pour l'environnement 4 (Kairouan en mode stressé en 2017), une forte corrélation positive est observée uniquement pour l'indice du  $l^*$  (-0,24) et une corrélation négative hautement significative avec l'indice du brun  $a^*$  (-0,58), la longueur de l'épi MLE (-0,46) et la longueur de la barbe (-0,32).

Concernant le site de Mornag conduit en mode pluvial, les résultats des corrélations entre l'indice du pigment jaune ( $b^*$ ) et les autres caractères ont montré pour l'environnement 5 (année 2015) une corrélation positive significative (seuil de signification  $< 0.01$ ) avec le rendement en grains GY (0,29) et l'indice de vitrosité  $a^*$  (0,27) ainsi qu'une corrélation négative hautement significative (seuil de signification  $< 0.01$ ) pour l'indice du brun  $a^*$  (-

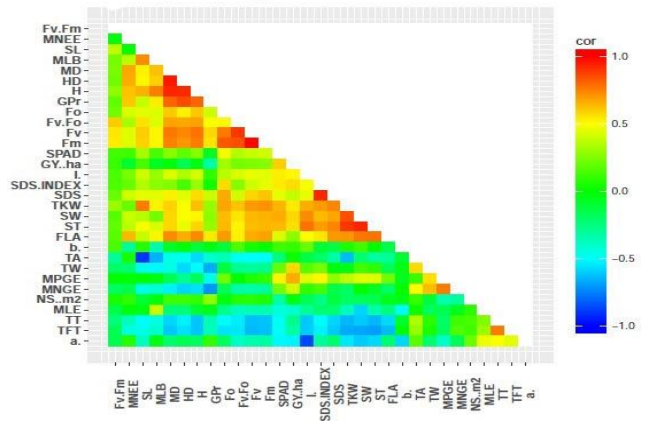


0,65), la longueur de l'épi MLE (-0,50) et la longueur de la barbe (-0,47). D'autres corrélations négatives significatives (seuil de signification < 0.01) sont observées avec le nombre d'épillets / épi (0,38), la hauteur de la plante H (0,36), la teneur en protéine Gpr (-0,26), la date d'épiaison (-0,28) et la surface foliaire FLA (-0,24). Pour l'environnement 6 (année 2016), des corrélations positives hautement significatives (seuil de signification < 0.01) sont observées avec plusieurs caractères tels que l'indice de vitrosité I\* (0,46), le SPAD (0,43), la largeur de la semence SW (0,41), le poids de milles grains TKW (0,36) et le SDS (0,23). Les corrélations négatives hautement significatives (seuil de signification < 0.01) sont observées avec l'indice du brun a\* (-61%), la longueur de la barbe MLB (-0.50) et celles significatives avec la longueur de l'épi MLE (-0,20) et Nombre d'épi / m<sup>2</sup> NS (-0,24).

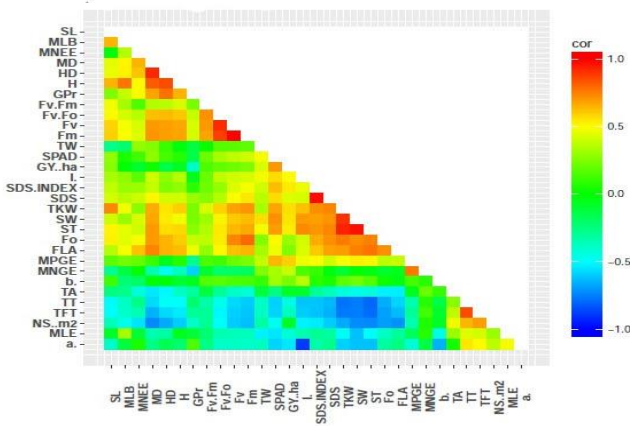
### A: Environnement 1



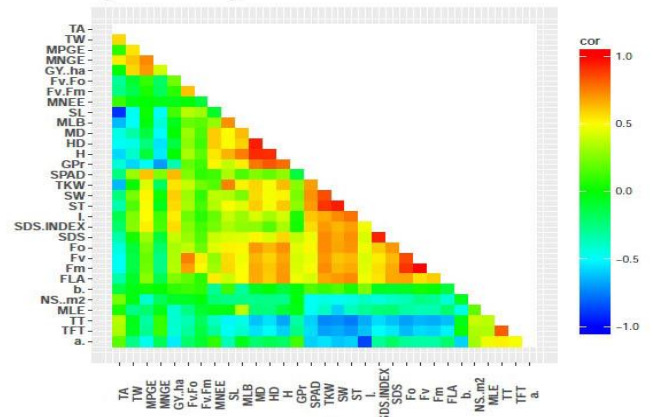
### B: Environnement 2



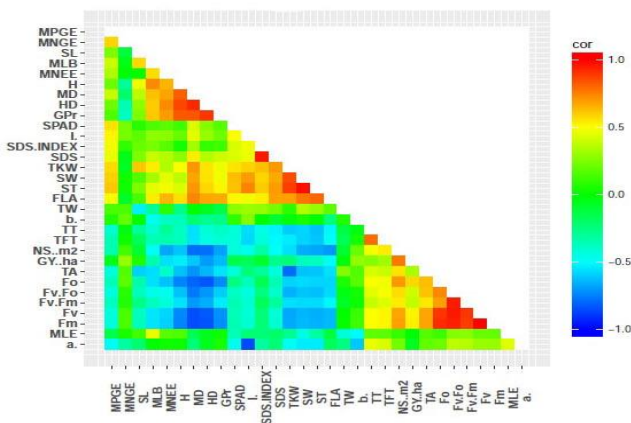
### C: Environnement 3



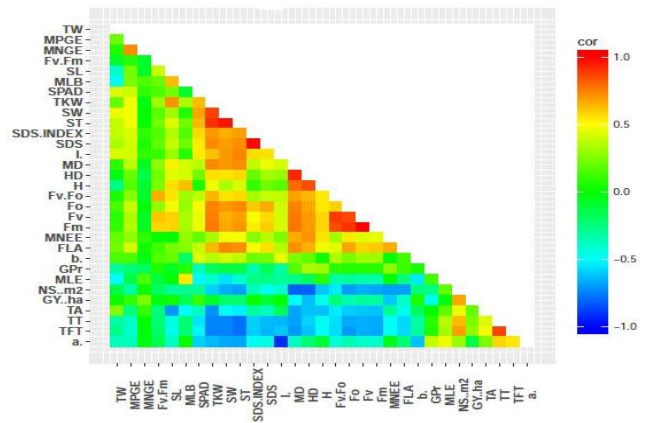
### D: Environnement 4



### E: Environnement 5



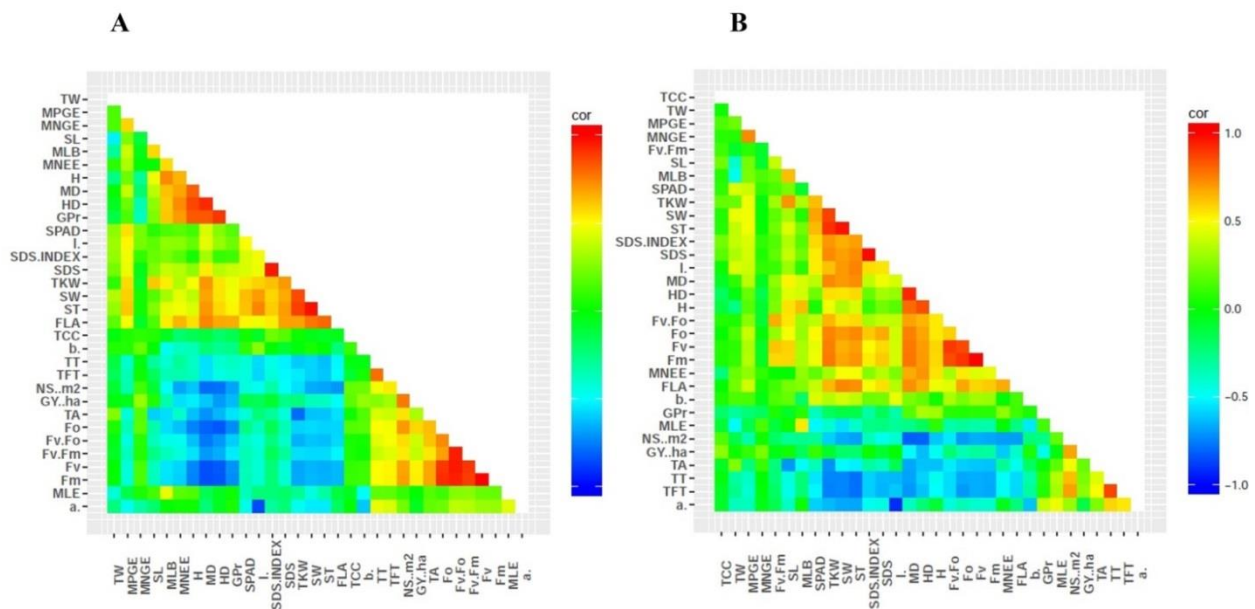
### F: Environnement 6



**Figure 31:** Corrélations entre les différents traits de qualité, physiologiques et agro-morphologiques. Environnement 1: Kairouan en mode irrigué (campagne 2016); Environnement 2: Kairouan en mode irrigué (campagne 2017); Environnement 3: Kairouan en mode stressé (campagne 2016); Environnement 4: Kairouan en mode stressé (campagne 2017), Environnement 5: Mornag en mode pluvial (campagne 2015); Environnement 6: Mornag en mode pluvial (campagne 2016); b\*: Indice du jaune; a\*: Indice du brun, l\*: Indice de luminosité; Gpr: Teneur des protéines des grains; SDS: Indice de sédimentation; SL: Longueur de la graine; ST: hauteur de la graine, SW: Largeur de la graine; TA: Surface totale de a graine; FLA: Surface foliaire; H: Hauteur de la plante; MLB: Longueur des barbes; MLE: Longueur de l'épi; HD: Date d'épiaison; MD: Date de maturité; SPAD: Indice de chlorophylle; TKW : Poids de milles grains; MNGE: Nombre de grains/épi ; MPGE : Poids des grains/épi ; GY : Rendement en grain (Kg/ha)

**e. Etude des corrélations entre la teneur totale en caroténoïdes et d'autres traits de qualité, physiologiques et agro-morphologiques dans les différents environnements**

L'analyse des corrélations entre la teneur totale en caroténoïdes avec les différents caractères étudiées (physiologiques, agro-morphologiques et autres traits de qualité du grain, y compris l'indice du pigment jaune) obtenues dans le site de Mornag en mode pluvial durant les deux campagnes 2015 et 2016 ont montré d'une part que l'indice du pigment jaune (valeur du b\*) n'est pas corrélé avec la teneur totale en caroténoïdes exprimée en  $\mu\text{g}$  de lutéine par gramme de matière sèche (Figure 32). D'autres part, ces résultats ont montré des corrélations positives significatives ( $\alpha <$  au seuil de signficance 0.05) avec le rendement en grains GY, le nombre d'épis/m<sup>2</sup> NS et l'indice de sédimentation SDS ainsi que des corrélations négatives significatives ( $\alpha <$  au seuil de signficance 0.05) avec la date d'épiaison HD, la hauteur de la plante H et nombre d'épillets / épi NEE. Toutefois, les corrélations entre la teneur totale en caroténoïdes (TCC) et la teneur en protéine (Gpr) différent d'une année à une autre dans le site de Mornag. En effet, une corrélation négative est observée durant la campagne 2015, par contre elle est positive durant la campagne 2016. De plus, au cours la campagne 2016 nous avons trouvé des corrélations positives significatives entre la teneur totale en caroténoïdes et le poids de mille grains TKW ainsi que la longueur de la graine SL.



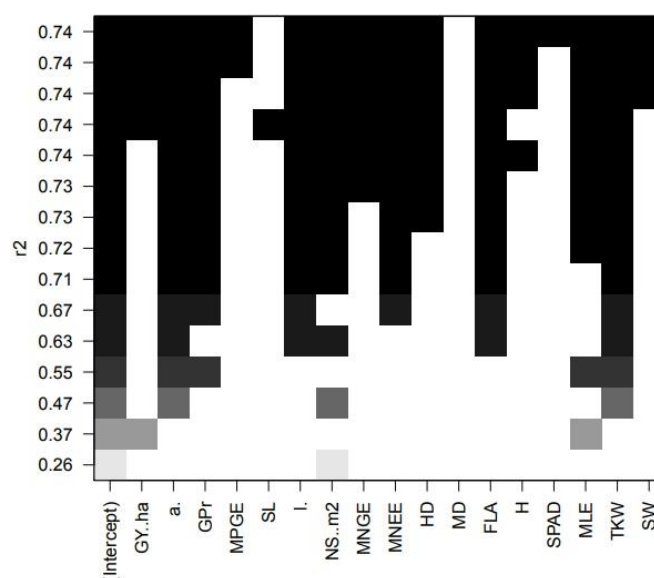
**Figure 32:** Corrélations entre la teneur totale des caroténoïdes, les traits physiologiques, agro-morphologiques et les différents traits de qualité du grain. A: Mornag en mode pluvial (campagne 2015);B: Mornag en mode pluvial (campagne 2016); TCC: Teneur totale en caroténoïdes; b\*: Indice du jaune; a\*: Indice du brun, l\*: Indice de luminosité; Gpr: Teneur des protéines des grains; SDS: Indice de sédimentation; SL: Longueur de la graine; ST: hauteur de la graine; SW: Largeur de la graine; TA: Superficie totale de a graine; FLA: Surface foliaire; H: Hauteur de la plante; MLB: Longueur des barbes; MLE: Longueur de l'épi; HD: Date d'épiaison; MD: Date de maturité; SPAD: Indice de chlorophylle; TKW: Poids de milles grains ; MNGE: Nombre de grains/épi ; MPGE: Poids des grains/épi; GY: Rendement en grain (Kg/ha).

