

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes

Master en Sciences et Techniques Spécialité : Microbiologie Appliquée et Génie Biologique



Présenté par :

Mme Guenzaouz Habiba Soukaina

Titre :

Evaluation de la diversité phénotypique, moléculaire et test de toxicité vis à vis de l'EMS sur l'orge (*Hordeum vulgare* L.)

Encadrée par :

Pr A. Ouarzane : FST- Mohammedia

Dr S. Udupa : ICARDA- Rabat

Dr D. Iraqi : INRA- Rabat

Soutenu publiquement le 25 Juin 2018 devant le jury composé de

Pr A. Ouarzane : Professeur de l'Enseignement Supérieur-FSTM - Encadrante

Pr M. Azeqour : Professeur de l'Enseignement Supérieur-FSTM - Examineur

Pr MM. Ennaji : Professeur de l'Enseignement Supérieur-FSTM - Examineur

Pr H. Bessi : Professeur de l'Enseignement Supérieur-FSTM – Examineur

2017 - 2018

Remerciements

Je remercie Dieu, pour sa Bonté et sa bénédiction, les quelles ont été d'un soutien moral et une source d'inspiration et de lucidité pour l'accomplissement de mon travail.

Aussi mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux à toutes et à tous ceux qui m'ont aidé dans mon travail, m'ont soutenu et encouragé au cours de sa réalisation,

mon respect et ma gratitude envers :

Monsieur le doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, pour m'avoir permis de suivre ma formation.

Mon tuteur : Docteur UDUPA Sripada, chercheur en biotechnologie et génétique à ICARDA, pour m'avoir intégré rapidement au sein du centre et m'avoir accordé toute sa confiance ; pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de cette période, sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

Mon encadrant : Madame OUARZANE Aicha, Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de Mohammedia, pour sa clairvoyance, soutien, assistance, son sens de responsabilité et niveau aiguisé d'encadrement scientifique qui ont été d'un apport considérable dans mon approche du sujet et son traitement. Je ne vous remercierais jamais assez Madame.

Docteur : HENKRAR Fatima, chercheuse en physiologie et biotechnologie végétale à ICARDA, pour m'avoir soutenu, tout le long de ce travail qui lui est, également, dédié.

Les membres de jury : Professeur AZEQOUR, professeur ENNAJI, professeur BESSI, enseignants chercheurs à la Faculté des Sciences et Technique de Mohammedia, pour le temps consacré pour examiner ce modeste travail.

Mes remerciements vont aussi à tout le staff pédagogique et administratif de notre Département, également à ICARDA, INRA Maroc, FAO/ITPGRFA, l'Union Européenne, la CRP-Blé et du Programme de subventions de collaboration ICARDA-Maroc pour leur soutien et leur support financier.

Résumé

L'étude des accessions d'orge du Maroc et de la Tunisie, au niveau morphologique et moléculaire sera utile pour comprendre leur diversité génétique, afin de gérer leur conservation et leur utilisation efficace dans les programmes d'amélioration.

Dans ce contexte, un total de 24 accessions d'orge provenant du Maroc et de la Tunisie ont été étudiées en utilisant 13 marqueurs SSR.

Un totale de 81 bandes a été révélé, dont 56 allèles pour les accessions marocaines et 58 allèles pour les accessions tunisiennes. Le nombre maximal de bandes amplifiées est révélé par les amorces Bmac0067 et Bmac0181. Alors que le nombre minimal de bandes amplifiées est révélé par les amorces Bmac0093 et Bmac0209.

Les 24 accessions d'orge ont été groupées dans quatre classes selon une classification ascendante hiérarchique, chaque groupe a été caractérisé par la même origine écogéographique, à l'exception du deuxième groupe qui a été constitué de 4 accessions tunisiennes et une marocaine.

Les distances génétiques ont montré la variation à la fois dans la variété marocaine et dans la variété tunisienne, ce qui signifie qu'il y a beaucoup de génotypes d'orge différents et largement distribués dans ces deux pays.

Le cultivar d'orge à six rangs « Rabat071 » a été utilisé pour développer une population mutante. La réponse au traitement avec le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) a dû être déterminée en premier, car la sensibilité génotypique de « Rabat071 » à la mutagenèse chimique était inconnue. Sur la base des expériences antérieures avec la mutagenèse par EMS sur l'orge, deux concentrations d'EMS 0.6% (60 mM) et 0,8% (80 mM) ont été appliquées. La tolérance de 'Rabat071' à la toxicité par l'EMS 0,6% a été acceptable avec un taux de germination de 39,5% dont 26,1% de ces plantes ont pu survivre et atteindre la maturité.

Mots clés : Orge (*Hordeum vulgare*), polymorphisme, Marqueur moléculaire, SSR, Mutation, EMS.

Abstract

The study of barley accessions from Morocco and Tunisia at the morphological and molecular level is useful to understand their genetic diversity, to manage their conservation and their effective use in breeding programs.

In this context, a total of 24 barley accessions from Morocco and Tunisia using 13 SSR markers were analyzed in this study.

A total of 81 amplified bands were noted, including 56 alleles for Moroccan accessions and 58 alleles for Tunisian accessions. The maximum number of amplified bands was found by primers Bmac0067 and Bmac0181, and the minimum number of amplified bands was found by primers Bmac0093 and Bmac0209.

The 24 barley accessions were grouped into four classes according to an ascending hierarchical classification, each group was characterized by the same ecogeographical origin, with the exception of the second group which consisted of 4 Tunisian accessions and one Moroccan.

Genetic distances showed variation in both the Moroccan variety and the Tunisian variety, which means that there are many different barley genotypes widely distributed in these two countries.

The six-row Rabat071 barley cultivar was used to develop a mutant population. The response to treatment with ethyl methanesulfonate (EMS) had to be determined first, as the genotypic sensitivity of Rabat071 to chemical mutagenesis was unknown. Based on previous experiments with EMS mutagenesis on barley, two concentrations of EMS 0.6% (60 mM) and 0.8% (80 mM) were applied. The tolerance of 'Rabat071' to the toxicity by the EMS 0.6% was acceptable with a germination rate of 39.5% of which 26.1% of these plants could survive and reach maturity.

Key words: Barley (*Hordeum vulgare*), Polymorphism, Molecular marker, SSR, Mutation, EMS.

Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction _____ 1

I- Généralités sur l'orge _____ 3

1) Caractères taxonomiques et morphologiques _____ 3

a) Caractères taxonomiques _____ 3

b) Caractères morphologiques _____ 4

2) Développement et reproduction chez l'orge _____ 5

3) Pathologie de l'orge _____ 7

4) Aspects socioéconomiques _____ 8

4.1. Production mondiale et importance économique _____ 8

4.2. L'importance économique de l'orge au Maroc _____ 8

4.3. L'importance nutritionnelle de l'orge _____ 9

4.4. Différentes utilisations de l'orge au Maroc _____ 10

4.5. Historique du programme d'amélioration de l'orge au Maroc _____ 10

II- La diversité génétique _____ 12

1) Polymorphisme phénotypique _____ 12

2) Polymorphisme moléculaire _____ 13

2.1) Caractéristiques des principaux types de marqueurs moléculaires employés chez l'orge 13

a) Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction _____ 13

b) L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe _____ 14

c) Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés _____ 14

d) Les microsatellites _____ 15

e) Le polymorphisme nucléotidique _____ 16

2.2) Comparaison des marqueurs moléculaires employés chez l'orge _____ 17

III- La mutagenèse végétale _____ 18

1) Les agents mutagènes _____ 18

1-1. Mutation physique _____ 19

1-2. Mutation chimique _____ 19

a) Le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) _____ 20

b) Mécanisme d'action d'EMS _____ 20

c) Paramètres du traitement	20
I. Analyse phénotypique	24
1. Matériel végétal	24
2. Analyse des caractères agro-morphologiques	26
3. Analyse statistique	26
II. Analyse génotypique	26
1. Méthodes	26
1-1. Extraction d'ADN	26
1-2. Test qualité	27
a. Electrophorèse sur gel d'agarose 1.2%	27
b. Dosage spectrophotométrique	28
1-3. Amplification d'ADN par PCR	29
1-4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%	31
1-5. Analyse des données	31
III. Mutation chimique	32
1. Méthode de mutagenèse	32
2. Rendement de la G1	34
a. Observation phénotypique	34
I. Evaluation du polymorphisme phénotypique	36
1. Analyse des caractères agro-morphologiques	36
2. Analyse des données	37
II. Evaluation du polymorphisme moléculaire	39
1. Test qualité	39
a. Electrophorèse sur gel d'agarose 1.2%	39
b. Dosage spectrophotométrique	40
2. Amplification par PCR	41
a. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%	41
b. Distance génétique et classification hiérarchique	43
III. Mutation chimique	45
1. Observation phénotypique	45
Discussion :	49
Conclusion.....	53

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1: Distinction entre l'orge à deux rangs et l'escourgeon (Simon et al, 1989).	4
Figure 2: Evolution de la superficie (en million d'ha), la production (en million de t) et les rendements (en hg/ha) de la culture d'orge pendant les deux dernières décennies (FAO,2018).....	9
Figure 4: Observation phénotypique des stades de développement d'orge : a) stade d'épiaison, b) stade de floraison, c) stade d'anthèse, d) stade de remplissage de grain, e) stade de maturité.....	36
Figure 5: Matrice des distances génétique (phénotype).	38
Figure 6: Dendrogramme montrant la relation phénotypique entre les 24 accessions d'orge marocaines et tunisiennes	39
Figure 7: Profil électrophorétique du test qualité des 24 accessions d'orge sur gel d'agarose 1.2%. ...	40
Figure 8: Profil du test qualité d'une accession d'orge par spectrophotométrie	40
Figure 9: Profils électrophorétiques de certains marqueurs microsatellites parmi les 13 marqueurs utilisés sur gel de polyacrylamide dénaturé à 6%.....	41
Figure 10: Matrice de similarité (génotype).	43
Figure 11: Dendrogramme montrant la relation génétique entre 24 accessions d'orges Marocaines et Tunisiennes.....	44
Figure 12: Absence d'apparition d'anthère à l'extérieur de l'orge mutée	46
Figure 13: Histogramme de comparaison des stades de développement de l'orge et l'orge muté	46
Figure 14: Comparaison de la germination entre le contrôle, traitement EMS 0,6% et EMS 0,8%	47
Figure 15: Réduction de la longueur d'orge mutée.....	47
Figure 16: Histogramme de comparaison des caractéristiques agro-morphologiques d'orge et d'orge muté.	48

Liste des tableaux

Tableau 1: Différents stades de développement de l'orge (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Source : I.T.C.F., 1983 in Aït-Rachid, 1991	6
Tableau 2: Principales maladies fongiques de l'orge recensées au Maroc (Sayoud et al, 1999).	7
Tableau 3: Production mondiale d'orge de 2005 à 2010 (FAO, 2010).....	8
Tableau 4: Comparaison des cinq marqueurs moléculaires les plus utilisés chez l'orge	17
Tableau 5: 11 accessions marocaines utilisées dans l'analyse phénotypique et génotypique	24
Tableau 6: 13 accessions tunisiennes utilisées dans l'analyse phénotypique et génotypique	25
Tableau 7: Réactifs de la PCR	29
Tableau 8: Les marqueurs moléculaires SSR utilisés dans la détermination de la diversité génétique	30
Tableau 9: Mesure statistiques des stades de développement d'orge	37
Tableau 10: Liste des 13 amorces SSR utilisées, nombre d'allèle (NA), leur température d'hybridation (T _m), taille des bandes, l'indice de diversité (ID) et contenu de l'information polymorphe (PIC)	42
Tableau 11: Les accessions d'orge les plus éloignées	45
Tableau 12: Les mesures des composantes du rendement d'orge et d'orge muté.....	48

Liste des annexes

- Annexe1** : Solutions pour extraction d'ADN
- Annexe 2** : Solutions pour préparation des gels
- Annexe 3** : Produits nécessaire pour la PCR
- Annexe 4** : Solutions pour coloration des gels
- Annexe 5** : Marqueur de taille
- Annexe 6** : Résultats du test quantitatif et qualitatif d'ADN par Nanodrop2000
- Annexe 7** : Tableau des observations phénotypiques

Liste des abréviations

ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
AFLP	:	Amplified Fragment-Length Polymorphism
APS	:	Persulfate d'Ammonium
BET	:	Bromure d'Ethidium
BYDV	:	Barley Yellow Dwarf Virus
CA	:	Classification Hiérarchique
CIMMT	:	Centre International d'Amélioration de Maïs et du Blé
CTAB	:	CetylTrimethylAmmonium bBromide
dNTPs	:	DeoxyNucleotide TriPhosphates
DS	:	DéviatiOn Standard
EDTA	:	ÉthylèneDiamineTétraAcétique
EMS	:	Ethyl methanesulfonate
Hg/ha	:	Hectogramme / Hectare
IAEA	:	International Atomic Energy Agency
ICARDA	:	Centre International de Recherche Agricole dans les zones Arides
ID	:	Indice de Diversité
INRA	:	Institut National de la Recherche Agronomique
ITCF	:	Institut Technique des Céréales et des Fourrages
M	:	Moyenne
mA	:	Milliampère
MAPMDREF	:	Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts
mL	:	Millilitre
mM	:	Millimole
NA	:	Nombre d'Allèle
NaCl	:	Chlorure de sodium
NaClO	:	Hypochlorite de sodium

NaOH	:	Hydroxyde de sodium
NG/E	:	Nombre de Grain par Epis
NJ	:	Neighbour-joining
Pb	:	Paire de base
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
pH	:	Potentiel Hydrogène
PIC	:	Contenu de l'information Polymorphe
PVP	:	PolyVinylPyrrolidone
RAPD	:	Random Amplified Polymorphic DNA
Réf	:	Référence
SNP	:	Single Nucleotide Polymorphis
SSR	:	Simple Sequence Repeat
TBE		Tris- Boric acid- ÉthylèneDiamineTétraAcétique
TEMED	:	TétraMéthylEthylèneDiamine
T_m	:	Température d'hybridation
TRIS-HCL	:	Trishydroxyméthylaminométhane
UPGMA	:	Unweighted Pair Group Method
UV	:	Ultraviolet
USDA	:	United States Department of Agriculture
V	:	Volte
µL	:	Microlitre

INTRODUCTION

Introduction

L'orge (*Hordeum vulgare* L.), compte parmi les espèces les plus cultivées dans le monde. C'est une espèce diploïde autogame avec 14 chromosomes. L'orge est une culture adaptable populaire. Il est plus tolérant au sel et est relativement tolérant à la sécheresse. Il a donc le potentiel de relever le défi du changement climatique de 2151 siècles.

L'importance économique des céréales telles que l'orge et la demande d'amélioration du rendement et de la qualité exigent une meilleure compréhension des composantes génétiques qui modulent les caractères biologiquement et commercialement pertinents. L'orge est à la fois une culture et un système modèle pour la recherche scientifique, et elle est de plus en plus utilisée pour des recherches génétiques et moléculaires sur les processus biologiques conservés des céréales. Un défi commun dans les études génétiques chez les plantes à grands génomes provient du travail très long d'associer des phénotypes mutants à des informations sur la séquence du gène, surtout si la mutagenèse par insertion n'est pas systématique, comme dans l'orge. La génétique inverse basée sur la mutagenèse chimique représente la meilleure solution à cet obstacle.

L'efficacité mutagénique de certains composés alkylants a été mise en évidence chez les plantes supérieures. Le méthane sulfonate d'éthyle (EMS) a retenu, en ordre principal, l'attention de nombreux chercheurs. La potentialité mutagénique du composé, alliée à sa toxicité peu marquée, en fait un outil de choix dans un travail de mutagenèse. Son action s'étend également au domaine animal et aux microorganismes.

Pour l'utilisation rationnelle des ressources génétiques, l'information sur la diversité génétique est essentielle. Les techniques moléculaires ont été développées pour l'analyse génétique et la compréhension de la structure et comportement du génome. Ces techniques moléculaires, en particulier l'utilisation de marqueurs moléculaires qui ont été utilisées dans le domaine de la variation génétique. L'amélioration des systèmes de détection des marqueurs et des techniques ont permis de grandes avancées ces dernières années.

Des marqueurs de microsatellites ou de répétitions de séquences simples (SSR) ont été développés plus récemment pour les principales plantes cultivées. Les microsatellites ont été appliqués avec succès pour la détection de la diversité génétique (Donini et al., 1998, Korzun et al., 2001), la cartographie du génome (Korzun et al., 1997) et la différenciation génotypique (Donini et al., 1998; Virk et al., 1999). Ils sont abondants, dispersés dans tout le génome et présentent des niveaux de polymorphisme plus élevés que les autres marqueurs génétiques.

Les marqueurs SSR présentent de nombreux avantages pour les études génétiques par rapport à d'autres marqueurs. En outre, ils sont répartis sur le génome et ne nécessitent que de petites quantités d'ADN génomique pour l'analyse. Ces caractéristiques couplées à leur facilité de détection en ont fait des marqueurs moléculaires utiles. Les marqueurs microsatellites ont été développés dans de nombreuses espèces végétales, telles que le soja, le blé, le maïs, l'orge, le riz et la pomme de terre.

Dans le cadre de contribuer à l'amélioration des variétés d'orge, une étude de la diversité par l'utilisation des marqueurs microsatellites, de 24 accessions d'orge provenant du Maroc et de la Tunisie a été menée au cours de ce travail par l'utilisation des marqueurs microsatellites. Les principaux objectifs du présent travail étaient :

1. Evaluer la diversité des accessions marocaines et tunisiennes d'orge par différentes approches, phénotypiques et moléculaires, pour comprendre les différences et les similitudes qui existent entre elles. Elle permettrait également le choix le plus adéquat des accessions génétiquement éloignées et complémentaires pour la réalisation des croisements de départ, dans les programmes d'amélioration variétale.
2. Evaluer la tolérance de l'accession « Rabat071 » contre la toxicité de l'EMS en comparant la forme relative en fonction de la concentration de l'EMS appliquée.

CHAPITRE I :
REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I- Généralités sur l'orge

1) Caractères taxonomiques et morphologiques

a) Caractères taxonomiques

L'orge est une monocotylédone appartenant à l'ordre des Poales, à la famille des Poacées (Graminées) et au genre *Hordeum* (Linné, 1753). Sa classification est basée sur la fertilité des épillets latéraux, la densité de l'épi et la présence ou l'absence des barbes (Linné, 1753).

Le genre *Hordeum* comprend 32 espèces. Les hybrides issus de croisements de *Hordeum vulgare* avec d'autres espèces de *Hordeum* sont stériles ou présentent des anomalies (Von Bothmer et al, 1995). L'orge sauvage a été classée comme subsp. *spontaneum* (C.Koch) Thell. (synonyme : *H. spontaneum* C.Koch), répartie en Afrique du Nord, à l'Est de la Méditerranée et en Asie occidentale ; les types cultivés ont été classés dans la subsp. *vulgare* (Ceccarelli et Grando, 1996).