## f. Détermination des facteurs affectant l'indice du jaune (valeur du b\*) et la teneur totale en caroténoïdes (TCC)

Afin d'établir les facteurs qui affectent l'augmentation de la teneur en caroténoïdes, nous avons utilisé deux méthodes:

### ➤ Méthode d'analyse de la régression pas à pas

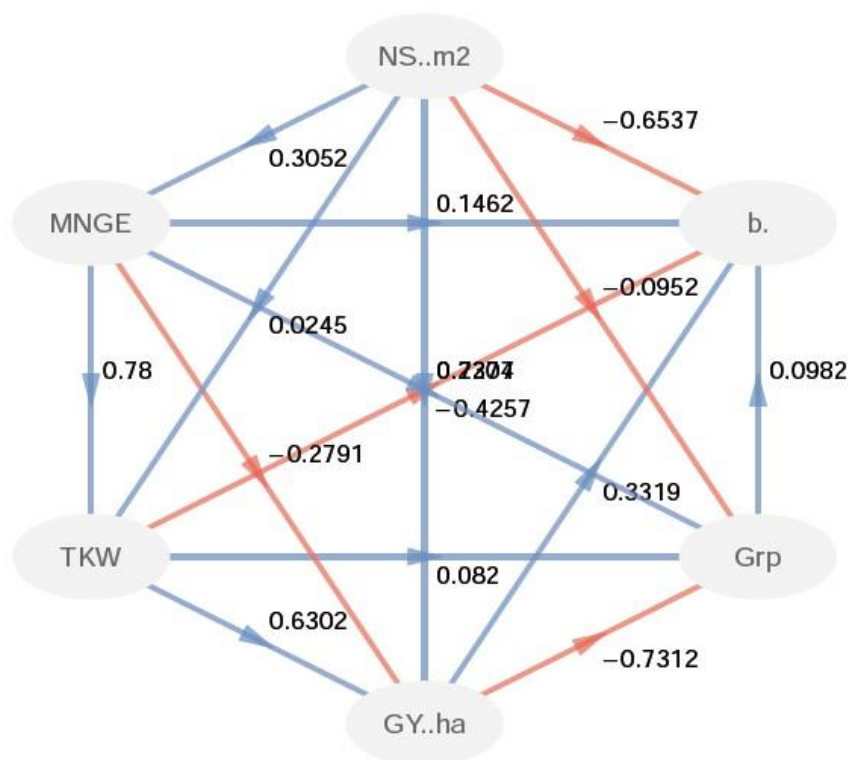
Pour l'analyse de régression pas à pas ou «stepwise regression», nous avons utilisé un modèle qui se base sur les moyennes de 15 caractères à partir des six environnements. Les résultats ont montré que 11 traits: l'indice du brun (a\*), la teneur en protéine (Gpr), l'indice de vitrosité (l\*), le nombre d'épis / m<sup>2</sup> (NS), le nombre de grains / épi (NGE), le nombre d'épillets / épi (NEE), la date d'épiaison (HD), la surface foliaire (FLA), La longueur de l'épi (MLE) et le poids de milles grains (TKW ) sont capables d'expliquer 74% la variation de l'indice du pigment jaune ( $R^2=0.74$ , seuil de signification  $<0.01$ ) (Figure 33). En effet, le nombre d'épis / m<sup>2</sup> (NS) contribue à lui seul à 26.1% de la variation de l'indice du pigment jaune. Le rendement en grains (GY) ainsi que la longueur de l'épi (MLE) améliorent la variation de ce caractère à un second niveau de 10 %. De plus, le poids de mille grains (TKW) avec l'indice du brun (valeur du a\*) contribuent à un troisième niveau encore de 10% pour expliquer 47% la variation de ce caractère. La figure 36 illustre bien que les composantes du rendement contribuent majoritairement dans la variation de l'indice du pigment jaune.



**Figure 33:** Graphique de la régression pas à pas des différents traits contribuant à augmenter l'indice du pigment jaune (b\*) chez les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes.

➤ **Méthode d'analyse «path».**

L'analyse de trajectoire «Path coefficient analysis» a été utilisée pour subdiviser les coefficients de corrélations en effets directs et indirects via des caractères ou des voies de substitution des caractères entre l'indice du jaune (valeur du  $b^*$ ) considéré comme une variable dépendante et les autres variables indépendantes essentiellement les composantes du rendement: le nombre de grains /  $m^2$  (NS); le nombre de grains / épi (NGE); le poids de mille grains (TKW); et le rendement en grains (GY), ainsi qu'un trait de qualité du grain tel que la teneur en protéines des grains (Gpr). Les résultats du diagramme «path» ont montré que le rendement en grains (GY) exerce un effet positif et direct sur l'indice du pigment jaune ( $R^2 = 0.3319$ ; au seuil de signification 5%), alors que le nombre d'épi /  $m^2$  (NS) et le poids de mille grains (TKW) ont un effet direct et négatif ( $R^2 = -0.6535, -0.4257$ , respectivement) (Figure 34). L'effet indirect le plus important sur l'indice du pigment jaune (valeur du  $b^*$ ) a été observé avec le nombre de grains/épi NGE (0.4514). Cependant, La teneur en protéines des grains (Gpr) a montré un effet non significatif sur le caractère étudié.



**Figure 34:** Diagramme «path» des différentes inter-relations des composantes du rendement avec l'indice du pigment jaune (b). les flèches rouges indiquent les effets directs et les flèches bleues indiquent les effets indirects.

#### 4. Discussion et conclusion

Cette étude nous a permis de démontrer que les 196 lignées issues des populations locales de blé dur tunisien présentent une grande variabilité aussi bien de l'indice du pigment jaune (valeur  $b^*$ ) que de la teneur totale en caroténoïdes (TCC). Plusieurs travaux ont mentionnés que les populations locales de blé dur sont caractérisées par une richesse allélique (Lopes et al., 2015) et une variabilité génétique importante pour la majorité des caractères de qualité du grain (Moragues et al., 2006; Nazco et al., 2012), mais rares sont ceux qui ont évalué les caroténoïdes chez les populations locales (Fayaz et al., 2013; Roselló et al., 2018).

L'évaluation de ces lignées dans différents environnements a pu nous montrer que les conditions pluviales au site de Mornag offrent les meilleures opportunités pour la production de blé dur de bonne qualité particulièrement en favorisant une semoule avec une bonne couleur jaune ayant un indice de pigment jaune élevé. Ces résultats sont en accord avec ceux de Rharrabti et al., (2003) qui ont trouvé un indice du jaune de la semoule plus élevé chez les 10 génotypes évalués au Sud de l'Espagne en conditions pluviales comparativement à d'autres essais à l'Est et à l'Ouest de l'Espagne conduits en irrigué (Rharrabti et al., 2003).

En comparant les moyennes des indices du pigment jaune de la semoule (valeur  $b^*$ ) entre les traitements en mode irrigué (100 % ETR) et en mode stressé (25% ETR) à la station de Chebika à Kairouan, une légère augmentation de l'indice du  $b^*$  de l'ordre de 4% pour la campagne de 2016 et de 0.5% pour la campagne de 2017 en mode irrigué, pouvant supporter les résultats d'autres études rapportant que l'indice du pigment jaune augmente en mode irrigué (Güler, 2003). A l'opposé, d'autres travaux décrivent une augmentation de cet indice suite à un stress hydrique (Pena et Pfeiffer 2005; Guttieri, et al. 2001). Récemment, il a été prouvé que le stress hydrique n'a aucun effet sur l'indice du pigment jaune de la semoule (Guzmán et al., 2016), par contre un stress thermique au cours du cycle de développement affecte plus l'indice du pigment jaune (Guzmán et al., 2016; Li et al., 2013) en accélérant la phase de remplissage engendrant une augmentation de cet indice. En effet, au cours de la campagne 2016, nous avons noté une augmentation de la température maximale à partir du mois de Février, engendrant une précocité à l'épiaison et une accélération du remplissage du grain, ce qui explique cette légère augmentation de cet indice comparativement à la campagne 2017. Dans ce sens, des études avaient expliquées que l'augmentation des températures précédant la phase de développement du grain ont un impact sur le grain et sa composition (Wardlaw et Moncur, 1995) en diminuant la taille des grains et leurs poids (Calderini et al.,

1999), ce qui induit un effet de concentration des pigments jaunes dans l'endosperme (Clarke et al., 2006).

Plusieurs travaux effectués dans le cadre de l'évaluation de l'indice du jaune (valeur du  $b^*$ ) et d'autres traits de qualité du grain chez les populations locales étrangères et modernes de blé dur ont montré que les variétés modernes présentent un indice du jaune supérieur à ceux des variétés anciennes (Fayaz et al., 2013), alors que d'autres au contraire démontrent que les populations locales ont plutôt des indices supérieurs (Amallah et al., 2014). Dans ce travail, nous avons trouvé les deux cas. En effet toutes les populations locales Tunisiennes possèdent un indice du jaune inférieur à ceux des lignées élites ICARDA/CIMMYT (15.47) et aux variétés améliorées Tunisiennes (15.3) à l'exception de la population Rommani (15.41). Il est intéressant de mentionner que certaines lignées des populations Biskri (16.46), Jenah Zarzoura (15.92), Rommani (15.92), Bidi (15.59) et Jenah Khotifa (15.84) ont présenté des indices de jaune supérieurs à celui de la variété améliorée Tunisienne ayant l'indice le plus élevé (15.47). Roselló et al., (2018) avait comparé l'indice du pigment jaune entre 165 populations locales de différentes origines méditerranéennes et 20 cultivars modernes espagnoles et avait trouvé que les populations locales originaires de l'Est de la méditerranée avaient l'indice le plus élevée (16.2) qui était supérieur aussi bien à celui des populations de la méditerranée de l'Ouest (14.5) dont la Tunisie fait partie, que celui des cultivars modernes (15.7). Toutefois, nos résultats ont montré que les populations locales Tunisiennes utilisées dans cette étude possèdent des indices supérieurs que ceux rapportés par Roselló et al., (2018).

En effet, chez le blé dur l'indice du jaune (valeur du  $b^*$ ) a été démontré dans plusieurs études hautement corrélé avec la teneur en pigments jaunes du grain (TCC) exprimé en  $\mu\text{g}$  de B carotène par g de matière sèche (Blanco et al., 2011) et cette méthode est largement utilisée comme un moyen d'estimation rapide de la teneur totale en caroténoïdes.

Par ailleurs, la teneur totale en caroténoïdes (TCC) ou encore appelé teneur en pigment jaune a été évaluée chez la même collection à Mornag sous des conditions pluviales. Etant donné la lutéine est le principal caroténoïde dans le grain de blé dur (Hentschel et al., 2002) qui confère une couleur jaune naturelle à l'endosperme et aux produits dérivés de la farine. Nous avons utilisé une nouvelle méthode de détermination de la teneur totale des caroténoïdes AACC 14-60-01 (Abdel-Aal et Rabalski, 2012) légèrement modifiée, qui se base sur une courbe d'étalonnage utilisant une solution de lutéine pure au lieu de la méthode AACC 14-50-01 utilisant plutôt la B carotène. Les résultats d'évaluation ont montré une moyenne de la teneur totale en caroténoïdes exprimée en  $\mu\text{g}$  de lutéine par g de matière sèche

de l'ordre de 4.71  $\mu\text{g/g}$  pendant la campagne 2015 et de l'ordre de 4.33  $\mu\text{g/g}$  pendant la campagne 2016. Cependant, malgré que toutes les populations locales aient enregistré des teneurs totales en caroténoïdes inférieures aux lignées élites ICARDA/CIMMYT témoins (7.30  $\mu\text{g/g}$ ), les populations Biskri (5.39  $\mu\text{g/g}$ ) et Jenah Khotifa (4.84  $\mu\text{g/g}$ ) ont présenté des teneurs totales en caroténoïdes supérieures aux variétés améliorées Tunisiennes (4.74  $\mu\text{g/g}$ ). De plus certaines lignées de Jenah Khotifa ont même présenté des teneurs en pigments jaunes plus élevées (8.36  $\mu\text{g/g}$ ) que la lignée élite ICARDA/CIMMYT ayant la plus forte teneur (8.24 $\mu\text{g/g}$ ).

Du fait que les variétés améliorées Tunisiennes présentent une teneur totale en caroténoïdes faibles (4,74  $\mu\text{g/g}$ ) alors que certaines lignées des populations locales telles que Biskri, Mahmoudi et Jenah Khotifa possèdent des teneurs très élevées qui dépassent 7  $\mu\text{g/g}$  sur la base des teneurs déjà décrites chez le blé dur qui se situe entre 4 et 8  $\mu\text{g/g}$  (Troccoli et al, 2000; Amallah et al., 2014) , il est recommandé d'utiliser ces lignées comme sources de gènes pour augmenter la teneur en caroténoïdes.

La teneur en pigments jaunes est un trait quantitatif complexe, dont l'interaction génotype\*environnement n'a pas été encore élucidé dans les conditions environnementales Tunisiennes. Cependant, l'héritabilité étendue  $H^2$  de l'indice du pigment jaune mesurée dans les six environnements chez les 196 lignées issues des populations locales Tunisiennes est très élevée, variant de 0,72 à 0,95. Cette forte héritabilité traduit la prédominance de l'effet génotype qui a été déjà reportée dans plusieurs études telles que les travaux d'Elouafi et al., (2001) montrant une héritabilité de ce caractère entre 0,48 et 0,99 à travers 16 environnements et ceux de Clarke et al (2006) trouvant une héritabilité entre 0,88 et 0,95 à travers plusieurs sites et plusieurs années. L'estimation de l'héritabilité étendue  $H^2$  de la teneur totale en caroténoïdes dans le site de Mornag sous des conditions pluviales chez la même collection a également montré une héritabilité très élevée variant de 0,85 à 0,95, ces résultats sont également consistants avec d'autres études (Santra, et al. 2005; Colasuonno, et al. 2017).

La méthode des corrélations entre les six environnements pour évaluer l'interaction entre les génotypes et les environnements sur la base des moyennes ajustées de l'indice du pigment jaune des 196 lignées issues des six populations locales de blé dur dans chaque environnement a montré une corrélation entre les environnements les uns aux autres, ce qui en découle l'absence d'interaction génotype\*environnement pour ce caractère. Ces observations sont consistantes avec des études précédentes mentionnant une très faible interaction



génotype\*environnement aussi bien pour la couleur de la semoule que de la teneur en pigment jaune (Elouafi, et al. 2001; Clarke, et al. 2006) et contredisent les résultats d'autres travaux qui ont trouvé une interaction génotype\* environnement pour l'indice du jaune et la teneur en pigments jaunes (Roncallo et al., 2012). Toutefois, nous avons noté un faible effet année pour le site de Mornag en mode pluvial, ce qui rejoint l'étude de Rharrabti et al., (2003) qui avait décrit un effet année \*site minime dans une localité au sud de l'Espagne conduite sous des conditions pluviales. L'étude de l'interaction génotype\* environnement dans cette étude montre que les populations locales Tunisiennes sont bien adaptées aux conditions environnementales et présentent le même potentiel quel que soit l'environnement.

L'analyse des corrélations moyennant le coefficient de corrélation de Pearson entre l'indice du jaune et les différents caractères physiologiques, agro- morphologiques et de qualité du grain dans les six environnements séparément pour déterminer les associations possibles, a montré que quel que soit l'environnement, l'indice du jaune est corrélé positivement avec l'indice de vitrosité (valeur du l\*) (Lukow et al., 2013). Il est corrélé négativement aussi bien avec l'indice du brun (valeur du a\*) comme il a été décrit par Roncallo et al., (2012), qu'avec la longueur de l'épi MLE et la longueur de la barbe MLB. Par contre, pour l'année 2016 aussi bien au site de Mornag conduit en pluvial que le site de Kairouan conduit à 100% ETR et à 25% ETR, des corrélations positives sont notées entre l'indice du pigment jaune avec le poids de milles grains TKW, la largeur de la semence SW et l'indice de la chlorophylle SPAD. En effet, l'année 2016 était une année de sécheresse dont la pluviométrie à Mornag était de 250 mm/an au lieu de la moyenne annuelle de 450 mm/an et celle de Kairouan était de 223 mm/an au lieu de 300 mm/an. Ces conditions de sécheresse ont probablement engendré l'augmentation de la teneur en chlorophylle et la stimulation du processus de la photosynthèse impliquant les caroténoïdes en tant que pigments accessoires pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui pouvaient causer des dommages oxydatifs irréversibles (Havaux, 2014) et par conséquent l'augmentation de la teneur en pigment jaune dans les grains. Par contre, les corrélations positives obtenues avec poids de mille grains (TKW) et de la largeur de la semence (SW) sont en contradiction avec d'autres études de Roncallo et al., (2012).