L'orge cultivée (*H. vulgare*), est généralement une plante diploïde ($2n=14$) et nettement autogame (Jestin, 1996). Des formes tétraploïdes ($2n=28$) peuvent apparaître spontanément, ou par traitement au laboratoire, mais elles n'ont aucun intérêt agronomique. La variabilité de l'orge cultivée est immense, avec des milliers de variétés-populations et des centaines de cultivars. Les cultivars se différencient selon le nombre de rangs de grains (2 ou 6), l'aspect des épis (lâche ou compact), ou la présence ou l'absence d'arêtes sur les lemmes. Tous les types sauvages possèdent des épis à deux rangs, ce qui signifie que sur les 3 épillets situés à chaque nœud, les deux latéraux sont stériles et seul celui du milieu forme une graine. La domestication a donné naissance à des types à 6 rangs où chacun des 3 épillets produit des grains (Ceccarelli et Grando, 1996).

Les variétés d'orge sont regroupées d'après les caractéristiques de leurs épis en deux grandes espèces (Figure 1) :

- **L'orge à deux rangs** qui comporte un épi aplati composé de deux rangées d'épillets ; il n'existe en général dans cette espèce que des variétés de printemps.
- **L'orge à six rangs ou escourgeon** qui possède trois épillets sur chaque axe de la tige et dont les grains sont plus petits. Cette espèce ne comporte pratiquement que des variétés d'hiver.

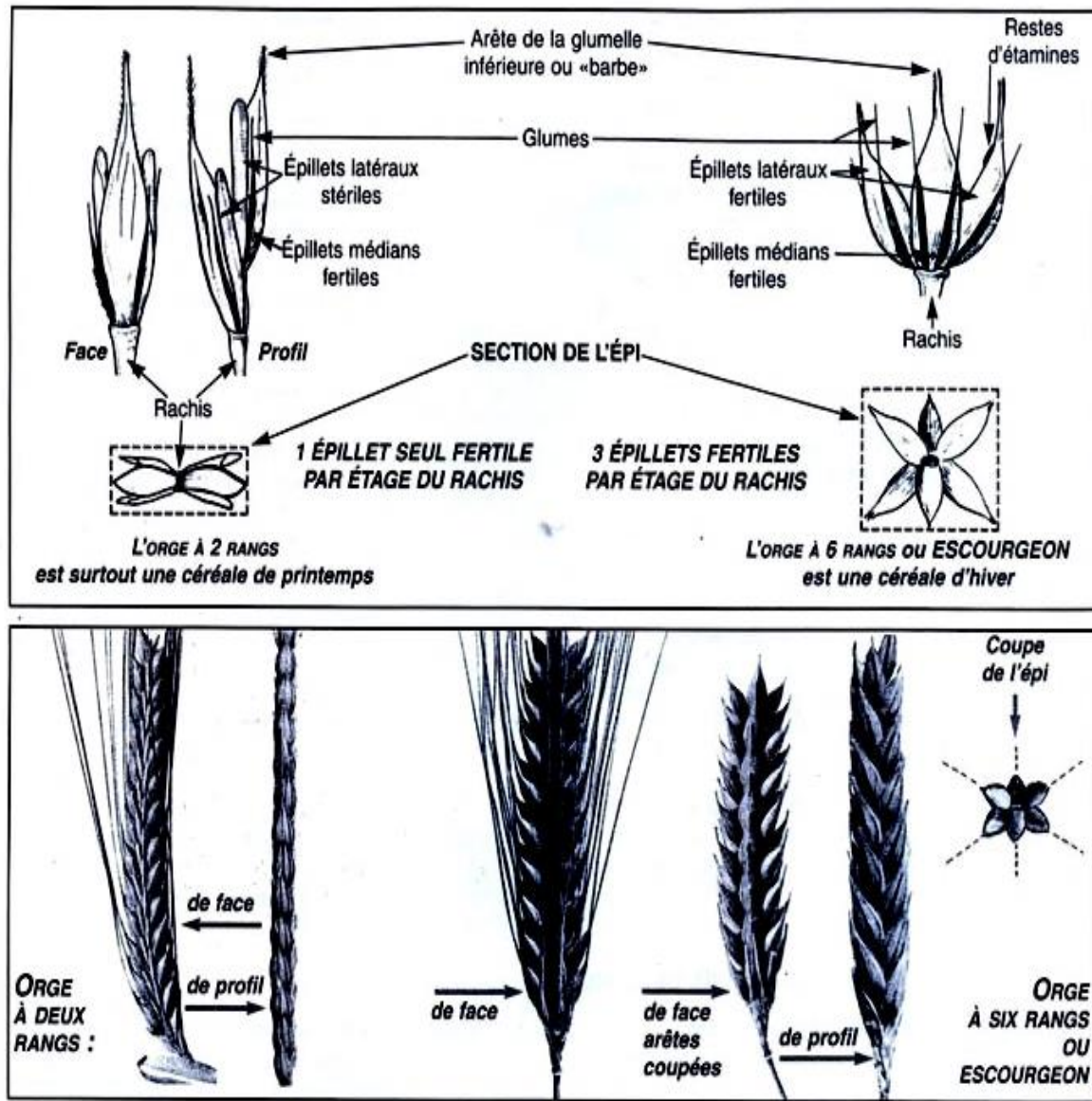


Figure 1: Distinction entre l'orge à deux rangs et l'escourgeon (Simon et al, 1989).

b) Caractères morphologiques

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une plante annuelle, autofécondée très semblable au blé dans la morphologie de ses organes végétatifs et floraux. Au stade herbacé, elle se distingue principalement des autres céréales par un feuillage vert clair, la présence d'une ligule très développée, des oreillettes glabres, et un fort tallage herbacé (Boulal et al, 2007).

L'appareil racinaire fasciculé est peu développé. Deux systèmes se forment au cours du développement : un système primaire et un système secondaire, le premier ou système de racines séminales fonctionne de la germination à la ramification de la plantule (tallage). Les racines séminales ne restent pas longtemps fonctionnelles et sont remplacées par un système

de racines adventices qui assureront la nutrition et le développement de la plante (Simon et al, 1989).

La plante a une tige cylindrique et creuse, entrecoupée de nœuds là où se forment les feuilles (Gomez- Macpherson, 2001). Ces dernières sont à nervures parallèles et formées de deux parties : la partie inférieure entourant la jeune pousse ou la tige (la gaine), la partie supérieure en forme de lame (le limbe) (Belaid, 1986).

L'appareil reproducteur formé de fleurs groupées en inflorescences, constitue un ensemble d'unités appelées épillets. Chez l'orge, l'épi est constitué d'un axe (rachis) sur lequel sont fixés les épillets (Gomez- Macpherson, 2001).

Le grain est un caryopse à glumelles adhérentes chez les variétés cultivées. Une coupe transversale du grain, montre les mêmes assises de cellules que chez le blé, cependant l'assise à aleurone comporte trois couches de cellules au lieu d'une seule (Clement-Grandcourt et Prats, 1971).

2) Développement et reproduction chez l'orge

Sur le tableau 1, les différents stades de développement de l'orge sont indiqués.

Selon Jestin (1992), les caractéristiques de végétation et de reproduction de l'orge sont voisines de celles du blé ; les différences les plus marquées concernent :

- Une propension plus forte au tallage, avec une paille souvent plus fragile
- Un cycle semi maturité souvent plus court
- Une capacité de survie au froid n'atteignant généralement pas celle des blés ou des seigles. Soltner (1988), ajoute d'autres différences, comme :
- Les exigences en eau sont légèrement plus réduites et surtout importantes au début de la végétation
- L'orge tire parti de sols légers et calcaires mieux que le blé

Hormis le besoin éventuel en vernalisation, l'orge est une espèce dite « de jours longs » (Jestin, 1992).

Selon le génotype, les orges ont des besoins nuls (orges de printemps) ou variables (orges dites d'hiver ou d'automne) de froid vernalisant pour pouvoir passer convenablement de leur phase végétative à la phase de reproduction.

Tableau 1: Différents stades de développement de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) Source : I.T.C.F., 1983 in Aït-Rachid, 1991

Stade		Echelle de Feeks	Caractéristiques
	Levée	1	1 ^{ère} feuille perce le coléoptile 3 feuilles
	Début tallage	2	Formation de la 1 ^{ère} talle
	Plein tallage	3	2 à 3 talles
	Fin tallage	4	
	Epi à 1 cm	5	Sommet de l'épi distant de 1 cm du plateau de tallage
	1 à 2 nœuds	6	01 nœud élongation de la tige
		7	2 nœuds
	Gonflement	8	Apparition de la feuille
	L'épi gonfle	9	Ligule juste visible
	La gaine de la dernière feuille	10	Gaine de la dernière feuille sortie
	Epiaison	10 – 1	Sortie des barbes
		10 – 2	¼ épiaison
		10 – 3	½ épiaison
		10 – 4	¾ épiaison
		10 – 5	Tous les épis sortis
	Formation du grain	11 – 1	Grain laiteux
		11 – 2	Grain pâteux
		11 – 3	Grain dur
		11 – 4	Grain mûr

3) Pathologie de l'orge

L'orge, tout comme la plupart des céréales peut être attaquée par des agents phytopathogènes d'origine fongique, bactérienne et virale qui provoquent d'importantes maladies (Sayoud et al,1999). Les principales maladies de l'orge sont regroupées dans le tableau 2.

Tableau 2: Principales maladies fongiques de l'orge recensées au Maroc (Sayoud et al, 1999).