L'analyse des corrélations entre la teneur en pigments jaunes et d'autres caractères agromorphologiques et de qualité dans deux environnements a montré une corrélation positive avec le rendement en grains et une corrélation négative avec la hauteur de la plante et la date d'épiaison. Par contre, aucune corrélation n'a été observée entre l'indice du jaune et la teneur

totale en caroténoïdes qui a été exprimée dans notre étude en  $\mu\text{g}$  de lutéine / g de matière sèche. Pourtant, plusieurs autres études ont rapportées des corrélations positives hautement significatives entre l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes exprimé plutôt en  $\mu\text{g}$  de B carotène / g de matière sèche (Blanco et al., 2011). Hentschel et al., (2002) ont signalé la contribution de 70% de substances inconnues dans la couleur jaune de la semoule. Digesù et al., (2009) ont montré que la proportion de caroténoïdes représentant les pigments jaunes était de 33,2%, en comparant la teneur totale en caroténoïde et la teneur en pigment jaune chez une collection de 80 blés tétraploïdes cultivés et sauvages. Egalement, Blanco et al., (2011) ont rapporté que la teneur totale en caroténoïdes représentait 37% des pigments jaunes. De plus, Abdel et al., (2007) ont signalé une surestimation de 20% de la teneur des caroténoïdes utilisant la méthode colorimétrique en comparaison avec l'HPLC. Cependant, récemment Abdel et Rabalski, (2012) a pu développer et valider une micro méthode d'extraction des caroténoïdes totaux avec l'eau saturée en n butanol pour estimer la teneur en lutéine ou la teneur totale en caroténoïdes chez le blé dur. Cette micro méthode a montré une corrélation positive significative avec la méthode HPLC ( $r = 0.9442$ ). De ce fait, cette micro méthode a été utilisée dans le cadre de ce travail pour évaluer la teneur totale des caroténoïdes.

L'utilisation de la méthode de régression pas à pas «stepwise regression» nous a permis d'identifier 11 caractères pouvant expliquer 74% de la variation de l'indice du pigment jaune (valeur du  $b^*$ ). Parmi ces caractères, les composantes du rendement contribuent majoritairement et plus particulièrement le nombre d'épis /  $\text{m}^2$  (NS), qui explique à lui seul 26.1% la variation de l'indice du jaune.

A travers l'utilisation de la méthode d'analyse «path» nous avons identifié l'effet direct et positif du rendement en grains ( $R^2 = 0.3319$ ), l'effet direct et négatif du nombre d'épis /  $\text{m}^2$  ( $R^2 = -0.6535$ ), et du poids de mille grains TKW ( $R^2 = -0.4257$ ) et l'effet indirect et positif du nombre de grains / épis NGE ( $R^2 = 0.4514$ ).

Ces résultats ont montré que la méthode de régression et d'analyse «path» sont complémentaires et sont plus pertinentes que l'analyse des corrélations utilisant le coefficient de Pearson. D'autre part, ces deux méthodes ont montré leur efficacité dans d'autres études similaires expliquant la contribution et les effets directes et indirectes sur rendement en grains (Sayar et al., 2007). L'effet direct négatif du poids de mille grains a été déjà décrit par certaines études qui a été expliqué par l'effet de concentration des teneurs en pigments jaunes dans les grains (Abderrahmane et al., 2013).

### **III. Association pan génomique pour la teneur en pigments jaunes**

#### **1. Résumé**

#### **2. Introduction**

La couleur jaune de la semoule due à la concentration en pigments jaunes dans le grain est un trait quantitatif complexe contrôlé par plusieurs gènes. De 2013 à 2016 Roselló et al., (2018) ont rapporté l'identification de 37 QTL pour l'indice du pigment jaune de la semoule et 74 QTL pour la teneur en pigments jaunes. Ces QTL ont été obtenus moyennant la cartographie de liaison biparentale traditionnelle «QTL mapping» (Patil, et al. 2008; Zhang, et al. 2008; Blanco, et al. 2011; Roncallo, et al. 2012; Crawford and Francki 2013a; Colasuonno, et al. 2014) et ils sont localisés sur tous les chromosomes aussi bien du blé dur que du blé tendre.

Toutefois, la majorité des QTL décrits dans la littérature n'ont pas été utilisés dans les programmes de sélection, à l'exception de 2 QTL majeurs PSY-A1 et PSY-B1 localisés dans les régions distales des chromosomes 7A et 7B, respectivement, dont il a été démontré qu'ils sont responsables de la plus importante variabilité de la teneur en pigment jaune dans le grain (Campos et al., 2016; Patil et al., 2018).

Selon Flint-Garcia et al., (2003) et Breseghello et Sorrells, (2006), la cartographie d'association basée sur le déséquilibre de liaison pour identifier les associations génotype-phénotype présente plusieurs avantages par rapport à la cartographie de liaison biparentale traditionnelle, qu'elle tient compte de tous les événements de recombinaison le long de l'histoire évolutive d'une population. Elle détecte des loci avec plus de précision et elle ne nécessite pas de développer des populations biparentales. Les premières études de cartographie d'association pour identifier des QTL associés à la teneur en pigment jaune ont utilisé un nombre limité de marqueurs SSR ainsi qu'une population de type RILS (Reimer et al., 2008). Récemment, le développement de plateformes de génotypage à très haut débit couvrant le génome entier a permis d'affiner les études de cartographie d'association ou pan génomique (GWAS) pour identifier de nouvelles régions génomiques et disséquer la base génétique d'importants traits complexes tels que le rendement en grains et ses composantes (Sukumaran et al., 2018a), la tolérance à la sécheresse et à la température (Qaseem et al., 2018), la qualité du grain et de la semoule (Fiedler et al., 2017; Bhatta et al., 2018) et la teneur en pigment jaune dans le grain et la semoule (Kumaret al., 2018; N'Diaye et al., 2018). Les études récentes de GWAS visant à identifier des QTL associés à la teneur en pigments jaunes dans le grain et à la couleur de la semoule du blé dur ont plutôt utilisé des lignées issues des

programmes d'amélioration (N'Diaye et al., 2017; N'Diaye et al., 2018). Malgré que les populations locales de blé dur ont montré une grande richesse allélique très peu d'étude de GWAS ont utilisé des populations locales pour identifier des QTL associés à ce caractère (Lopes et al., 2015; Roselló et al., 2018). De plus, la technologie DArTseq bien qu'elle a montré sa performance dans des études de diversité et de structure de population chez les populations locales blé dur (Robbana et al., 2019) ainsi que dans des études de GWAS pour des caractères complexes, cette technologie n'a pas été encore utilisée pour détecter des QTL associés à la teneur en pigments jaunes chez le blé dur.

Dans ce contexte, cette étude vise à identifier des QTL stables associés à l'indice du jaune et à la teneur en pigments jaunes sur la base du génotypage DArTseq

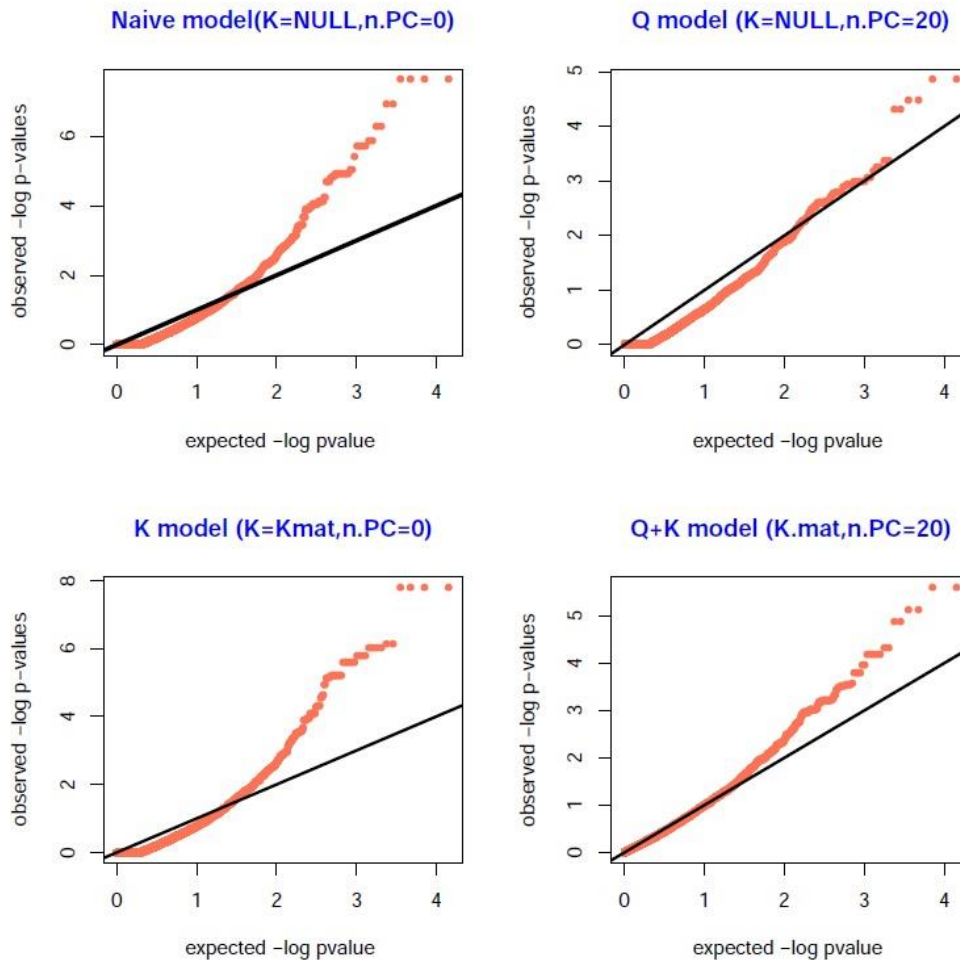
### **3. Résultats**

#### **a. Choix du model statistique pour l'étude pan-génomique pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes**

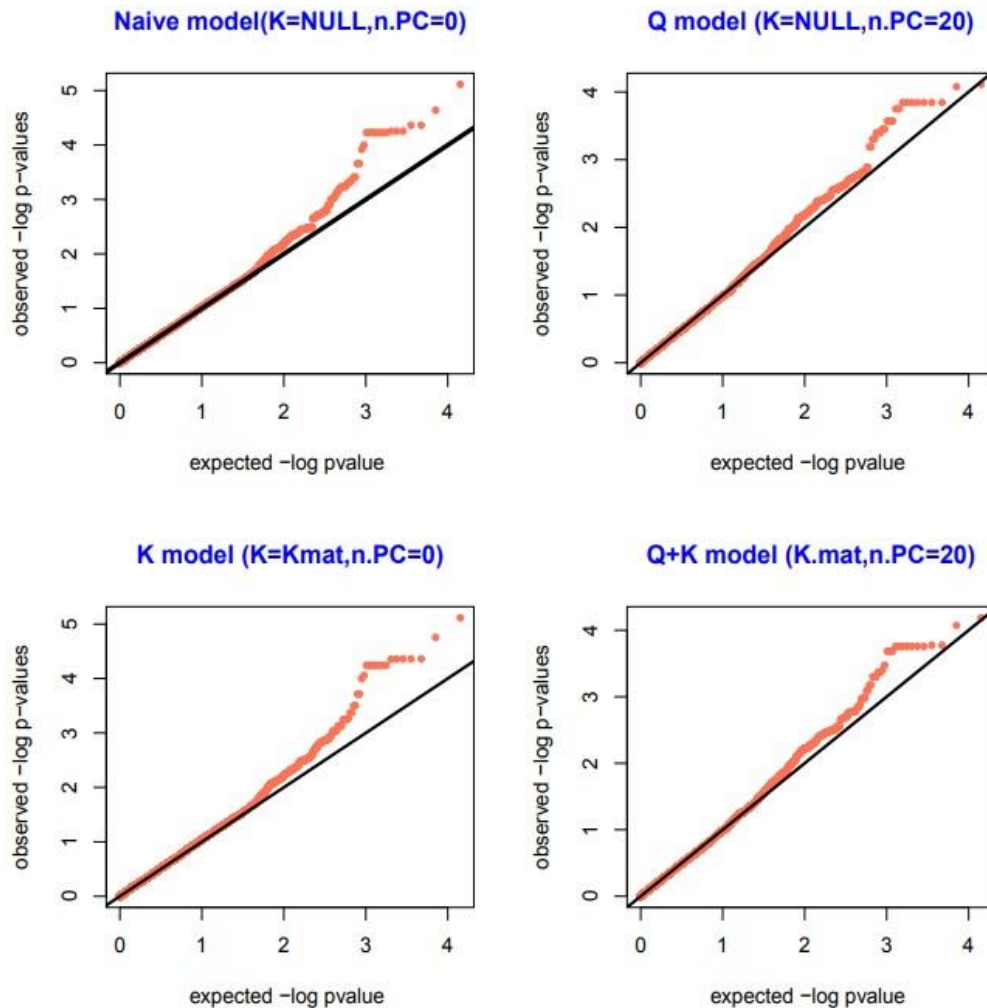
L'analyse des associations entre les marqueurs DArTseq et d'une part l'indice du jaune et d'autre part la teneur totale en caroténoïdes chez la collection de 196 lignées a été établie avec quatre modèles statistiques: 1) le modèle linéaire naïve; 2) le modèle linéaire mixte K, en tenant compte de la parenté relative entre les lignées (K); 3) le modèle linéaire mixte Q, en considérant la structure de la population (Q) qui a été déterminée avec 20 composantes principales (PC); et le modèle linéaire mixte K + Q, en tenant compte des effets de confusion de la structure de la population (Q) et de la parenté relative (K).

Les résultats ont montré sur la base des graphiques quantile-quantile ou «Q-Q plot» élaborés avec les probabilités d'obtenir des associations observées (-Log<sub>10</sub> (valeurs de p)) en fonction de celles attendues pour l'indice du jaune (figure 35) et la teneur en caroténoïdes totales (figure 36), que parmi les quatre modèles testés, le modèle MLM (Q + K) incorporant la matrice K et les PC en nombre de 20 est le plus approprié. Ce modèle a montré que les valeurs de p observées étaient plus proches de la distribution attendue et de ce fait, a permis de fournir une plus grande confiance pour minimiser l'occurrence de fausses associations positives et identifier des associations significatives entre les traits étudiés et les marqueurs (MTA). Ce modèle a été utilisé dans notre étude de GWAS pour la détection des QTL associés à l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes.

De plus, les figures 35 et 36 ont montré plus de QTL détectés pour l'indice du pigment jaune que pour la teneur totale des caroténoïdes.



**Figure 35:** Comparaison des diagrammes quantile-quantile des  $-\log$  (valeurs de p) entre différents modèles de GWAS pour l'indice du jaune (moyenne de six environnements) chez une collection de 196 lignées; Modèle naïve (K = nul, n.PC = 0); Modèle Q (K = nul, n.PC = 20); Modèle K (K = K.mat, n.PC=0); Q + K model (K.mat, n. PC =20); K mat: «Kinship matrix» = Matrice de parenté relative entre les lignées; Q: Structure de la population des 196 lignées avec 20 PC; PC: Composantes principales; n: Nombre.



**Figure 36:** Comparaison des graphiques quantile-quantile «Q-Q plot» des  $-\log$  (valeurs de  $p$ ) entre différents modèles de GWAS pour la teneur totale en caroténoïdes (moyenne de deux environnements) chez une collection de 196 lignées; Modèle naïve ( $K = \text{nul}$ ,  $n.PC = 0$ ); Modèle Q ( $K = \text{nul}$ ,  $n.PC = 20$ ); Modèle K ( $K = K.mat$ ,  $n.PC=0$ ); Q + K model ( $K.mat$ ,  $n. PC = 20$ ); K mat: «Kinship matrix» = Matrice de parenté relative entre les lignées; Q: Structure de la population des 196 lignées avec 20 PC; PC: Composantes principales; n: Nombre.

**b. Méthode de visualisation des QTL détectés pour l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes**

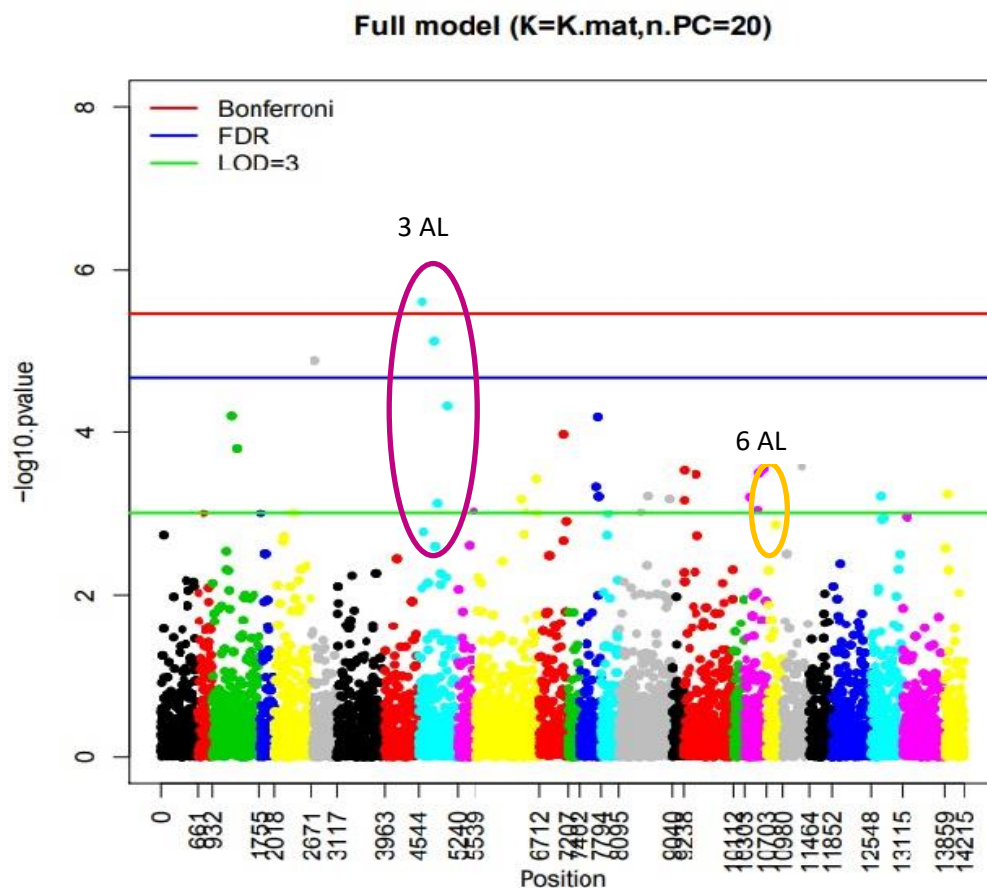
Pour la détection des QTL associés significativement avec l'indice du jaune et avec la teneur totale en caroténoïdes, nous avons testé deux approches pour ajuster le seuil des associations significatives: le taux des fausses découvertes (FDR) «False discovery rate» (Benjamini et Hochberg, 1995) et les corrections de Bonferroni.

➤ **Détection des QTL associés à l'indice du jaune**

Dans la figure 38, le diagramme de Manhattan a montré un QTL significativement associé à l'indice du jaune sur le chromosome 3 AL avec un LOD de 5.59 en se basant sur le

seuil de significativité de Bonferroni (figure 37). Dans le même diagramme, trois QTL ont été détectés en utilisant le seuil FDR dont deux QTL sont localisés sur le chromosome 3 AL ayant un LOD de 5.59 et de 5.12 et un autre QTL sur le chromosome 2 AS avec un LOD de 4.88.

En tenant compte des MTA significatifs pour l'indice du jaune illustrés dans le diagramme Q-Q «Q-Q plot» (figure 35), nous avons utilisé un seuil de  $-\log_{10}(p)$  ou  $\text{LOD} > 3$  pour déclarer des QTL significativement associés à l'indice du jaune. Sur la base du diagramme Manhattan 29 QTL ont été identifiés. Ces QTL sont distribués sur tous les chromosomes des génomes A et B (figure 37). Le plus grand nombre de QTL ont été signalés sur les chromosomes 3 AL et 6 AL.

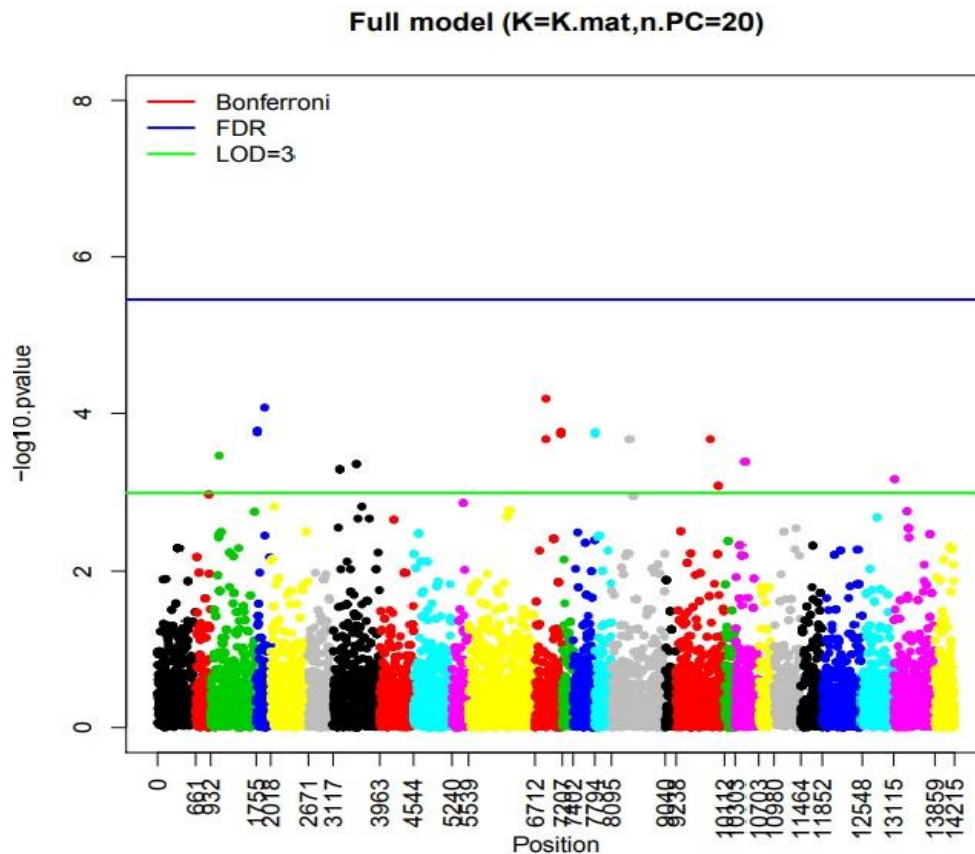


**Figure 37:** Diagramme de Manhattan ou «Manhattan plot» montrant les valeurs de p pour les marqueurs DArTseq associés à l'indice du jaune; Axe des x correspond aux nombres des marqueurs DArTseq; Axe des y correspond au LOD ou  $-\log_{10}$  (valeurs de p); FDR: Taux des fausses découvertes «False discovery rate»; LOD: Logarithme des odds.

➤ **Détection des QTL associés à la teneur totale en caroténoïdes**

Le diagramme de Manhattan (figure 38) n'a montré aucun QTL significativement associé à la teneur en caroténoïdes en testant aussi bien les corrections Bonferroni que le

FDR. Toutefois, avec l'utilisation du seuil de significativité  $LOD > 3$ , quatorze QTL ont été identifiés sur les chromosomes 1B, 2B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A et 7B. Les QTL détectés sur les chromosomes 1 BS et 4 AL ont présenté des scores LOD plus élevés de 4.04 à 4.19, respectivement.



**Figure 38:** Diagramme de Manhattan ou «Manhattan plot» montrant les valeurs de p pour les marqueurs DArTseq associés à la teneur totale en caroténoïdes (TCC); Axe des x correspond aux nombres des marqueurs DArTseq; Axe des y correspond au LOD ou  $-\log_{10}$  (valeurs de p); FDR: Taux des fausses découverte «False discovery rate»; LOD: Logarithme des odds.

### c. QTL associés à l'indice du jaune et à la teneur totale en caroténoïdes

L'analyse GWAS a permis d'identifier 29 MTA «marker-trait association» significatifs ou QTL au seuil de  $LOD > 3$ , pour le trait indice du pigment jaune, évalué dans six environnements chez une collection de 196 lignées issues de six populations locales. Ces QTL sont répartis sur tous les chromosomes: 1 AS (1); 1 BL (2); 2 AL (1); 2 AS (1); **3AL (4)**; 3AS (1); 3B (3); 4AL (1); 4 BL (3); 5 AL (2); 5 BL (2); **6 AL (4)**; 6 BL (1); 7 BS (1) et 7 AS (1). Les QTL identifiés ont expliqué jusqu'à 17% la variation phénotypique de l'indice du jaune. Parmi lesquels ceux qui sont localisés sur 7 BS, 6 AL, 2 AS et 2 BL ont expliqué la majeure variation phénotypique de ce trait 12 %, 14 %, 16 % et 17 %, respectivement. D'autres QTL



situés sur les chromosomes 3 AL (4%), 3B (6-7-8 et 9%), 5 BL (7%), 6 BL (9%) et 7 AS (5%) ont expliqué une proportion plus faible de la variation phénotypique de l'indice du jaune (tableau 22).

**Tableau 22:** Marqueurs DArTseq associés significativement à  $(-\log_{10}(p) \geq 3)$  avec l'indice du pigment jaune (moyenne des six environnements) en utilisant la GWAS avec le modèle (MLM + K + Q) chez une collection de 196 lignées issues des six populations locales.

Indice du jaune (valeur du b*)				
Chromosome <sup>a</sup>	ID Marqueur DArTseq	Distance (pb) <sup>b</sup>	LOD	R <sup>2</sup> (%)
1AS	106860021	36211	3.00	2
<b>1BL</b>	106351550	45141	3.79	<b>17</b>
1BL	106465356	32042	4.19	7
2AL	104215834	41221	3.00	0
<b>2AS</b>	104203207	10767	<b>4.88</b>	<b>16</b>
3AL	102443617	68698	<b>4.31</b>	4
3AL	103595532	38204	3.13	2
3AL	104434797	9980	<b>5.59</b>	2
3AL	106781111	32447	<b>5.12</b>	<b>9</b>
3AS	106418053	120718	3.03	3
3B	104196592	241340	3.43	6
3B	105920177	260140	3.01	<b>7</b>
3B	106635321	79578	3.18	<b>8</b>
4AL	101046785	115342	3.97	<b>9</b>
4BL	104211220	128806	<b>4.18</b>	0
4BL	105107009	103330	3.33	0
4BL	106406439	150755	3.21	0
5AL	105153873	26876	3.01	1
5AL	106375265	131255	3.18	0
5BL	102421569	24483	3.48	<b>7</b>
5BL	106643537	3841	3.17	0
5BL	106655551	3971	3.54	2
6AL	101033741	15849	3.21	1
<b>6AL</b>	103144663	40817	3.05	<b>14</b>
<b>6AL</b>	103588961	48285	3.50	<b>10</b>
6AL	103593310	87335	3.55	6
6BL	106755203	77095	3.58	9
<b>7BS</b>	104789990	12799	3.25	<b>12</b>
7AS	104911449	27814	3.22	5

a: Position sur le chromosome; b: Distance physique en se basant sur la carte consensus du blé tendre référence; pb: Paires de bases; ID: Identifiant du marqueur DArTseq; R<sup>2</sup>: Variation phénotypique expliquée par les QTL (%); LOD: Logarithme des odds.

Egalement, l'analyse GWAS a permis d'identifier 12 QTL au seuil de LOD > 3 pour la teneur totale en caroténoïdes, évaluée dans deux environnements chez une collection de 196

lignées issues de six populations locales. Ces QTL ont été identifiés sur les chromosomes 1 BL (1); 1 BS (2); 2 BL (2); 4 AL (2); 4 BS (1); 5 AL (1); 5 BL (1); 6 AL (1) et 7 BL (1). La majorité des QTL ont été identifiés sur le génome B. La majorité des QTL expliquent une grande proportion de la variation phénotypique allant de 19.83% sur le chromosome 1 BS jusqu'à 26.16 % sur le chromosome 4 AL. Une proportion plus faible de la variation phénotypique de la teneur en caroténoïdes est expliquée par les QTL localisés sur les chromosomes 5 BL (5.61%), 2 BL (7.24%) et plus importante sur le chromosome 5 AL (13.9%). Toutefois, le QTL identifié sur le chromosome 7 BL n'a aucun effet sur la teneur totale en caroténoïdes exprimée en  $\mu\text{g}$  de lutéine par gramme de matière sèche.

**Tableau 23:** Marqueurs DArTseq associés significativement à  $(-\log_{10}(p) \geq 3)$  avec la teneur totale des caroténoïdes (moyenne de deux environnements) en utilisant la GWAS avec le modèle (MLM + K + Q) chez une collection de 196 lignées issues des six populations locales.