Maladies (agent pathogène)	Organes touchés	Symptômes	Moyens de lutte
Oidium (<i>Erysiphe graminis</i> f.hordei)	Graines Feuilles Glumes	Coloration jaune de feuilles qui se recouvrent par la suite d'un feutrage blanc	Désinfection des semences avec fongicide systémique.
Charbon couvert de l'orge (<i>Ustilago hordei</i>)	L'épi	Les glumes des épis ne sont pas entièrement détruites	Rotation des cultures. Traitement de semences.
Charbon nu de l'orge (<i>Ustilago nuda</i>)	L'épi	Les épis sont totalement détruits	Désinfection avec fongicide systémique.
Rhynchosporiose (<i>Rhynchosporium</i> <i>secalis</i>)	Feuilles, Tiges	Taches assez irrégulières bordées de couleur brunâtre et sèche au centre	Variétés résistantes Traitement fongicide en végétation.
Rayure réticulée (<i>Pyrenophora teres</i>)	Feuilles	Taches en réseau de stries longitudinales formant des rayures brunes foncées, entourées de zones chlorotiques.	Variétés résistantes
Strie foliaire (<i>Pyrenophora</i> <i>graminea</i>)	Feuilles	Stries longitudinales jaunes pâles parallèles aux nervures.	Variétés résistantes
Rouille brune (<i>Puccinia hordei</i>)	Feuilles et tiges	Pustules brunes sur feuilles devenant noires par la présence des téléospores	Traitement fongicide. Variétés résistantes
Rouille jaune (<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei)	Feuilles Epis Tige	Lésions jaune orangé de forme ronde, semblables à des boursofflures qui se réunissent pour former des stries.	Traitement fongicide.

Jaunisse nanisante (Virus BYDV)	Plante entière	Rabougrissement des plantes, jaunissement des feuilles, grains petits, ridés et de mauvaise qualité	Variétés résistantes. Lutte contre les vecteurs (pucerons)
------------------------------------	-------------------	---	--

4) Aspects socioéconomiques

4.1. Production mondiale et importance économique

L'orge (*H. vulgare L.*) figure parmi les sept céréales les plus cultivées au monde. Elle occupe la quatrième position de par sa production après le maïs, le blé tendre et le riz et avant le sorgho, l'avoine et le seigle (FAO, 2012). La production mondiale de l'orge avoisine les 135 millions de tonnes pour une superficie emblavée de près de 57 millions d'hectares. La production de quelques pays producteurs d'orge de l'année 2010/11 est donnée en tableau 3.

Tableau 3: Production mondiale d'orge de 2005 à 2010 (FAO, 2010)

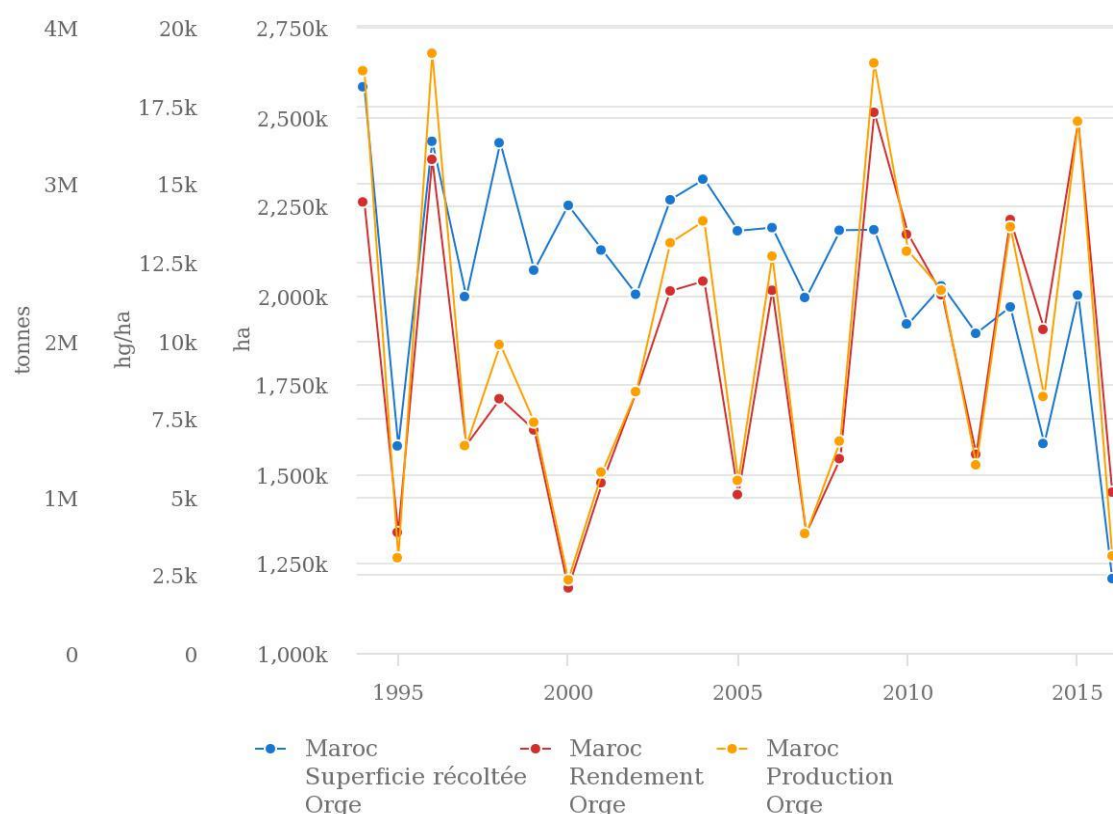
Pays	2005-2006 (Mt)	2006-2007 (Mt)	2007-2008 (Mt)	2008-2009 (Mt)	200-2010 (Mt)
Etats-Unis	54,8	56,2	57,5	65,6	61,5
Russie	15,8	18,1	15,7	23,1	18,0
Ukraine	9,0	11,4	6,0	12,6	12,0
Canada	11,7	9,6	11,0	11,8	9,2
Australie	9,5	4,3	7,2	7,0	7,8
Turquie	7,6	7,8	6,0	5,6	6,0
Autres	27,8	29,4	29,6	28,2	32,8
Production	136,2	136,5	133,0	153,9	147,3

Les Etats-Unis, avec 61,5 millions de tonnes, se distingue par la plus grande production en orge, en 2010, plus de 60 millions de tonnes soit l'équivalent de 41,75% de la production mondiale. La Russie, l'Ukraine et le Canada viennent en seconde position pour les productions.

4.2. L'importance économique de l'orge au Maroc

La production nationale céréalière au Maroc est caractérisée par une irrégularité en raison des aléas climatiques qui conditionnent plus de 90% de la superficie céréalière. La production de l'orge, à son tour, n'échappe pas à cette règle. En effet, cette production a enregistré un record national de 38 millions de quintaux au cours de la campagne suivante (Figure 2). La production moyenne d'orge, au cours de la dernière décennie est de 21 millions de quintaux, niveau comparable à celui des années 70 (ONICL, 1999). Dans la structure de la

production céréalière, l'orge représente actuellement 37% alors qu'elle est étai de 48% au cours des années 70. Toutefois, les fluctuations inter annuelles de la production sont beaucoup plus importantes ces dernières années. Les rendements de l'orge sont stagnés depuis des décennies, malgré les travaux d'améliorations réalisés dans ce domaine (Saïdi et al, 2001).



Source: FAOSTAT (mai 24, 2018)

Figure 2: Evolution de la superficie (en million d'ha), la production (en million de t) et les rendements (en hg/ha) de la culture d'orge pendant les deux dernières décennies (FAO, 2018)

4.3. L'importance nutritionnelle de l'orge

La composition chimique de l'orge pour 100 g de partie comestible est la suivante : 9,4 g eau, 354 kcal d'énergie, 12,5 g de protéines, 2,3 g de lipides, 73,5 g de glucides, 17,3 g de fibres alimentaires, 33 mg de Ca, 133 mg de Mg, 264 mg de P, 3,6 mg Fe, 2,8 mg de Zn, 22 UI de vitamine A, 0,65 mg de thiamine, 0,29 mg de riboflavine, 4,6 mg de niacine, 0,32 mg de vitamine B6. (USDA, 2004).

L'orge contient huit acides aminés essentiels (tryptophane, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine, leucine et isoleucine). Ses principaux acides gras sont : l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide oléique (USDA, 2004).

Par ailleurs, l'orge est riche en fibres solubles, dont la consommation peut contribuer à une normalisation des concentrations sanguines de cholestérol, de glucose et d'insuline (McIntosh et al, 1991). Cette céréale contient des tocotriénols, une forme de vitamine E particulièrement bénéfique (Ceccarelli et Grando, 1996). L'orge est également fortifiante, régénératrice, bénéfique pour le système respiratoire, et anti-diarrhéique. En tisane, elle est utilisée pour soulager la toux.

4.4. Différentes utilisations de l'orge au Maroc

L'orge a de multiples utilisations en alimentation humaine et animale. Celle-ci commence par le déprimage par les animaux pendant la période de décembre jusqu'à février. La paille d'orge est fortement appréciée par les agriculteurs et contribue de manière significative à l'alimentation du bétail. L'utilisation des grains d'orge est répartie entre 80% de la production pour alimenter les animaux et 20% pour la nutrition humaine. Celle-ci peut chuter selon les années à 14% (Belhadfa et al, 1992). La contribution annuelle des grains d'orge dans l'alimentation animale est estimée à 15 millions de quintaux en moyenne (Sekkat et Laghzali, 1997).