Teneur totale en caroténoïdes (TTC)				
Chromosome <sup>a</sup>	ID Marqueur DArTseq	Distance (pb) <sup>b</sup>	LOD	R <sup>2</sup> (%)
1BL	106822523	15904	3.47	<b>22.48</b>
1BS	103120940	7251	3.77	<b>23.49</b>
1BS	106548207	41240	<b>4.07</b>	<b>19.83</b>
2BL	105033659	16126	3.30	7.24
2BL	106747926	53682	3.36	<b>21.93</b>
4AL	106374204	190374	3.76	<b>23.85</b>
4AL	106789905	26256	<b>4.19</b>	<b>26.16</b>
4BS	106374204	190374	3.76	<b>23.85</b>
5AL	106789899	21408	3.69	13.90
5BL	104409635	127194	3.09	5.61
6AL	105978074	21552	3.39	<b>22.49</b>
7BL	106632435	4450	3.17	0

a: Position sur le chromosome; b: Distance physique en se basant sur la carte consensus du blé tendre référence; pb: Paires de bases; ID: Identifiant du marqueur DArTseq; R<sup>2</sup>: Variation phénotypique expliquée par les QTL (%); LOD: Logarithme des odds.

#### 4. Discussion

L'étude pan-génomique est devenue une approche de plus en plus utilisée suite à la propagation des plateformes de génotypage à très haut débit pour disséquer la base génétique des traits complexes. Toutefois, cette méthode est sujette à la détection de fausses associations positives dues à une structure de population confondante ou à l'effet de la parenté relative. Dans la présente étude, nous avons utilisé plusieurs modèles mixtes, avec des effets fixes et aléatoires pour contrôler ces fausses associations (Yu et al., 2006). Les résultats obtenus sur la base des graphiques Q-Q, en testant quatre modèles statistiques ont montré que le modèle le

plus performant et le plus approprié pour détecter de vraies associations significatives pour les traits étudiés, notamment l'indice du jaune et la teneur totale en caroténoïdes est le modèle linéaire mixte MLM (K + Q), faisant intervenir la structure de la population Q obtenue avec un nombre de PC = 20 et la parenté relative K entre les 196 lignées issues des six populations locales Tunisiennes. La performance de ce modèle confirme d'autres résultats de GWAS portant sur des caractères quantitatifs chez plusieurs plantes cultivées (Gupta et al., 2014; Sukumaran et Yu, 2014).

Par ailleurs, la correction Bonferroni et le taux des fausses découvertes (FDR) qui ont été utilisés pour déterminer le seuil de détection des vrais MTA significatifs pour l'indice du jaune ainsi que pour la teneur totale en caroténoïdes ont montré des limites. En effet, aucun MTA n'a été identifié avec ces deux approches pour la teneur totale en caroténoïdes. Toutefois, pour l'indice du jaune, la correction Bonferroni a permis de déclarer un seul QTL sur le chromosome 3 AL par contre le FDR a permis de déclarer 3 QTL sur les chromosomes 2 AS et 3 AL. Des études similaires de GWAS ont également montré que malgré que la correction de Bonferroni présente un seuil plus strict, lorsqu'elle a été testée, elle n'a pas abouti à de nombreux MTA importants (Sukumaran et al., 2018b).

Cependant, le choix du seuil  $-\log_{10} p > 3$  pour détecter des MTA a été utilisé dans plusieurs études de GWAS (Roselló et al., 2018; Sukumaran et al., 2018b). Il a été estimé sur la base des diagrammes Q-Q au point de déviation des valeurs de p observées de celles attendues. Dans notre étude, ce seuil a permis d'identifier 29 MTA significatifs ( $LOD > 3$ ) pour l'indice du jaune. Les QTL détectés associés à ce trait sont répartis sur tous les chromosomes. Ces résultats sont concordants avec des travaux ultérieurs décrivant plusieurs QTL associé à l'indice du jaune sur tous les chromosomes du blé dur (Ficco et al., 2014; Colasuonno, et al. 2017). Concernant la teneur en caroténoïdes estimée en terme de moyenne de deux années chez la collection locale de blé dur; 14 QTL ont été identifiés au seuil de  $-\log_{10} p < 3$  sur les chromosomes 1 BL (1); 1 BS (2); 2 BL (2); 4 AL (2); 4 BS (1); 5 AL (1); 5 BL (1); 6 AL (1) et 7 BL (1) confirmant ainsi les travaux de Roncallo et Viviana, (2014) qui ont décrit des QTL situés aussi sur les chromosomes 6 AL, 7 BL et 7 BS et qui affectent la teneur en pigment jaune chez une collection de 93 RILs évalués dans six environnements.

En nous basant sur la définition de Flint-Garcia et al., (2003) indiquant qu'un QTL identifié par une étude d'association est considéré comme QTL majeur à partir d'un  $R^2 \geq 10\%$ . Dans la présente étude, le GWAS pour l'indice du jaune a montré 4 QTL majeurs sur les 29 identifiés. Ces QTL majeurs sont localisés sur les chromosomes 7 BS, 6 AL, 2 AS et 2 BL

et ils ont expliqué la majeure variation phénotypique de ce trait 12 % - 14 % - 16 % et 17 %, respectivement. Des travaux antérieurs utilisant la cartographie d'association biparentale ont plutôt identifié des QTL majeurs sur les chromosomes 7AL (Patil et al., 2008; Blanco et al., 2011) et 7 BL (Elouafi et al., 2001; Pozniak et al., 2007). Par contre Roncallo et Viviana (2014) ont pu démontrer en évaluant 93 RILs dans six environnements que les trois QTL localisés sur les chromosomes 4 AL, 6 BL et 7 BL sont responsables de la variation de la couleur jaune de la semoule. Colasuonno et al., (2017) ont décrit 11 nouveaux QTL associés à l'indice du jaune, y compris sur le chromosome 7AS et dont cinq QTL situés sur les régions génomiques des chromosomes 7A (4) et 5 B (1) sont stables dans six environnements. Les travaux de GWAS de Giraldo et al., (2016) utilisant une collection de populations locales de blé dur ont mentionné que les QTL identifiés sur le chromosome 3B ont un plus grand effet sur l'indice du jaune que celui trouvé sur le chromosome 7B. De plus ce dernier QTL a été identifié dans la région distale du chromosome 7 B (Giraldo et al., 2016) et il est différent du QTL majeur PSY 1 B sur le chromosome 7 B codant pour la phytoène synthase décrit par plusieurs auteurs (Elouafi et al., 2001; Pozniak et al., 2007).

Les résultats de GWAS pour la teneur totale en caroténoïdes ont montré que la majorité des QTL identifiés ont expliqué une grande proportion de la variation phénotypique allant de 13.90% sur le chromosome 5 AL jusqu'à 26.16 % sur le chromosome 4 AL. Toutefois, le QTL identifié sur le chromosome 7 BL avec un LOD = 3,17 n'a pas d'effet sur la variation de ce trait, contrairement à d'autres études où ils ont trouvé que le QTL identifié dans ce chromosome est responsable de la plus grande proportion de la teneur en pigments jaunes (Elouafi et al., 2001; Pozniak et al., 2007). Alors que le QTL identifié sur le chromosome 5AL avec un LOD = 3.69 et expliquant 13.90 % la variation de l'indice du jaune pourrait correspondre à la région génomique PSY A2 déjà décrite responsable de 13% de la variabilité de ce trait (Blanco et al., 2009). Des études de GWAS similaires de Roselló et al., (2018) utilisant une collection de 165 populations locales de blé dur génotypées avec 1149 marqueurs DArT et évaluées durant trois années pour la teneur totale en caroténoïdes ont montré l'identification et l'importance d'une région génomique stable sur le chromosome 4AL responsable de la couleur jaune de la semoule et de la teneur en pigments jaunes. Roncallo et Viviana, (2014) ont décrit trois QTL sur les chromosomes 6 AL, 7 BL et 7 BS qui sont responsables de la variation de la teneur en pigments jaunes en mentionnant l'importance du QTL 6AL chez une collection de 93 RILs (Roncallo and Viviana, 2014).

Les résultats de cette étude ont permis d'identifier chez la collection de populations locales tunisiennes des nouveaux QTL pour les deux traits: indice du jaune et teneur totale en caroténoïdes. Ces QTL pourront être validés et utilisés pour sélectionner des lignées riches en caroténoïdes.

#### **IV. Conclusion générale et perspectives**

Dans la présente étude, l'utilisation de la nouvelle technologie de génotypage à très haut débit DArTseq a permis de montrer d'une part une variabilité génétique considérable entre les populations locales Tunisiennes de blé dur, qui ont été collectées dans le sud, le centre et l'oasis de Mareth et d'autre part une faible variabilité intra population. Cette technique a permis également d'identifier un nouveau pool génétique représenté par la population Jenah Zarzoura, de montrer que les populations Mahmoudi et Biskri forment le même groupe, de découvrir des populations locales non encore inventoriées et décrites dans l'oasis de Mareth, de valider les noms vernaculaires des populations locales attribués par les agriculteurs, de bien classer les lignées mal assignées pouvant provenir des mélanges et finalement de spéculer les voies d'introduction de ces populations en les comparant avec une collection de populations locales étrangères d'origine méditerranéenne et de l'Asie de l'Ouest. Les populations locales ont montré une similitude génétique avec celles Nord-Africaines.

Etant donné l'importance des caroténoïdes sur le plan nutritionnel, commercial, santé humaine et en tant que critère de tolérance à divers stress abiotiques, l'évaluation d'une collection de 196 lignées de blé dur issues de six populations locales pour les teneurs en caroténoïdes dans plusieurs environnements a montré une grande variabilité pour la richesse en caroténoïdes. Certaines lignées des populations Jenah Khotifa possèdent des teneurs en caroténoïdes dépassant celles des variétés améliorées Tunisiennes et les lignées élites reçues de l'ICARDA. Cette richesse et variabilité en caroténoïdes avec une héritabilité étendue élevée de l'indice du pigment jaune et la teneur totale en caroténoïdes, une prédominance de l'effet génotype et une faible interaction génotype \*environnement ont facilité l'exploitation de cette collection tunisienne de blé dur ancien dans une étude d'association pan-génomique utilisant la technologie DArTseq pour identifier des QTL associés d'une part à l'indice du jaune (13 QTL) et d'autre part à la teneur totale en caroténoïdes (7 QTL).

Ces résultats nous ont permis d'élaborer les perspectives suivantes:

- Pour la conservation des accessions dans la banque nationale des gènes, il est recommandé de conserver les populations locales en vrac ou «bulk» pour minimiser l'espace et le coût. Les lignées peuvent être conservées en tant que collection de travail pour les recherches similaires à notre étude.
- Des missions de prospection et d'inventaire dans les oasis pour collecter de nouvelles populations locales de blé dur qui pourront faciliter la compréhension des voies de leurs introductions en Tunisie.
- Des missions de prospection du nord au sud de la Tunisie en collaboration avec les Commissariats Régionaux de Développement Agricole (CRDA) pour collecter des populations locales portant le même nom vernaculaire, corriger les erreurs de nomenclature et établir un catalogue de référence des populations actuelles.
- Exploiter les lignées riches en caroténoïdes dans un programme d'amélioration génétique pour développer des variétés améliorées locales et internationales plus riches en caroténoïdes.
- Valoriser la teneur des caroténoïdes avec d'autres critères de qualité du grain chez les populations dans les produits dérivés tels que les pâtes, le couscous etc.....
- Sur la base des QTL identifiés, d'autres études sont nécessaires pour développer de nouveaux marqueurs moléculaires stables pour la sélection assistée par marqueurs pour les variétés de blé dur riches en caroténoïdes.
- Evaluer une collection plus grande en populations locales pour les teneurs en caroténoïdes dans différents pays du bassin méditerranéen.
- Etude enzymatique des différents maillons de la voie de biosynthèse des caroténoïdes pour mieux disséquer la base génétique et identifier d'autres QTL associées sur la base des DArTseq.

## V. Références bibliographiques

- Abd-El-Haleem, S., Reham, M., & Mohamed, S. (2009). Genetic analysis and RAPD polymorphism in some durum wheat genotypes. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4(1), 1-9.
- Abdalla, O., Payne, T., & Braun, H. (1993). Durum wheat breeding and quality improvement at CIMMYT/Mexico.
- Abdel-Aal, E.-S., & Rabalski, I. (2012). AACCI approved methods technical committee report: a new AACCI approved method for the determination of the total carotenoid content of cereal whole grain and refined flours. *Cereal Foods World*, 57(6), 289-293.
- Abderrahmane, H., El Abidine, F. Z., Hamenna, B., & Ammar, B. (2013). Correlation, path analysis and stepwise regression in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under rainfed conditions. *Journal of Agriculture and Sustainability*, 3(2).
- Abdurakhmonov, I. Y., & Abdugarimov, A. (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *International Journal of Plant Genomics*, 2008.
- Abu-Zaitoun, S., Chandrasekhar, K., Assili, S., Shtaya, M., Jamous, R., Mallah, O., . . . Alhajaj, N. (2018). Unlocking the Genetic Diversity within A Middle-East Panel of Durum Wheat Landraces for Adaptation to Semi-arid Climate. *Agronomy*, 8(10), 233.
- Aissa, A. D., & Mhiri, A. (2002). Fertilisation phospho-potassique du blé dur en culture intensive en Tunisie. *Cahiers Agricultures*, 11(6), 391-397.
- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., . . . Kuchel, H. (2006). Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(8), 1409-1420.
- Akhunov, E., Nicolet, C., & Dvorak, J. (2009). Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(3), 507-517.
- Alahmad, S., El Hassouni, K., Bassi, F. M., Dinglasan, E., Youssef, C., Quarry, G., . . . Able, J. A. (2019). A major root architecture QTL responding to water limitation in durum wheat. *Frontiers in plant science*, 10, 436.
- Alipour, H., Bihamta, M. R., Mohammadi, V., Peyghambari, S. A., Bai, G., & Zhang, G. (2017). Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. *Frontiers in plant science*, 8, 1293.

- Allen, A. M., Barker, G. L., Berry, S. T., Coghill, J. A., Gwilliam, R., Kirby, S., . . . McKenzie, N. (2011). Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant biotechnology journal*, *9*(9), 1086-1099.
- Alsaleh, A., Baloch, F. S., Derya, M., Azrak, M., Kilian, B., Özkan, H., & Nachit, M. (2015). Genetic linkage map of Anatolian durum wheat derived from a cross of Kunduru-1149× Cham1. *Plant Molecular Biology Reporter*, *33*(2), 209-220.
- Amallah, L., Taghouti, M., Rhrib, K., Gaboun, F., & Hassikou, R. (2014). Genetic variability in agromorphological and quality traits of Mediterranean durum wheat landraces. *Cereal Research Communications*, *43*(1), 123-132.
- Amine, S., Sourour, A., Olfa, S.-A., Cyrine, R., da Silva, J. A. T., & Hajer, S.-A. (2011). Morphological Diversity of Some Qualitative Traits in Tetraploid Wheat Landrace Populations Collected in the South of Tunisia. *International Journal of Plant Breeding*, *5*(1), 67-70.
- Ammar, K., Gharbi, M. S., & Deghaïes, M. (2016). Wheat in Tunisia. In A. P. Bonjean, W. J. Angus & M. V. Ginkel (Eds.), *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding* (Vol. 3). Paris: Lavoisier.
- Andersen, J. R., & Lübberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in plant science*, *8*(11), 554-560.
- Auriau, P. (1967). *Amélioration de blé dur*. Tunisie: Annales de l'INAT
- Autrique, E., Nachit, M., Monneveux, P., Tanksley, S. D., & Sorrells, M. E. (1996). Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphophysiological traits, and coefficient of parentage. *Crop Science*, *36*(3), 735-742.
- Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S. O., Gundlach, H., . . . Wiebe, K. (2017). Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*, *357*(6346), 93-97.
- Avni, R., Nave, M., Eilam, T., Sela, H., Alekperov, C., Peleg, Z., . . . Distelfeld, A. (2014). Ultra-dense genetic map of durum wheat× wild emmer wheat developed using the 90K iSelect SNP genotyping assay. *Molecular Breeding*, *34*(4), 1549-1562.
- Baloch, F. S., Alsaleh, A., Shahid, M. Q., Çiftçi, V., de Miera, L. E. S., Aasim, M., . . . Hatipoğlu, R. (2017). A whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from central fertile crescent. *PLoS one*, *12*(1), e0167821.



- Belhadj, H., Medini, M., Bouhaouel, I., & Amara, H. (2015). Analyse de la diversité phénotypique de quelques accessions autochtones de blé dur (*Triticum turgidum* ssp. *durum* Desf.) du sud tunisien. *J New Sci Agric Biotechnol*, 24(5), 1115-1125.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Bertin, P., Grégoire, D., Massart, S., & De Froidmont, D. (2004). High level of genetic diversity among spelt germplasm revealed by microsatellite markers. *Genome*, 47(6), 1043-1052.
- Bhatta, M., Baenziger, P., Waters, B., Poudel, R., Belamkar, V., Poland, J., & Morgounov, A. (2018). Genome-wide association study reveals novel genomic regions associated with 10 grain minerals in synthetic hexaploid wheat. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3237.
- Blanco, A., Bellomo, M., Lotti, C., Maniglio, T., Pasqualone, A., Simeone, R., . . . Di Fonzo, N. (1998). Genetic mapping of sedimentation volume across environments using recombinant inbred lines of durum wheat. *Plant breeding*, 117(5), 413-417.
- Blanco, A., Colasuonno, P., Gadaleta, A., Mangini, G., Schiavulli, A., Simeone, R., . . . Cattivelli, L. (2011). Quantitative trait loci for yellow pigment concentration and individual carotenoid compounds in durum wheat. *Journal of Cereal Science*, 54(2), 255-264.
- Blanco, A., Schiavulli, A., Colasuonno, P., Gadaleta, A., Sonnante, G., & Pignone, D. (2009). Mapping of phytoene synthase (*psy2*) genes on group 5 chromosomes of durum wheat. *Proceedings of the 19th International Triticeae Mapping Initiative, Clermont-Ferrand, France*.
- Boeuf, F. (1932). *Le Blé en Tunisie: La plante. Le milieu physico-chimique*: Société anonyme de l'imprimerie rapide de Tunis.
- Bonjean, A. (2001). Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). *Dossier de l'environnement de l'INRA*, 21, 29-37.
- Bonjean, A. P., & Angus, W. J. (2001). *The world wheat book: a history of wheat breeding*: Lavoisier Publishing.
- Bonjean, A. P., Angus, W. J., & van Ginkel, M. (2016). *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding, Vol. 3. Paris: Lavoisier*.
- Borrill, P., Adamski, N., & Uauy, C. (2015). Genomics as the key to unlocking the polyploid potential of wheat. *New Phytologist*, 208(4), 1008-1022.

- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Breseghello, F., & Sorrells, M. E. (2006). Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics*, 172(2), 1165-1177.
- Bruford, M. W., Ciofi, C., & Funk, S. M. (1998). Characteristics of microsatellites *Molecular Tools for Screening Biodiversity* (pp. 202-205): Springer.
- Calderini, D., Abeledo, L., Savin, R., & Slafer, G. A. (1999). Effect of temperature and carpel size during pre-anthesis on potential grain weight in wheat. *The Journal of Agricultural Science*, 132(4), 453-459.
- Campos, K. M., Royo, C., Schulthess, A., Villegas, D., Matus, I., Ammar, K., & Schwember, A. R. (2016). Association of phytoene synthase Psy1-A1 and Psy1-B1 allelic variants with semolina yellowness in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Euphytica*, 207(1), 109-117.
- Cao, H., Wang, J., Dong, X., Han, Y., Ma, Q., Ding, Y., . . . Xu, Q. (2015). Carotenoid accumulation affects redox status, starch metabolism, and flavonoid/anthocyanin accumulation in citrus. *BMC plant biology*, 15(1), 27.
- Cao, W., Hughes, G., Ma, H., & Dong, Z. (2001). Identification of molecular markers for resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(4), 551-554.
- Cavanagh, C. R., Chao, S., Wang, S., Huang, B. E., Stephen, S., Kiani, S., . . . Akhunova, A. (2013). Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(20), 8057-8062.
- Chao, S., Sharp, P., Worland, A., Warham, E., Koebner, R., & Gale, M. (1989). RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 78(4), 495-504.
- Chen, T., Tantasawat, P. A., Wang, W., Gao, X., & Zhang, L. (2018). Population structure of Chinese southwest wheat germplasms resistant to stripe rust and powdery mildew using the DArT-seq technique. *Ciência Rural*, 48(4).
- Chen, W., Mingus, J., Mammadov, J., Backlund, J., Greene, T., Thompson, S., & Kumpatla, S. (2010). *KASPar: a simple and cost-effective system for SNP genotyping*. Paper presented at the Final program, abstract and exhibit guide of the XVIII international conference on the status of plant and animal genome research, San Diego, CA.

- Chevalier, A. (1939). Les origines et l'évolution de l'agriculture méditerranéenne. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 19(217), 613-662.
- Clarke, F., Clarke, J., McCaig, T., Knox, R., & DePauw, R. (2006). Inheritance of yellow pigment concentration in seven durum wheat crosses. *Canadian journal of plant science*, 86(1), 133-141.
- Colasuonno, P., Gadaleta, A., Giancaspro, A., Nigro, D., Giove, S., Incerti, O., . . . Blanco, A. (2014). Development of a high-density SNP-based linkage map and detection of yellow pigment content QTLs in durum wheat. *Molecular Breeding*, 34(4), 1563-1578.
- Colasuonno, P., Lozito, M. L., Marcotuli, I., Nigro, D., Giancaspro, A., Mangini, G., . . . Houston, K. (2017). The carotenoid biosynthetic and catabolic genes in wheat and their association with yellow pigments. *BMC genomics*, 18(1), 122.
- Committee, A. A. o. C. C. A. M. (2000). *Approved methods of the American association of cereal chemists* (Vol. 1): Amer Assn of Cereal Chemists.
- Crawford, A., & Francki, M. (2013). Lycopene- $\epsilon$ -cyclase (e-LCY3A) is functionally associated with QTL for flour b\* colour on chromosome 3A in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed*, 31, 737-741.
- Crawford, A., Shaw, K., Stefanova, K., Lambe, W., Ryan, K., Wilson, R., . . . Francki, M. (2008). A molecular toolbox for xanthophyll genes in wheat.
- Crawford, A. C., & Francki, M. G. (2013). Chromosomal location of wheat genes of the carotenoid biosynthetic pathway and evidence for a catalase gene on chromosome 7A functionally associated with flour b\* colour variation. *Molecular genetics and genomics*, 288(10), 483-493.
- Cui, F., Zhang, N., Fan, X.-l., Zhang, W., Zhao, C.-h., Yang, L.-j., . . . Zhao, X.-q. (2017). Utilization of a Wheat660K SNP array-derived high-density genetic map for high-resolution mapping of a major QTL for kernel number. *Scientific reports*, 7(1), 3788.
- D'Arcy, W. T. (1946). *Wheat in Antiquity*-Naum Jasny: The Wheats of Classical Antiquity. (Johns Hopkins University Studies in Historical and Political Science, Series LXII, No. 3.) Pp. 176; 2 plates. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1944. Paper, \$1.75. *The Classical Review*, 60(3), 120-122.

- Daaloul, A., Harrabi, M., Amara, H., & Gougjil, S. (1998). Evaluation de la collection nationale de blé dur. *Revue de l'Institut National Agronomique de Tunisie*, 337-358.
- Darwin, C., & Royer, C.-A. (1862). De l'origine des especes ou des lois du progres chez les etres organises par Ch. Darwin: Guillaumin.
- Deghais, M., Kouki, M., Gharbi, M., & El Felah, M. (2007). Les variétés de céréales cultivées en Tunisie. *Ministère de L'Agriculture et des Ressources Hydrauliques. Tunis, Tunisie.*
- Dong, C.-h., XIA, X.-c., Zhang, L.-p., & He, Z.-h. (2012). Allelic variation at the TaZds-A1 locus on wheat chromosome 2A and development of a functional marker in common wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(7), 1067-1074.
- Dubcovsky, J., & Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833), 1862-1866. doi: 10.1126/science.1143986
- Ducellier, L. (1920). *Les ble's du Sahara*. Alger Bibliothe`que du colon de l'Afrique du Nord
- DuPont, F. M., & Altenbach, S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*, 38(2), 133-146.
- Dvorak, J., & Akhunov, E. D. (2005). Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the Aegilops-Triticum alliance. *Genetics*, 171(1), 323-332.
- Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Elouafi, I., Nachit, M., & Martin, L. (2001). Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Hereditas*, 135(2-3), 255-261.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one*, 6(5), e19379.
- Eltaher, S., Sallam, A., Belamkar, V., Emara, H. A., Nower, A. A., Salem, K. F., . . . Baenziger, P. S. (2018). Genetic diversity and population structure of F3: 6 Nebraska winter wheat genotypes using genotyping-by-sequencing. *Frontiers in genetics*, 9, 76.
- Essid, M. Y. (2012). History of Mediterranean food *MediTERRA 2012 (english)* (pp. 51-69): Presses de Sciences Po (PFNSP).

- Faris, J. D. (2014). Wheat domestication: Key to agricultural revolutions past and future *Genomics of plant genetic resources* (pp. 439-464): Springer.
- Fayaz, F., Mardi, M., Aghaee, M., Darvish, F., & Talebi, R. (2013). Phenotypic diversity analysis of grain yield and yellow pigment content in germplasm collected from Iranian durum wheat (*Triticum turgidum* L.) landraces. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(10), 1339-1357.
- Fayaz, F., Sarbarzeh, M. A., Talebi, R., & Azadi, A. (2019). Genetic Diversity and Molecular Characterization of Iranian Durum Wheat Landraces (*Triticum turgidum durum* (Desf.) Husn.) Using DArT Markers. *Biochemical genetics*, 57(1), 98-116.
- Feillet, P. (2000). *Le grain de blé: composition et utilisation*: Editions Quae.
- Feldman, M. (2001). Origin of cultivated wheat *The world wheat book: a history of wheat breeding* (pp. 3-58): Lavoisier Publishing.
- Feldman, M., & Kislev, M. E. (2007). Domestication of emmer wheat and evolution of free-threshing tetraploid wheat. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55(3-4), 207-221.
- Feldman, M., & Levy, A. (2005). Allopolyploidy—a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and genome research*, 109(1-3), 250-258.
- Ficco, D. B., Mastrangelo, A. M., Trono, D., Borrelli, G. M., De Vita, P., Fares, C., . . . Papa, R. (2014). The colours of durum wheat: a review. *Crop and Pasture Science*, 65(1), 1-15.
- Fiedler, J. D., Salsman, E., Liu, Y., Michalak de Jiménez, M., Hegstad, J. B., Chen, B., . . . Elias, E. M. (2017). Genome-wide association and prediction of grain and semolina quality traits in durum wheat breeding populations. *The Plant Genome*.
- Flandrin, F. (1949). Les blés de semence. *Sélection, hybridisation, généalogique, production, caractéristiques de variétés, réglementation*. Paris.
- Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., & Buckler IV, E. S. (2003). Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual review of plant biology*, 54(1), 357-374.
- Francis, D., & Piekielek, W. (1998). Assessing crop nitrogen needs with chlorophyll meters. SSMG-12. *Site-specific management guidelines [Online]*. Available at <http://www.ppi-far.org/ssmg> (accessed April 2005).
- Fратиани, A., Giuzio, L., Di Criscio, T., Zina, F., & Panfili, G. (2013). Response of carotenoids and tocopherols of durum wheat in relation to water stress and sulfur fertilization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(11), 2583-2590.

- Fратиани, A., Irano, M., Panfili, G., & Acquistucci, R. (2005). Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(7), 2373-2378.
- Ganal, M. W., Durstewitz, G., Polley, A., Bérard, A., Buckler, E. S., Charcosset, A., . . . Joets, J. (2011). A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS one*, *6*(12), e28334.
- Gao, X., & Martin, E. R. (2009). Using allele sharing distance for detecting human population stratification. *Human heredity*, *68*(3), 182.
- Gaut, B. S., & Long, A. D. (2003). The lowdown on linkage disequilibrium. *The Plant Cell*, *15*(7), 1502-1506.
- Gepts, P. (2004). Crop domestication as a long-term selection experiment *Plant breeding reviews* (Vol. 24, pp. 1-44). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Gioia, T., Nagel, K. A., Beleggia, R., Fragasso, M., Ficco, D. B. M., Pieruschka, R., . . . Papa, R. (2015). Impact of domestication on the phenotypic architecture of durum wheat under contrasting nitrogen fertilization. *Journal of experimental botany*, *66*(18), 5519-5530.
- Giraldo, P., Royo, C., González, M., Carrillo, J. M., & Ruiz, M. (2016). Genetic diversity and association mapping for agromorphological and grain quality traits of a structured collection of durum wheat landraces including subsp. durum, turgidum and diccocon. *PLoS one*, *11*(11), e0166577.
- Graner, A., Jahoor, A., Schondelmaier, J., Siedler, H., Pillen, K., Fischbeck, G., . . . Herrmann, R. (1991). Construction of an RFLP map of barley. *Theoretical and Applied Genetics*, *83*(2), 250-256.
- Güler, M. (2003). Irrigation effects on quality characteristics of durum wheat. *Canadian journal of plant science*, *83*(2), 327-331.
- Gupta, P., Kumar, J., Mir, R., & Kumar, A. (2010). 4 Marker-Assisted Selection as a Component of Conventional Plant Breeding. *Plant breeding reviews*, *33*, 145.
- Gupta, P., Varshney, R. K., Sharma, P., & Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant breeding*, *118*(5), 369-390.
- Gupta, P. K., Kulwal, P. L., & Jaiswal, V. (2014). Association mapping in crop plants: opportunities and challenges *Advances in genetics* (Vol. 85, pp. 109-147): Elsevier.
- Gupta, P. K., Rustgi, S., & Kulwal, P. L. (2005). Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant molecular biology*, *57*(4), 461-485.