Le Maroc est au premier rang mondial dans l'utilisation d'orge dans la nutrition humaine (FAO, 1990). En effet, la consommation moyenne d'orge par habitant est estimée annuellement à 54.8 kg (Belhadfa et al, 1992 ; FAO, 2001). La consommation humaine d'orge varie avec les saisons et avec les régions. Elle est plus élevée pendant les années de sécheresse. En périodes défavorables, le besoin humain est prioritaire, ce n'est que le reliquat qui est destiné aux animaux. L'orge est principalement employée dans la nourriture humaine, dans les régions de montagnes et méridionale du pays, surtout en zones rurales. Récemment, un regain d'intérêt d'orge pour la nutrition humaine a été noté dans les villes, ce qui s'est traduit par l'apparition de quelques unités de transformation (orgeries). Une petite quantité d'orge, produite sous contrat avec les agriculteurs, a été employée pour produire le malte jusqu'à 1985, depuis le secteur de brasserie s'est tourné vers l'importation du malte.

4.5. Historique du programme d'amélioration de l'orge au Maroc

Les premiers travaux de sélection des variétés d'orge ont débuté dès les années 1920. Le programme, jadis mis en place, a visé l'amélioration des orges locales et l'introduction des variétés étrangères à deux rangs. Parmi une centaine de variétés originaires d'Europe, d'Amérique et d'Australie, une dizaine ont été sélectionnées, parmi lesquelles **Chevalier**, **Hannchen**, **Combesse**, **Guldkorn**, **Princesse** et **Prior** (Grillot, 1939). La sélection dans les

orges locales a permis d'identifier deux lignées intéressantes **077** et **071**. La variété **077**, nommée plus tard **Rabat 77**, est de précocité moyenne de 180 jours à Rabat. Elle est caractérisée par des graines jaunes de grande taille (3.5 à 5mm), d'un poids spécifique de plus de 60 kg/hl et de teneur moyenne de 12.5 % de protéines. Sa composition chimique justifie l'intérêt que les brasseries portent à cette variété. La variété **071**, connue par la suite de **Merzagua 71**, est de même durée de cycle, mais plus productive que **077** dans le littoral atlantique. Ces deux variétés comparées aux précédentes, ont été nettement plus adaptées et plus productives. L'auteur a rapporté que les orges marocaines sont remarquablement adaptées aux conditions écologiques du pays. Quelles que soient les précipitations de l'année, les rendements sont toujours satisfaisants. Leur rusticité, qui n'exclut pas la productivité ni la qualité, provient de leur aptitude à végéter sous le rude climat du Maroc. L'utilisation jusqu'à présent de ces variétés et la disparition des variétés introduites prouvent le bien-fondé de l'utilisation des orges locales.

Par la suite, l'introduction des variétés d'orge à deux et à six rangs est suivie comme fondement de la sélection jusqu'à 1970. Les variétés **Arig 8**, issue du germoplasme italien et d'autres variétés européennes à deux rangs ont été impliquées dans les croisements visant l'amélioration de la qualité brassicole (Amri, 1992). Ce qui est à l'origine de la sélection de plusieurs variétés à deux rangs telles que **Tamelalt**, **Asni**, **Azilal** et autres.

A partir des années 1980, l'introduction des collections d'orge des USA a servi de base pour une autre phase du programme qui avait pour objectif la sélection des variétés précoces et d'indice de récolte élevé. Le germoplasme régénéré pendant cette période a servi dans une nouvelle version du programme de sélection mis en place par l'INRA un peu plus tard (Amri, 1993). La stratégie de sélection suivie repose sur les tests multi locaux pour rechercher les lignées à large adaptation dans les produits de croisements. Les parents impliqués sont issus du matériel génétique introduit des centres internationaux de recherche, particulièrement l'ICARDA. La sélection et l'évaluation du matériel génétique se font dans les stations expérimentales de l'INRA, prises comme zone test du programme, situées dans les zones agro écologiques différentes. Les réactions aux principales maladies (Oïdium, rayure réticulée, la jaunisse nanisante), les principales composantes de rendements et le rendement en grains constituent les critères de sélection utilisés. Une douzaine de variétés de haut rendement potentiel ont été sélectionnées. Malgré leurs performances, les variétés sélectionnées ne représentent pas plus de 5% des superficies emblavées (Saade, 1994).

II- La diversité génétique

La diversité génétique désigne le degré de variation de gène au sein d'une même espèce, elle décrit le niveau de la diversité intra sp et se distingue de la variabilité génétique d'un individu. Ces forces évolutives ont toutes des effets sur l'importance et l'organisation de la variabilité génétique. Les effets de ces forces portent sur l'ampleur et l'organisation du polymorphisme, la mutation augmente la diversité alors que la sélection et la dérive la diminuent. L'utilisation de la diversité génétique dans un programme de sélection passe inévitablement par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. Les marqueurs génétiques sont des caractéristiques héréditaires qui renseignent sur le génotype de l'individu qui les porte (de Vienne, 1998). Trois types sont largement utilisés pour l'évaluation de la variabilité génétique, à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs de l'ADN.

Un bon marqueur doit être à hérédité simple, polymorphe, co-dominant, non épistatique, neutre, et insensible au milieu (Bretting et Widrlechner, 1995; de Vienne, 1998). Les marqueurs moléculaires répondent bien à ces critères et, contrairement aux marqueurs associés à des caractéristiques morphologiques ou biochimiques, révèlent directement les modifications du patrimoine génétique, c'est-à-dire de l'ADN, qu'elles se traduisent ou non par une modification phénotypique. Ce polymorphisme de l'ADN résulte de l'accumulation graduelle de mutations, produisant soit des substitutions nucléotidiques, soit des insertions ou délétions d'une ou plusieurs bases. L'analyse par ces marqueurs peut être réalisée tout au long du développement de la plante. Ces marqueurs ont le potentiel d'exister en nombre illimité, couvrant le génome entier, et ils ne sont pas influencés par l'environnement.

1) Polymorphisme phénotypique

Les caractéristiques phénotypiques constituent un outil incontournable dans la classification et la taxonomie des micro et macro organismes et continue, à nos jours, d'être utilisée (Stuessy, 1990). Elles servent entre autre à repérer d'éventuelle contamination ou encore d'étiquetage ultérieur.

Les caractères morphologiques sont très importants et révèlent de la caractérisation, ils sont généralement quantitatifs et ont un déterminisme mono et polygénique. Toutefois, ils peuvent être influencés par des facteurs environnementaux et comprennent d'une part des mesures biométriques portant sur la plante (taille et forme des épis, des feuilles, longueur

d'inflorescence, nombre de fleurs, etc.) et d'autre part des données qualitatives comme la couleur des feuilles, le taux de graines (Batlle et Tous, 1997; Gharnit et al, 2004).

L'analyse de diverses données morphologiques permet d'identifier et de caractériser des groupes de diversité et de préciser leur constitution. Cette description a été utilisée pour la caractérisation phénotypique d'orge (Crossa-Raynaud, 1960; Navarro, 1992; Tous et al, 1996).

Une classification hiérarchique (CA) a été réalisée sur des moyennes et des années en utilisant la méthode de variance minimale de Ward comme algorithme de classification (Williams, 1976) et la distance euclidienne au carré comme mesure de dissimilarité (Ward, 1963) à l'aide de SPSS 8.1 pour Windows (SPSS, 1998)

2) Polymorphisme moléculaire

2.1) Caractéristiques des principaux types de marqueurs moléculaires employés chez l'orge

De nombreux marqueurs moléculaires ont été mis à la disposition des chercheurs, et de nouveaux sont régulièrement décrits. Vu l'impossibilité de dresser une liste exhaustive de la totalité de ces marqueurs, nous décrirons, par ordre chronologique de leur mise au point, un certain nombre de marqueurs qui sont ou ont déjà été les plus utilisés chez l'orge :

a) Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction

La technique RFLP développée par Botstein et al (1980) a été la première technique utilisée pour l'analyse de la diversité génétique chez l'orge (Saghai-Marroof et al, 1984). Elle repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Les fragments générés par digestion enzymatique de l'ADN de deux individus sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose, dénaturés et transférés par capillarité sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est conservée durant le transfert. La dernière étape consiste en l'hybridation moléculaire avec une sonde d'ADN marquée préalablement.

Les marqueurs RFLP présentent plusieurs des qualités espérées d'un bon marqueur moléculaire. Ils peuvent être mono-locus ou multi-locus, codominants, bi- ou multialléliques. (Helentjaris et al., 1985) et sont généralement très reproductibles.

Chez l'orge, cette technique a été largement utilisée pour les analyses de la diversité (Melchinger et al. 1994; Casas et al. 1998), et la réalisation des cartes génétiques (de la Pena et al., 1999; Graner et al., 1991; Zhu et al., 1999).

b) L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe

La technique RAPD développée par Williams et al (1990) consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments. Les fragments produits par cette amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Pour deux individus A et B, si deux sites d'hybridation sont proches et sur deux brins complémentaires d'ADN, il y aura amplification. En revanche, si ces deux sites sont trop éloignés, il ne peut y avoir d'amplification. Ainsi, on observe la présence d'une bande sur le gel pour A et l'absence pour B de cette même bande. Le polymorphisme décelé est dû à des mutations soit dans les régions amplifiées soit au niveau des sites de fixation des amorces. Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce traduit par la présence ou l'absence de la bande.

Bien que cette technique soit simple, le désavantage est que les marqueurs sont dominants et ne sont pas reproductibles (Williams et al., 1990; Welsh et McClelland, 1990). Les problèmes de reproductibilité des profils entre laboratoires (utilisation de conditions PCR non stringentes) ont défavorisé leur utilisation au profit des AFLP, plus récents.

Chez l'orge, ces marqueurs ont été utilisés pour déterminer la diversité génétique (Baum et al. 1997; Matus et Hayes 2002), en cartographie génétique (Dâvila et al. 1999) et pour l'identification de cultivars (Tinker et al. 1993). Dans ce dernier exemple, les auteurs ont montré qu'avec neuf marqueurs RAPD polymorphes et un total de sept amorces arbitraires on pouvait distinguer 27 lignées d'orge cultivées.

c) Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

Développée par Vos et al. (1995), cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. Après la digestion de l'ADN génomique par deux enzymes de restriction, des adaptateurs de séquence connue et spécifiques des deux sites de restriction sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction. Une fois que les fragments de restriction sont ainsi bordés de séquences connues, il devient possible de les amplifier par PCR. Grâce à l'emploi d'amorces sélectives qui ne peuvent amplifier qu'une petite portion des

milliers de fragments de restriction obtenus, seule une centaine de fragments sont amplifiés. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le polymorphisme révélé (de type présence ou absence de bandes) est provoqué par des changements dans les sites de restriction ou les régions bordantes. Plusieurs techniques de génotypage dérivent de la technique AFLP. Deux d'entre elles, l'ADNc-AFLP et la SSAP («Sequence-Specific Amplification Polymorphism») détectent le polymorphisme présent au niveau des gènes.

Les marqueurs AFLP sont des marqueurs bialléliques dominants (Vos et al. 1995) et génèrent un grand nombre de bandes polymorphes. Ils sont aussi extrêmement reproductibles et aucune information préalable de séquence ou génération de sonde ne sont nécessaires ce qui les rend très utiles pour créer rapidement des cartes génétiques. Toutefois, la dominance et les difficultés techniques liées au marquage par AFLP limitent son utilisation à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs.

Chez l'orge, ces marqueurs ont été utilisés pour la cartographie génétique (Becker et al. 1995; Hayes et al. 1997; Powell et al. 1997) ainsi que pour la saturation d'une région du génome proche d'un gène d'intérêt comme le gène *vrsl* (He et al. 2004) ou le gène *Mlo* (Simons et al. 1997).

d) Les microsatellites

Les microsatellites sont des zones hypervariables constituées de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, ou tétra-nucléotidiques sur une longueur inférieure à 100 paires de bases (Tautz, 1989). De tels motifs sont très nombreux dans le génome des organismes eucaryotes. Les SSR présentent un taux de polymorphisme extrêmement élevé qui repose sur la variation du nombre d'unités de répétition (n) constituant le microsatellite. Chaque locus microsatellite est encadré par des séquences qui lui sont spécifiques et qui permettent son amplification par PCR («Polymerase Chain Reaction»). L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel de polyacrylamide et le polymorphisme entre les individus se traduit par une différence de taille des allèles.

Les microsatellites sont des marqueurs codominants, extrêmement polymorphes, faciles à manipuler et permettant le multiplexage. Ils requièrent très peu d'ADN (quelques nanogrammes) et sont bien répartis dans le génome. Ces marqueurs sont très reproductibles et moins lourds d'utilisation que les RFLP ou AFLP avec une bonne résolution analytique. Un

inconvenient reste cependant que leur développement nécessite un travail considérable dont les principales étapes sont: 1) le criblage d'une banque d'ADN génomique avec une sonde correspondant au motif répété recherché ; 2) le séquençage des clones positifs pour caractériser la séquence des régions bordant chaque microsatellite ; et 3) le développement d'amorces spécifiques pour chaque microsatellite et la vérification que ce microsatellite est polymorphe chez un groupe d'individus de l'espèce en question.

Ces marqueurs ont été très utiles pour des études de diversité génétique, phylogénétiques, ainsi que pour l'évaluation des ressources génétiques et la construction de cartes génétiques. Chez l'orge, leur grand nombre, leur polymorphisme et la facilité du génotypage font des SSR d'excellents marqueurs pour l'analyse de la diversité génétique (Saghai-Maroo et al., 1994; Struss et Plieske, 1998; Matus et Hayes, 2002), le génotypage (Russell et al. 1997; Pillen et al. 2000) et la cartographie génétique (Liu et al., 1996; Ramsay et al., 2000).

e) Le polymorphisme nucléotidique

Les polymorphismes mononucléotidiques constituent la forme de variation la plus simple et la plus fréquente au sein des génomes (Collins et al., 1998). Les SNP sont une forme de polymorphisme engendré par une mutation ponctuelle qui crée différents allèles à un même locus. Ces mutations ponctuelles entraînent une différence dans une séquence d'ADN. Les SNP présentent de 2 à 4 allèles (pour un site donné), mais en général seulement deux bases alternatives sont observées pour un même site. Ce sont donc généralement des marqueurs bialléliques et leur fréquence peut être très élevée chez les plantes (Rafalski, 2002). Ce polymorphisme constitue une source de variabilité importante à exploiter.

Il existe actuellement de nombreuses techniques visant à mettre en évidence la présence de SNP dans l'ADN. Parmi la multitude de techniques disponibles, les techniques à haut débit dont les microarrays ou puces à ADN sont de plus en plus utilisés. Selon Sobrino et al. (2005), la majorité des analyses de génotypage des SNP peuvent être assignées à l'un de quatre groupes basés sur des méthodes moléculaires: l'hybridation allèle-spécifique, l'extension d'amorce, la ligature d'oligonucléotides et le clivage invasif. Il y a plusieurs méthodes de détection pour l'analyse des produits de chaque type de réaction (fluorescence, luminescence, mesure de la masse, etc.).

À cause de leur grand nombre et de leur faible taux de mutations comparés aux microsatellites, les SNP peuvent servir de marqueurs pour des études d'association génétique, de déséquilibre de liaison, de sélection assistée par marqueurs, d'analyse de la diversité génétique, d'analyses phylogénétiques, ou pour l'identification des cultivars et la caractérisation des ressources génétiques (Rafalski 2002). Chez l'orge, ces marqueurs ont été utilisés pour étudier la diversité génétique (Bundock et Henry 2004; Chiapparino et al. 2004; Varshney et al. 2008).

2.2) Comparaison des marqueurs moléculaires employés chez l'orge

Il est possible de comparer le polymorphisme obtenu avec les différentes techniques en utilisant des paramètres usuels de génétique des populations tels que le pourcentage de locus polymorphes, le nombre moyen d'allèles par locus et l'indice de diversité de Nei.

Une étude comparative entre quatre types de marqueurs a montré que les marqueurs SSR montrent le polymorphisme le plus élevé (100%), suivi des RFLP (83,2%), des RAPD (63,3%) et des AFLP (46,6%) si l'indice de bandes polymorphes est pris comme mesure (Russell et al., 1997). Nous comparons, dans le Tableau 4, les différentes caractéristiques des six principales techniques de marquage moléculaire qui ont été utilisées pour identifier la diversité génétique chez l'orge.

Tableau 4: Comparaison des cinq marqueurs moléculaires les plus utilisés chez l'orge

	RFLP	RAPD	ALFP	SSR	SNP
Quantité d'ADN (µg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
Qualité d'ADN	Haute	Haute	Moyenne	Moyenne	Haute
PCR	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Nombre de locus polymorphes analysés	1-3	1.5-50	20-200	1-3	1
Codominance	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Facilité d'usage	Difficile	Facile	Facile	Facile	Facile
Automatisation	Faible	Moyenne	Moyenne	Grande	Grande
Reproductibilité	Grande	Faible	Elevée	Elevée	Elevée
Coût de développement	Faible	Faible	Moyen	Elevée	Elevée
Coût par analyse	Elevée	Faible	Moyen	Faible	Faible

III- La mutagenèse végétale

La mutagenèse est décrite comme l'exposition ou le traitement de matériel biologique à un mutagène, c'est-à-dire un agent physique ou chimique qui augmente la fréquence de mutation au-dessus du taux spontané (Rieger et al, 1976). La mutagenèse est un changement héréditaire du matériel génétique. Pour être exprimé, la réplication doit avoir lieu. Les mutagènes physiques et chimiques ont été utilisés avec succès dans les programmes de sélection végétale pour générer artificiellement des variations génétiques pour le développement de nouvelles variétés aux caractéristiques améliorées telles que rendement accru, précocité, hauteur réduite des plants et résistance aux maladies (Maluszynski, 2001).

Ces dernières années, l'induction de mutations est devenue un outil puissant pour l'étude de la fonction et de l'expression des gènes (Li et al, 2001, Mittelsten Scheid et al, 1998). La recherche des moyens d'induire des mutations et de contrôler les types de mutations induites au sein d'une espèce constitue un objectif primordial de la génétique théorique et pratique, eu égard notamment aux conséquences entraînées par cette recherche dans le domaine de l'amélioration des plantes cultivées (Jacobs, 2016).

1) Les agents mutagènes

Les agents de mutations artificielles sont appelés mutagènes. Ils sont généralement regroupés en deux grandes catégories, à savoir les mutagènes chimiques et les mutagènes physiques. (Acquaah, 2006 ; Mba et al, 2010). Traditionnellement, pour induire des mutations dans les cultures, les matériels de plantation sont exposés à des agents mutagènes physiques et chimiques. La mutagenèse peut être réalisée avec tous les types de matériel de plantation (plantes entières, généralement des plantules, et des cellules cultivées in vitro). Néanmoins, le matériel végétal le plus couramment utilisé, est la graine.

Les mutagènes chimiques sont utilisés de préférence pour induire des mutations ponctuelles, les mutagènes physiques induisent des lésions macroscopiques, telles que des aberrations chromosomiques ou des réarrangements (Kharkwal et al, 2009). Comme le souligne Mba (2013), il convient de noter que la fréquence et les types de mutations sont des résultats directs du dosage et du taux d'exposition ou d'administration du mutagène plutôt que de son type. En fin de compte, le choix d'un mutagène reposera le plus souvent sur les circonstances particulières du chercheur, telles que la sécurité d'utilisation, la facilité

d'utilisation, la disponibilité des mutagènes, l'efficacité à induire certaines altérations génétiques, l'infrastructure parmi d'autres facteurs.