- Guttieri, M. J., Stark, J. C., O'Brien, K., & Souza, E. (2001). Relative sensitivity of spring wheat grain yield and quality parameters to moisture deficit. *Crop Science*, *41*(2), 327-335.
- Guzmán, C., Autrique, J. E., Mondal, S., Singh, R. P., Govindan, V., Morales-Dorantes, A., . . . Peña, R. J. (2016). Response to drought and heat stress on wheat quality, with special emphasis on bread-making quality, in durum wheat. *Field Crops Research*, *186*, 157-165.
- Haas, M., Schreiber, M., & Mascher, M. (2019). Domestication and crop evolution of wheat and barley: Genes, genomics, and future directions. *Journal of integrative plant biology*.
- Harman, C. (2008). *A people's history of the world: from the Stone Age to the New Millennium*: Verso Books.
- Hashimoto, H., Uragami, C., & Cogdell, R. J. (2016). Carotenoids and Photosynthesis. *Subcell Biochem*, *79*, 111-139. doi: 10.1007/978-3-319-39126-7\_4
- Haun, W. J., Hyten, D. L., Xu, W. W., Gerhardt, D. J., Albert, T. J., Richmond, T., . . . Vance, C. P. (2011). The composition and origins of genomic variation among individuals of the soybean reference cultivar Williams 82. *Plant physiology*, *155*(2), 645-655.
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, *79*(4), 597-606.
- Havaux, M., Ernez, M., & Lannoye, R. (1988). Sélection de variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle in vivo. *Agronomie*, *8*(3), 193-199.
- He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z.-X., Liu, H., & Li, Z. (2014). Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in plant science*, *5*, 484.
- He, X., Zhang, Y., He, Z., Wu, Y., Xiao, Y., Ma, C., & Xia, X. (2008). Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. *Theoretical and Applied Genetics*, *116*(2), 213-221.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(23), 6663-6668.

- Hessler, T., Thomson, M., Benscher, D., Nachit, M., & Sorrells, M. (2002). Association of a lipooxygenase locus, Lpx-B1, with variation in lipooxygenase activity in durum wheat seeds. *Crop Science*, 42(5), 1695-1700.
- Hoisington, D., GONZALEZ DE LEON, D., & KHAIRALLAH, M. (1992). Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory.
- Holtz, Y., Ardisson, M., Ranwez, V., Besnard, A., Leroy, P., Poux, G., . . . David, J. (2016). Genotyping by sequencing using specific allelic capture to build a high-density genetic map of durum wheat. *PLoS one*, 11(5), e0154609.
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., & Pogson, B. J. (2016). Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends in plant science*, 21(9), 792-803.
- Howitt, C. A., Cavanagh, C. R., Bowerman, A. F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J. L., & Pogson, B. J. (2009). Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Functional & Integrative Genomics*, 9(3), 363-376.
- Hughes, N., Oliveira, H. R., Fradgley, N., Corke, F., Cockram, J., Doonan, J. H., & Nibau, C. (2019).  $\mu$  CT trait analysis reveals morphometric differences between domesticated temperate small grain cereals and their wild relatives. *The Plant Journal*.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research*, 29(4), e25-e25.
- Jaradat, A. A. (2013). Wheat landraces: a mini review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 20-29.
- Jing, H.-C., Bayon, C., Kanyuka, K., Berry, S., Wenzl, P., Huttner, E., . . . Hammond-Kosack, K. E. (2009). DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. *BMC genomics*, 10(1), 458.
- Johannsen, W. (1903). Heredity in populations and pure lines. *Classic Papers in Genetics*, 20-26.
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, 11(1), 94.
- Kabbaj, H., Sall, A. T., Al-Abdallat, A., Geleta, M., Amri, A., Filali-Maltouf, A., . . . Bassi, F. M. (2017). Genetic diversity within a global panel of durum wheat (*Triticum durum*) landraces and modern germplasm reveals the history of alleles exchange. *Frontiers in plant science*, 8, 1277.



- Karaca, M., & Izbirak, A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity in Turkish durum wheat cultivars using RAPD and ISSR markers. *Journal of food, agriculture & environment*.
- Khan, M. K., Pandey, A., Choudhary, S., Hakki, E. E., Akkaya, M. S., & Thomas, G. (2014). From RFLP to DArT: molecular tools for wheat (*Triticum* spp.) diversity analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(5), 1001-1032.
- Khoufi, S., Khamassi, K., da Silva, J. A. T., Chaabane, R., & Naceur, M. B. B. (2012). Morphological and molecular characterization of six of the most frequently cultivated hard wheat varieties in Tunisia. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 4(7), 106-114.
- Kidane, Y. G., Mancini, C., Mengistu, D. K., Frascaroli, E., Fadda, C., Pè, M. E., & Dell'Acqua, M. (2017). Genome wide association study to identify the genetic base of smallholder farmer preferences of durum wheat traits. *Frontiers in plant science*, 8, 1230.
- Kuchel, H., Fox, R., Reinheimer, J., Mosionek, L., Willey, N., Bariana, H., & Jefferies, S. (2007). The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy. *Molecular Breeding*, 20(4), 295-308.
- Kumar, A., Elias, E. M., Ghavami, F., Xu, X., Jain, S., Manthey, F. A., . . . Kianian, S. F. (2013). A major QTL for gluten strength in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Journal of Cereal Science*, 57(1), 21-29.
- Kumar, J., Saripalli, G., Gahlaut, V., Goel, N., Meher, P. K., Mishra, K. K., . . . Sansaloni, C. (2018). Genetics of Fe, Zn,  $\beta$ -carotene, GPC and yield traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using multi-locus and multi-traits GWAS. *Euphytica*, 214(11), 219.
- Laidò, G., Mangini, G., Taranto, F., Gadaleta, A., Blanco, A., Cattivelli, L., . . . De Vita, P. (2013). Genetic diversity and population structure of tetraploid wheats (*Triticum turgidum* L.) estimated by SSR, DArT and pedigree data. *PLoS one*, 8(6), e67280.
- Lala, S., Amri, A., & Maxted, N. (2018). Towards the conservation of crop wild relative diversity in North Africa: Checklist, prioritisation and inventory. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(1), 113-124.
- Large, E. C. (1954). Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. *Plant pathology*, 3(4), 128-129.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., & Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*, 288(5471), 1602-1603.

- Li, D. A., Walker, E., & Francki, M. G. (2015). Identification of a member of the catalase multigene family on wheat chromosome 7A associated with flour b\* colour and biological significance of allelic variation. *Molecular genetics and genomics*, 290(6), 2313-2324.
- Li, H., Vikram, P., Singh, R. P., Kilian, A., Carling, J., Song, J., . . . Payne, T. (2015). A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits. *BMC genomics*, 16(1), 216.
- Li, Y., Wu, Y., Hernandez-Espinosa, N., & Peña, R. J. (2013). The influence of drought and heat stress on the expression of end-use quality parameters of common wheat. *Journal of Cereal Science*, 57(1), 73-78.
- Lopes, M. S., El-Basyoni, I., Baenziger, P. S., Singh, S., Royo, C., Ozbek, K., . . . Manickavelu, A. (2015). Exploiting genetic diversity from landraces in wheat breeding for adaptation to climate change. *Journal of experimental botany*, 66(12), 3477-3486.
- Lukow, O. M., Adams, K., Suchy, J., DePauw, R. M., & Humphreys, G. (2013). The effect of the environment on the grain colour and quality of commercially grown Canada hard white spring wheat, *Triticum aestivum* L. 'Snowbird'. *Canadian journal of plant science*, 93(1), 1-11.
- Mac Key, J. (2005). Wheat: its concept, evolution, and taxonomy *Durum Wheat Breeding* (pp. 35-94): CRC Press.
- Maccaferri, M., Ricci, A., Salvi, S., Milner, S. G., Noli, E., Martelli, P. L., . . . Vendramin, V. (2015). A high-density, SNP-based consensus map of tetraploid wheat as a bridge to integrate durum and bread wheat genomics and breeding. *Plant biotechnology journal*, 13(5), 648-663.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Noli, E., & Tuberosa, R. (2005). Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Molecular Breeding*, 15(3), 271-290.
- Maccaferri, M., Stefanelli, S., Rotondo, F., Tuberosa, R., & Sanguineti, M. (2007). Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Genome*, 50(4), 373-384.
- Mace, E. S., Rami, J.-F., Bouchet, S., Klein, P. E., Klein, R. R., Kilian, A., . . . Jordan, D. R. (2009). A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high-throughput Diversity Array Technology (DART) markers. *BMC plant biology*, 9(1), 13.
- Mangini, G., Gadaleta, A., Colasuonno, P., Marcotuli, I., Signorile, A. M., Simeone, R., . . . Pecchioni, N. (2018). Genetic dissection of the relationships between grain yield components by genome-wide association mapping in a collection of tetraploid wheats. *PLoS one*, 13(1), e0190162.

- Mangini, G., Margiotta, B., Marcotuli, I., Signorile, M. A., Gadaleta, A., & Blanco, A. (2017). Genetic diversity and phenetic analysis in wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum and *Triticum aestivum* subsp. aestivum) landraces based on SNP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64(6), 1269-1280.
- Marcotuli, I., Gadaleta, A., Mangini, G., Signorile, A., Zacheo, S., Blanco, A., . . . Colasuonno, P. (2017). Development of a high-density SNP-based linkage map and detection of QTL for  $\beta$ -glucans, protein content, grain yield per spike and heading time in durum wheat. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1329.
- Matsuoka, Y. (2011). Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant and cell physiology*, 52(5), 750-764.
- Mazouz, L., & Bouzerzour, H. (2006). Etude de la contribution des paramètres phéno-morphologiques dans l'adaptation du blé dur (*Triticum durum* Desf.) dans l'étage bioclimatique semi-aride. *Mémoire de Magistère, Dépt. Agron. Fac. Sci, Université Hadj Lakhdar, Batna*.
- Medini, M., Hamza, S., Rebai, A., & Baum, M. (2005). Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(1), 21-31.
- Mengistu, D. K., Kiros, A. Y., & Pè, M. E. (2015). Phenotypic diversity in Ethiopian durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum) landraces. *The Crop Journal*, 3(3), 190-199.
- Miège, É. (1950). Les principales espèces et variétés de Blé cultivées en Afrique du Nord. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 30(327), 16-38.
- Mir, R. R., Hiremath, P. J., Riera-Lizarazu, O., & Varshney, R. K. (2013). Evolving molecular marker technologies in plants: from RFLPs to GBS *Diagnostics in Plant Breeding* (pp. 229-247): Springer.
- Moise, A. R., Al-Babili, S., & Wurtzel, E. T. (2013). Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chemical reviews*, 114(1), 164-193.
- Moragues, M., Moralejo, M., Sorrells, M. E., & Royo, C. (2007). Dispersal of durum wheat [*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum* convar. durum (Desf.) MacKey] landraces across the Mediterranean basin assessed by AFLPs and microsatellites. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(5), 1133-1144.
- Moragues, M., Zarco-Hernandez, J., Moralejo, M. A., & Royo, C. (2006). Genetic diversity of glutenin protein subunits composition in durum wheat landraces [*Triticum turgidum* ssp. *turgidum*

- convar. durum (Desf.) MacKey] from the Mediterranean basin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5), 993-1002.
- Morgante, M., & Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1), 175-182.
- Morrell, P. L., Toleno, D. M., Lundy, K. E., & Clegg, M. T. (2005). Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2442-2447.
- SAYAR, R., KHEMIRA, H., BCHINI, H., BENSALÉM, M. & NAHDI, H. (2007). Utilisation des composantes du rendement comme outil d'évaluation de la productivité chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) en irrigué et en pluvial: UNE APPROCHE ONTOGENIQUE. *Revue de l'INGREF*.
- N'Diaye, A., Haile, J. K., Nilsen, K., Walkowiak, S., Ruan, Y., Singh, A. K. & Pozniak, C. J. (2018). Haplotype Loci under Selection in Canadian Durum Wheat Germplasm over 60 Years of Breeding: Association with Grain Yield, Quality Traits, Protein Loss and Plant Height. *Frontiers in plant science*, 9, 1589.
- N'Diaye, A., Haile, J. K., Cory, A. T., Clarke, F. R., Clarke, J. M., Knox, R. E., & Pozniak, C. J. (2017). Single marker and haplotype-based association analysis of semolina and pasta colour in elite durum wheat breeding lines using a high-density consensus map. *PLoS one*, 12(1), e0170941.
- Naceur, B., Nailly, M., & Selmi, M. (1999). Effet d'un déficit hydrique survenant à différents stades de développement du blé sur l'humidité du sol, la physiologie de la plante et sur la composante du rendement. *Méditerranée*, 2, 53-60.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., . . . Labhane, N. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
- 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.
- Ndolo, V. U., & Beta, T. (2013). Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *Food Chemistry*, 139(1-4), 663-671.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.

- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Newton, A., Akar, T., Baresel, J., Bebeli, P., Bettencourt, E., Bladenopoulos, K., . . . Koutis, K. (2011). Cereal landraces for sustainable agriculture *Sustainable Agriculture Volume 2* (pp. 147-186): Springer.
- Nordborg, M., & Tavaré, S. (2002). Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *TRENDS in Genetics*, 18(2), 83-90.
- Oliveira, H. R., Campana, M. G., Jones, H., Hunt, H. V., Leigh, F., Redhouse, D. I., . . . Jones, M. K. (2012). Tetraploid wheat landraces in the Mediterranean basin: taxonomy, evolution and genetic diversity. *PLoS one*, 7(5), e37063.
- Oliveira, H. R., Hagenblad, J., Leino, M. W., Leigh, F. J., Lister, D. L., Peñá-Chocarro, L., & Jones, M. K. (2014). Wheat in the Mediterranean revisited—tetraploid wheat landraces assessed with elite bread wheat Single Nucleotide Polymorphism markers. *BMC genetics*, 15(1), 54.
- Panfili, G., Fratianni, A., & Irano, M. (2004). Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21), 6373-6377.
- Patil, R., Oak, M., Deshpande, A., & Tamhankar, S. (2018). Development of a robust marker for Psy-1 homoeologs and its application in improvement of yellow pigment content in durum wheat. *Molecular Breeding*, 38(11), 136.
- Patil, R. M., Oak, M. D., Tamhankar, S. A., Sourdille, P., & Rao, V. S. (2008). Mapping and validation of a major QTL for yellow pigment content on 7AL in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). *Molecular Breeding*, 21(4), 485-496.
- Peleg, Z., Saranga, Y., Suprunova, T., Ronin, Y., Röder, M. S., Kilian, A., . . . Fahima, T. (2008). High-density genetic map of durum wheat × wild emmer wheat based on SSR and DArT markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(1), 103.
- Peña-Bautista, R., Amaya Celis, A., Rajaram, S., & Mujeeb-Kazi, A. (1990). Variation in quality characteristics associated with some spring 1B/1R translocation wheats.
- Pena, R., & Pfeiffer, W. (2005). Breeding methodologies and strategies for durum wheat quality improvement. *Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies*. Food Product Press. The Haworth Press Inc., New York, 663-772.