1-1. Mutation physique

Des mutagènes physiques, principalement des rayonnements ionisants, ont été largement utilisés pour induire des aberrations héréditaires et plus de 70% des variétés mutantes ont été développées en utilisant la mutagenèse physique (revue dans (Mba, 2013 ; Mba et al, 2012). Les rayons X ont été les premiers à être utilisés pour induire des mutations. Depuis lors, diverses particules subatomiques (neutrons, protons, particules bêta et particules alpha) ont été générées à l'aide de réacteurs nucléaires (Acquaah, 2006). Le rayonnement gamma du cobalt radioactif (^{60}Co) est largement utilisé. Il a un fort potentiel de pénétration et est dangereux. Cependant, il peut être utilisé pour irradier des plantes entières et des matériaux délicats, tels que les grains de pollen. Divers mutants ont été développés grâce au rayonnement gamma (Mahadevappa et al, 1983). L'effet mutagène résulte principalement de cassures d'ADN double brin. Les mutants montrent un potentiel plus élevé d'amélioration de l'architecture des plantes permettant une meilleure amélioration des cultures et sont utilisés comme un outil complémentaire dans la sélection végétale (Khin, 2006).

1-2. Mutation chimique

L'effet des mutagènes chimiques sur les matières végétales est généralement considéré comme plus doux (Acquaah, 2006). Un avantage des agents mutagènes chimiques est qu'ils peuvent être appliqués sans équipement ou équipement compliqué. Le rapport entre les mutations et les modifications indésirables est généralement plus élevé pour les mutagènes chimiques que pour les mutagènes physiques (Acquaah, 2006).

Malgré le grand nombre de composés mutagènes, seul un petit nombre a été testé sur des plantes (Wani et al, 2014). Parmi eux, seul un groupe très restreint d'agents alkylants a trouvé une large application dans la mutagenèse expérimentale des plantes et la sélection de mutations végétales. Plus de 80% des nouvelles variétés végétales mutantes enregistrées dans la base de données de l'International Atomic Energy Association (IAEA, 2015) obtenues par mutagenèse chimique ont été induites par des agents alkylants. Parmi ceux-ci, trois composés sont significatifs: l'éthylméthanesulfonate (EMS), la 1-méthyl-1-nitrosourée et la 1-éthyl-1-nitrosourée, qui représentent 64% de ces variétés.

a) Le méthanesulfonate d'éthyle (EMS)

Le méthanesulfonate d'éthyle (EMS, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$) s'est avéré très efficace (Heslot et al, 1959 ; Heslot et al, 1961) et est probablement devenu le mutagène chimique le plus populaire (van Harten, 1998). C'est un composé liquide incolore avec un poids moléculaire de 124 et est soluble à 8% dans l'eau. L'EMS appartient au groupe des agents alkylants. Ces composés ont un ou plusieurs groupes alkyles réactifs, qui sont capables d'être transférés à d'autres molécules à une position de densité électronique plus élevée (Heslot, 1977). Selon leur nombre de groupes fonctionnels, ils sont des agents alkylants mono-, bi- ou polyfonctionnels. Les agents alkylants bi- et polyfonctionnels sont généralement plus toxiques qu'un agent monofonctionnel. L'EMS est un agent d'alkylation monofonctionnel.

b) Mécanisme d'action d'EMS

Le méthanesulfonate d'éthyle produit des mutations aléatoires dans le matériel génétique par substitution nucléotidique; en particulier par alkylation de la guanine. Cela produit typiquement seulement des mutations ponctuelles. Il peut induire des mutations à un taux de 5×10^{-4} à 5×10^{-2} par gène sans tuer substantiellement. Le groupe éthyle d'EMS réagit avec la guanine dans l'ADN, formant la base anormale O6-éthylguanine. La guanine alkylée est supposée s'ioniser différemment de la guanine normale, et de telle sorte que la guanine peut s'associer à la thiamine, conduisant ainsi à des erreurs de base. Après des cycles de réplication ultérieurs, la paire de base G : C originale peut devenir une paire A : T (une mutation de transition). Cela modifie l'information génétique, est souvent nocif pour les cellules et peut entraîner des maladies.

c) Paramètres du traitement

→ La taille de la population doit être suffisante. Cette taille dépend de la probabilité de générer la variation désirée et de l'hérédité du ou des gènes. Quelques milliers de graines sont généralement nécessaires.

→ Le volume doit être suffisamment important pour éviter les gradients de concentration pendant le traitement, afin de permettre à chaque graine d'absorber le même nombre de moles de mutagène.

→ La durée du traitement doit être suffisamment longue pour permettre l'hydratation et l'injection du mutagène dans le tissu cible. La durée du traitement peut être raccourcie en utilisant des graines pré-trempées.

→ La saturation d'absorption dans l'embryon dépendait de la taille de la graine, de la perméabilité du tégument et du contenu des constituants cellulaires. La saturation mutagène dans l'embryon peut survenir dans les 3-5 heures dans les petites graines, alors que cela peut prendre jusqu'à 12 heures dans les grosses graines si la perméabilité ne limite pas l'absorption du mutagène.

→ La température n'affecte pas directement la vitesse de diffusion, mais elle influence le taux d'hydrolyse de la solution mutagène. Comme à basse température le taux d'hydrolyse est diminué, le mutagène reste stable plus longtemps, assurant ainsi la réactivité avec les cellules cibles.

→ Le pré-trempage des graines améliore l'absorption totale, le taux d'absorption et la distribution du mutagène dans le tissu cible. La pénétration d'une quantité maximale de mutagène dans le tissu embryonnaire, cible réelle du traitement mutagène, est renforcée. Le tissu de méristème d'embryon de blé et d'orge commence la synthèse de l'ADN après 16-20 h de pré-trempage, qui est l'une des étapes les plus sensibles qui produit une fréquence de mutation élevée avec relativement peu de dommages chromosomiques

→ Le pH : le rapport entre mutation génétique et mutation chromosomique augmente avec l'augmentation du pH de la solution EMS. Le pH de la solution affecte en outre l'hydrolyse des EMS. Alors que le taux d'hydrolyse des EMS ne semble pas très affecté par un pH bas, le système biologique est très sensible à pH faible. Le pH de la solution doit être surveillé avant et après le traitement.

CHAPITRE II :
MATERIELS ET
METHODES

I. Analyse phénotypique

1. Matériel végétal

Dans l'étude de la diversité génétique de l'orge (*H. vulgare* L.) 24 accessions ont été utilisés pour l'analyse phénotypique et génotypique (Tableau 5 et 6). Ces derniers ont été semés dans la région de Marchouch de la province de Rommani, dans la région de Rabat-Salé-Zemmour-Zaër, en novembre 2017. Le semis a été réalisé sur des parcelles élémentaires de 12 rangs de 1 m de long, avec 1 m d'écartement entre les rangs adjacents et un espace de 60 cm entre les blocs dans le même rang dans un dispositif aléatoire. Les 24 accessions sont d'origine Marocaine et Tunisienne. Ces accessions n'ont été jamais utilisées dans l'étude de la diversité surtout au niveau moléculaire.

Tableau 5: 11 accessions marocaines utilisées dans l'analyse phénotypique et génotypique

Nom	Matériel originaire	Caractéristiques
Acsad60	ACSAD	Deux rangs, épiaison précoce, inscrite en 1984
Ad RAR	INRA	Deux rangs, épiaison moyennement précoce, inscrite en 1998
Aglou	ICARDA	Deux rangs, épiaison moyennement précoce, inscrite en 1988
Amalou	ICARDA	Six rangs, épiaison précoce, inscrite en 1997
Arig 8	INRA	Six rangs, épiaison moyennement tardive, inscrite en 1982
Azilal	INRA	Deux rangs, épiaison moyennement précoce, inscrite en 1984
Massine	ICARDA	Six rangs, épiaison moyennement précoce, inscrite en 1994
Merzagua	INRA	Six rangs, épiaison tardive, inscrite en 1982
Rabat071	INRA	Six rangs, épiaison tardive, inscrite 1982
Tidas	INRA	Deux rangs, épiaison moyennement précoce, inscrite en 1988
Tissa	INRA	Deux rangs, épiaison moyennement tardive à épiaison, inscrite en 1984

Tableau 6: 13 accessions tunisiennes utilisées dans l'analyse phénotypique et génotypique

Nom	Origine
BNGT500	INRAT/ICARDA
BNGT 513	INRAT/ICARDA
BNGT 528	INRAT/ICARDA
BNGT 532	INRAT/ICARDA
BNGT 612	INRAT/ICARDA
BNGT 622	INRAT/ICARDA
BNGT 625	INRAT/ICARDA
51	INRAT/ICARDA
54	INRAT/ICARDA
Tombari	INRAT/ICARDA
V26	INRAT/ICARDA
V29	INRAT/ICARDA
Rihane	INRAT/ICARDA

L'application de EMS est réalisé sur une seule accession « Rabat071 ».

Année d'inscription	:	1982	
Origine	:	Matériel Marocain	
Type	:	Six rangs	
Rendement maximum réalisé	:	60 qx/ha	
Précocité à l'épiaison	:	Tardive	
Hauteur de la plante	:	Longue	
Réaction aux maladies	:	Rayure réticulée	: Sensible
		Oïdium	: Sensible
		Rhynchosporiose	: Moyennement sensible
		Rouille brune	: Résistante
		Rouille jaune	: Résistante
		BYDV	: Sensible
Verse	:	Sensible	
Sécheresse	:	Moyennement tolérante	
Salinité	:	Tolérante	

Zones de cultures préconisées	:	Zones favorables et montagnes
Poids de mille grains	:	43 g
Poids à l'hectolitre	:	Elevé
Rendement à l'extraction	:	77%
Taux en farine	:	59.2%
Taux de protéines	:	12.3%
β-glucane	:	5.9%

2. Analyse des caractères agro-morphologiques

Etant l'expression des différents stades de développement de la plante sous l'effet des facteurs écologiques, la phénologie est suivie au cours du cycle biologique de la céréale étudiée.