- Peng, J. H., Sun, D., & Nevo, E. (2011). Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding*, 28(3), 281.
- Peñuelas, J., & Munné-Bosch, S. (2005). Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in plant science*, 10(4), 166-169.
- Perrino, P., & Porceddu, E. (1990). *Wheat genetic resources in Ethiopia and the Mediterranean region*. Paper presented at the Wheat genetic resources: meeting diverse needs.
- Pirseyyedi, S., Kumar, A., Ghavami, F., Hegstad, J., Mergoum, M., Mazaheri, M., . . . Elias, E. (2018). Mapping QTL for Fusarium head blight resistance in a Tunisian-derived durum wheat population. *Cereal Research Communications*, 1-10.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*, 1(7), 215-222.
- Pozniak, C., Knox, R., Clarke, F., & Clarke, J. (2007). Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(3), 525-537.
- Pritchard, J. K., & Rosenberg, N. A. (1999). Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *The American Journal of Human Genetics*, 65(1), 220-228.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Qaseem, M. F., Qureshi, R., Muqaddasi, Q. H., Shaheen, H., Kousar, R., & Röder, M. S. (2018). Genome-wide association mapping in bread wheat subjected to independent and combined high temperature and drought stress. *PloS one*, 13(6), e0199121.
- Rampino, P., De Pascali, M., De Caroli, M., Luvisi, A., De Bellis, L., Piro, G., & Perrotta, C. (2017). Td4IN2: A drought-responsive durum wheat (*Triticum durum* Desf.) gene coding for a resistance like protein with serine/threonine protein kinase, nucleotide binding site and leucine rich domains. *Plant physiology and biochemistry*, 120, 223-231.
- Rapp, M., Sieber, A., Kazman, E., Leiser, W. L., Würschum, T., & Longin, C. (2019). Evaluation of the genetic architecture and the potential of genomics-assisted breeding of quality traits in two large panels of durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-14.
- Rasheed, A., & Xia, X. (2019). From markers to genome-based breeding in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(3), 767-784.

- Reimer, S., Pozniak, C., Clarke, F., Clarke, J., Somers, D., Knox, R., & Singh, A. (2008). Association mapping of yellow pigment in an elite collection of durum wheat cultivars and breeding lines. *Genome*, *51*(12), 1016-1025.
- Remington, D. L., Thornsberry, J. M., Matsuoka, Y., Wilson, L. M., Whitt, S. R., Doebley, J., . . . Buckler, E. S. (2001). Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(20), 11479-11484.
- Ren, J., Sun, D., Chen, L., You, F., Wang, J., Peng, Y., . . . Peng, J. (2013). Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat. *International journal of molecular sciences*, *14*(4), 7061-7088.
- Reynolds, J., Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, *105*(3), 767-779.
- Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C., Martos-Núñez, V., & Del Moral, L. G. (2003). Durum wheat quality in Mediterranean environments: II. Influence of climatic variables and relationships between quality parameters. *Field Crops Research*, *80*(2), 133-140.
- Robbana, C., Kehel, Z., Sansaloni, C., Bassi, F., & Amri, A. (2019). Genome-Wide Genetic Diversity and Population Structure of Tunisian Durum Wheat Landraces Based on DArTseq Technology. *International journal of molecular sciences*, *20*(6), 1352.
- Rode, J., Ahlemeyer, J., Friedt, W., & Ordon, F. (2012). Identification of marker-trait associations in the German winter barley breeding gene pool (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding*, *30*(2), 831-843.
- Roncallo, P., & Viviana, E. (2014). Identification of molecular markers associated with yield and quality traits for Argentinean durum wheat breeding programs. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*(110), 577-582.
- Roncallo, P. F., Cervigni, G. L., Jensen, C., Miranda, R., Carrera, A. D., Helguera, M., & Echenique, V. (2012). QTL analysis of main and epistatic effects for flour color traits in durum wheat. *Euphytica*, *185*(1), 77-92.
- Roselló, M., Royo, C., Álvaro, F., Villegas, D., Nazco, R., & Soriano, J. M. (2018). Pasta-making quality QTLome from Mediterranean durum wheat landraces. *Frontiers in plant science*, *9*, 1512.
- Rostoks, N., Ramsay, L., MacKenzie, K., Cardle, L., Bhat, P. R., Roose, M. L., . . . Marshall, D. F. (2006). Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(49), 18656-18661.

- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant physiology*, 170(4), 1903-1916.
- Ruiz, M., Giraldo, P., Royo, C., Villegas, D., Aranzana, M. J., & Carrillo, J. M. (2012). Diversity and genetic structure of a collection of Spanish durum wheat landraces. *Crop Science*, 52(5), 2262-2275.
- Sahri, A., Chentoufi, L., Arbaoui, M., Ardisson, M., Belqadi, L., Birouk, A., . . . Muller, M.-H. (2014). Towards a comprehensive characterization of durum wheat landraces in Moroccan traditional agrosystems: analysing genetic diversity in the light of geography, farmers' taxonomy and tetraploid wheat domestication history. *BMC evolutionary biology*, 14(1), 264.
- Sakamura, T. (1918). Kurze Mitteilung ueber die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der Triticum-arten. *Shokubutsugaku Zasshi*, 32(379), 150-153.
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 429.
- Sansaloni, C., Petrolini, C., Jaccoud, D., Carling, J., Detering, F., Grattapaglia, D., & Kilian, A. (2011). *Diversity Arrays Technology (DART) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus*. Paper presented at the BMC proceedings.
- Santra, M., Santra, D., Rao, V., Taware, S., & Tamhankar, S. (2005). Inheritance of  $\beta$ -carotene concentration in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). *Euphytica*, 144(1-2), 215-221.
- Schulthess, A., Matus, I., & Schwember, A. (2013). Genotypic and environmental factors and their interactions determine semolina color of elite genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) grown in different environments of Chile. *Field Crops Research*, 149, 234-244.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 6(2), 461-464.
- Sehgal, D., Vikram, P., Sansaloni, C. P., Ortiz, C., Saint Pierre, C., Payne, T., . . . Wenzl, P. (2015). Exploring and mobilizing the gene bank biodiversity for wheat improvement. *PLoS one*, 10(7), e0132112.
- Seyedimoradi, H., Talebi, R., & Fayaz, F. (2016). Geographical diversity pattern in Iranian landrace durum wheat (*Triticum turgidum*) accessions using start codon targeted polymorphism and conserved DNA-derived polymorphism markers. *Environ Exp Biol*, 14, 63-68.



- Shewry, P. R., & Hey, S. (2015). Do “ancient” wheat species differ from modern bread wheat in their contents of bioactive components? *Journal of Cereal Science*, *65*, 236-243.
- Sieber, A.-N., Longin, C. F. H., & Würschum, T. (2017). Molecular characterization of winter durum wheat (*Triticum durum*) based on a genotyping-by-sequencing approach. *Plant Genetic Resources*, *15*(1), 36-44.
- Singh, A., Reimer, S., Pozniak, C., Clarke, F., Clarke, J., Knox, R., & Singh, A. (2009). Allelic variation at Psy1-A1 and association with yellow pigment in durum wheat grain. *Theoretical and Applied Genetics*, *118*(8), 1539-1548.
- Singh, A. K., Chaurasia, S., Kumar, S., Singh, R., Kumari, J., Yadav, M. C., . . . Jacob, S. R. (2018). Identification, analysis and development of salt responsive candidate gene based SSR markers in wheat. *BMC plant biology*, *18*(1), 249.
- Sohail, Q., Manickavelu, A., & Ban, T. (2015). Genetic diversity analysis of Afghan wheat landraces (*Triticum aestivum*) using DArT markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *62*(8), 1147-1157.
- Solovchenko, A., & Neverov, K. (2017). Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. *Photosynthesis research*, *133*(1-3), 31-47.
- Soltner, D. (1998). Les grandes productions végétales: céréales, plantes sarclées, prairies. Sainte-Gemme-sur-Loire. *Sciences et Techniques Agricoles*.
- Soltner, D. (2005). Les grandes productions végétales. 20eme Edition. *Collection sciences et techniques agricoles*. Bressuire, France.
- Somers, D. J., Banks, T., DePauw, R., Fox, S., Clarke, J., Pozniak, C., & McCartney, C. (2007). Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome*, *50*(6), 557-567.
- Soriano, J. M., Villegas, D., Aranzana, M. J., del Moral, L. F. G., & Royo, C. (2016). Genetic structure of modern durum wheat cultivars and mediterranean landraces matches with their agronomic performance. *PLoS one*, *11*(8), e0160983.
- Soriano, J. M., Villegas, D., Sorrells, M. E., & Royo, C. (2018). Durum wheat landraces from east and west regions of the Mediterranean basin are genetically distinct for yield components and phenology. *Frontiers in plant science*, *9*, 80.
- Sourour, A., Chahine, K., Youssef, T., Olfa, S.-A., & Hajer, S.-A. (2010). Phenotypic diversity of Tunisian durum wheat landraces. *African Crop Science Journal*, *18*(1).

- Sourour, A., & Hajer, S.-A. (2008). Distribution and phenotypic variability aspects of some quantitative traits among durum wheat accessions. *African Crop Science Journal*, 16(4).
- Stemmers, F. J., & Gunderson, K. L. (2007). Whole genome genotyping technologies on the BeadArray™ platform. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(1), 41-49.
- Stich, B., Maurer, H. P., Melchinger, A. E., Frisch, M., Heckenberger, M., van der Voort, J. R., . . . Reif, J. C. (2006). Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers. *Molecular Breeding*, 17(3), 217-226.
- Sukumaran, S., Jarquin, D., Crossa, J., & Reynolds, M. (2018). Genomic-enabled Prediction Accuracies Increased by Modeling Genotype × Environment Interaction in Durum Wheat. *The Plant Genome*.
- Sukumaran, S., Reynolds, M. P., & Sansaloni, C. (2018). Genome-wide association analyses identify QTL hotspots for yield and component traits in durum wheat grown under yield potential, drought, and heat stress environments. *Frontiers in plant science*, 9, 81.
- Sukumaran, S., & Yu, J. (2014). Association mapping of genetic resources: achievements and future perspectives *Genomics of plant genetic resources* (pp. 207-235): Springer.
- Sun, T., Yuan, H., Cao, H., Yazdani, M., Tadmor, Y., & Li, L. (2018). Carotenoid metabolism in plants: the role of plastids. *Molecular plant*, 11(1), 58-74.
- SURGET, A., & BARRON, C. (2005). Histologie du grain de blé. *Industries des céréales*(145), 3-7.
- Tanno, K.-i., & Willcox, G. (2006). How fast was wild wheat domesticated? *Science*, 311(5769), 1886-1886.
- Thomson, M. J., Zhao, K., Wright, M., McNally, K. L., Rey, J., Tung, C.-W., . . . McClung, A. (2012). High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping for breeding applications in rice using the BeadXpress platform. *Molecular Breeding*, 29(4), 875-886.
- Trebbi, D., Maccaferri, M., de Heer, P., Sørensen, A., Giuliani, S., Salvi, S., . . . Tuberosa, R. (2011). High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123(4), 555-569.
- Troccoli, A., Borrelli, G., De Vita, P., Fares, C., & Di Fonzo, N. (2000). Mini review: durum wheat quality: a multidisciplinary concept. *Journal of Cereal Science*, 32(2), 99-113.
- Turki, N., Shehzad, T., Harrabi, M., & Okuno, K. (2015). Detection of QTLs associated with salinity tolerance in durum wheat based on association analysis. *Euphytica*, 201(1), 29-41.

- Valdisser, P. A., Pereira, W. J., Almeida Filho, J. E., Müller, B. S., Coelho, G. R., de Menezes, I. P., . . . Coelho, A. S. (2017). In-depth genome characterization of a Brazilian common bean core collection using DArTseq high-density SNP genotyping. *BMC genomics*, *18*(1), 423.
- Van Hung, P., & Hatcher, D. W. (2011). Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) quantification of carotenoids in durum wheat: Influence of genotype and environment in relation to the colour of yellow alkaline noodles (YAN). *Food Chemistry*, *125*(4), 1510-1516.
- Vavilov, N. I. (1951). *The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants* (Vol. 72): LWW.
- Von Linne, C. (1800). *Species plantarum*.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., . . . Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, *23*(21), 4407-4414.
- Wardlaw, I., & Moncur, L. (1995). The response of wheat to high temperature following anthesis. I. The rate and duration of kernel filling. *Functional Plant Biology*, *22*(3), 391-397.
- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., & Kilian, A. (2004). Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(26), 9915-9920.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, *18*(22), 6531-6535.
- Wright, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*, *56*(645), 330-338.
- Ya, N., Raveendar, S., Bayarsukh, N., Ya, M., Lee, J.-R., Lee, K.-J., . . . Lee, G.-A. (2017). Genetic diversity and population structure of mongolian wheat based on SSR markers: implications for conservation and management. *Plant Breeding and Biotechnology*, *5*(3), 213-220.
- Yang, X., Ren, R., Ray, R., Xu, J., Li, P., Zhang, M., . . . Kilian, A. (2016). Genetic diversity and population structure of core watermelon (*Citrullus lanatus*) genotypes using DArTseq-based SNPs. *Plant Genetic Resources*, *14*(3), 226-233.
- Yu, J., & Buckler, E. S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current opinion in biotechnology*, *17*(2), 155-160.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Bi, I. V., Yamasaki, M., Doebley, J. F., . . . Holland, J. B. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature genetics*, *38*(2), 203.

- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, *14*(6), 415-421.
- Zhai, S., Xia, X., & He, Z. (2016). Carotenoids in staple cereals: metabolism, regulation, and genetic manipulation. *Frontiers in plant science*, *7*, 1197.
- Zhang, W., Chao, S., Manthey, F., Chicaiza, O., Brevis, J., Echenique, V., & Dubcovsky, J. (2008). QTL analysis of pasta quality using a composite microsatellite and SNP map of durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *117*(8), 1361-1377.
- Zhang, W., & Dubcovsky, J. (2008). Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theoretical and Applied Genetics*, *116*(5), 635-645.
- Zhao, H., Nettleton, D., Soller, M., & Dekkers, J. (2005). Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genetics Research*, *86*(1), 77-87.
- Zhao, K., Aranzana, M. J., Kim, S., Lister, C., Shindo, C., Tang, C., . . . Marjoram, P. (2007). An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PLoS genetics*, *3*(1), e4.
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*: Oxford University Press on Demand.