Pour déterminer l'époque d'épiaison, il faut mentionner la date du premier épillet visible sur 50% des plantes. Et selon cette date on peut classer les variétés en cinq groupes qui sont : « très précoce, précoce, moyen, tardif et très tardif ». Ainsi pour déterminer l'époque de floraison, anthèse, remplissage de grain, et maturité.

La résistance ou la sensibilité des variétés à certaines maladies a été suivie tout au long des stades de développement de la plante.

3. Analyse statistique

Après analyse des caractères agro-morphologiques, l'analyse de la matrice des données pour le calcul de la matrice des distances génétiques et la construction du dendrogramme, ont été réalisées par le programme statistique SPSS, en utilisant la méthode de variance minimale de Ward comme algorithme de classification et la distance euclidienne au carré comme mesure de dissimilarité.

II. Analyse géotypique

1. Méthodes

1-1. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait à partir des feuilles en utilisant la technique CTAB décrite par Murray et Thomson (1990) et modifié par Udupa et al (1999). Les feuilles ont été lyophilisées puis broyées afin d'obtenir une poudre homogène. Sous hotte, 80 μ L du β -mercaptoéthanol

ont été ajoutés sur 40 mL tampon d'extraction 2× CTAB (Annexe 1) préalablement chauffé à 65°. Dans des tubes de 2 mL contenant le broyat, 1.4 mL du tampon d'extraction 2× CTAB mélangé avec le β -mercaptoéthanol a été ajouté. La solution de CTAB chauffée permet la lyse membranaire, l'inactivation d'ADNase et la dénaturation des protéines. Les tubes ont été incubés pendant une heure à 65 °C avec agitation légère chaque 15-20 minutes. 500 μ L de solution de chloroforme / alcool isoamylique (24/1) (Annexe 1) a été ajoutée, à température ambiante, avec agitation manuelle (par inversement des tubes) pendant 15 min. Le chloroforme solubilise les pigments chlorophylliens, les polysaccharides et les protéines dénaturées. Après centrifugation à 13000 g pendant 15 min à température ambiante un millilitre de surnageant a été récupéré dans des tubes de 2 mL stériles, sur lequel, 666 μ L d'isopropanol a été ajouté avec inversement des tubes douce doucement, puis l'ADN a été laissé précipiter à température ambiante au moins 30 minutes.

Le culot d'ADN a été récupéré par centrifugation à 4°C à 13000 trs/mn pendant 10 minutes, puis lavé avec 1 mL l'éthanol 70%. Après séchage du culot des gouttes d'éthanol, il a été dissout ensuite dans 100 μ L d'eau distillée stérile et stocké à 4°C pendant une nuit.

1-2. Test qualité

La qualité des ADN extraits est très dépendante des conditions dans lesquelles les échantillons ont été préparés, prélevés et conservés. Une fois l'étape l'extraction d'ADN effectuée, il convient donc de soumettre les échantillons à un contrôle qualitatif et quantitatif.

Deux méthodes ont été utilisées dans le test qualité. La première est une migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% et la deuxième par Nanodrop2000.

a. Electrophorèse sur gel d'agarose 1.2%

Le test est réalisé sur gel d'agarose 1.2% et les bandes ont été visualisées par le bromure d'éthidium sous UV.

→ Préparation du gel : 1.56 g de poudre d'agarose a été mélangé dans 15 mL de TBE 5× (Annexe 2) à raison de 1.2g pour 100 mL, puis on complète avec l'eau distillée jusqu'à 150 mL. Le mélange a été fondu au four à microondes. Après qu'il soit bien solubilisé, le mélange a été refroidi dans un bassin rempli d'eau jusqu'à atteinte de 60°C de température.

Avant de couler le gel, les joints fournis avec la cuve (du type Scie-Plas) ont été placés pour fermer le support, les peignes ont été placés pour former les puits et le niveau a été réglé pour que le support du gel soit horizontal. Le gel a été coulé lentement en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Après solidification, les peignes et les joints ont été enlevés et le gel a été placé dans l'appareil, immergé dans le tampon de migration TBE 0.5×.

→ Préparation des échantillons : Dans des tubes de 1.5 mL stériles placés sur la glace pour garder la température convenable à la désactivation d'ADNase, 4 µL d'eau distillée stérile a été déposé avec 3 µL de tampon de charge ; bleu d'agarose (voir Annexe 2), avec 3 µL d'ADN extrait.

→ Dépôt des échantillons sur le gel d'agarose 1.2% : Dix microlitres de chaque échantillon préparé après centrifugation « spin down », a été déposé dans un puit du gel, avec le marqueur de taille Lambda DNA/EcoR I + Hind III (Annexe 5) dans le premier puit. La migration a été lancée à 60 V au départ puis augmenté à 80 V.

→ Lecture du gel : Après migration, le gel a été coloré dans la solution du bromure d'éthidium (BET à 0.001 mg/mL) (Annexe 4) pendant 20 min avec agitation, par la suite lavé avec l'eau de robinet pendant 15 min sous agitation. Les bandes ont été visualisées sous UV.

b. Dosage spectrophotométrique

La quantité et qualité d'ADN extrait ont été mesurées par Nanodrop2000. Pour une mesure plus précise de la quantité d'ADN ainsi que sa pureté, un dosage a été effectué en suivant le protocole ci-dessous :

- Les surfaces supérieures et inférieures optique du système de rétention d'échantillon ont été nettoyées avec l'éthanol puis d'eau déminéralisée propre.
- L'application des acides nucléiques a été sélectionnée dans le logiciel NanoDrop. Un essai à blanc a été effectué avec 2 µL d'eau distillée stérile.
- Une fois l'essai à blanc est terminé, les deux surfaces optiques ont été nettoyées avec un chiffon propre et sec.
- Deux microlitres d'échantillon d'acides nucléiques a été répartie sur la partie inférieure piédestal optique. Parce que la mesure est indépendante du volume, l'échantillon a seulement besoin de combler le fossé entre les deux surfaces optiques pour une mesure à prendre.

- La concentration d'acides nucléiques et leur pureté a été calculée automatiquement par le logiciel.

Les acides nucléiques absorbent dans l'UV à $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$. En mesurant l'absorbance d'une solution d'acide nucléique pure à 260 nm, on obtient sa concentration à l'aide de l'équation de la loi Beer-Lambert. En pratique, c'est une équation modifiée qui est employée :

$$c_m = (A.e) / l$$

c_m = concentration massique d'acide nucléique en ng/ μ l

A = absorbance à 260 nm

e = coefficient d'extinction massique ou la constante en ng.cm/ μ l

l = trajet optique en cm

Plusieurs paramètres basés sur les absorptions spectrophotométriques sont utilisés pour analyser la pureté d'une solution d'acides nucléiques.

- →Le ratio A260 nm/280 nm : pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. Une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque ce ratio est compris entre 1,8–2,0 pour l'ADN.
- →Le ratio A260/A230 : est un deuxième indicateur de pureté. Un ratio A260/A230 compris entre 2,0–2,2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Lorsque ce ratio est significativement plus faible que 2,0 – 2,2, cela révèle la présence de contaminants absorbants à 230 nm dans la solution (l'EDTA, les polysaccharides...).

1-3. Amplification d'ADN par PCR

La PCR a été réalisée avec un volume total de 10 μ L (Tableau 7).

Tableau 7: Réactifs de la PCR

Réactifs	Pour une réaction	Pour 25 réactions
Eau	4.975 μ L	124.375 μ L
5× buffer	2 μ L	50 μ L
dNTPs	1 μ L	25 μ L
Primer	1 μ L	25 μ L
Taq polymérase	0.025 μ L	0.625 μ L
ADN	1 μ L	
Total	10	

L'amplification a été réalisée par un thermocycleur Mastercycler, avec 13 amorces (Tableau 8). Le programme d'amplification est un cycle de dénaturation à 94°C pendant 5 min, suivi de 30 cycles (94°C pendant 30 s, T_m pendant 30 s, 74°C pendant 45 s) et une phase

finale de l'élongation à 72°C pendant 7 min. A la fin une phase additionnelle à 4°C à l'infini. La température d'hybridation est la seule variante d'une amorce à une autre.

Tableau 8: Les marqueurs moléculaires SSR utilisés dans la détermination de la diversité génétique

Locus	Chromosome	Séquence d'amorce (5'-3')	T _m	Taille	ID	Réf
Bmac0018	6H	F : GTCCTTTACGCATGAACCGT R : ACATACGCCAGACTCGTGTG	66°C	138	0.59	Ramsay et al. (2000)
Bmac0040	6H	F : AGCCCGATCAGATTTACG R : TTCTCCCTTTGGTCCTTG	58°C	236	0.89	
Bmac0067	3H	F : AACGTACGAGCTCTTTTTCTA R : ATGCCAACTGCTTGTTTAG	55°C	171	0.82	
Bmac0093	2H	F : CGTTTGGGACGTATCAAT R : GGGAGTCTTGAGCCTACTG	55°C	151	0.81	
Bmac0096	5H	F : GCTATGGCGTACTATGTATGGTTG R : TCACGATGAGGTATGATCAAAGA	58°C	173	0.74	
Bmac0134	2H	F : CCAACTGAGTCGATCTCG R : CTTCTGTTGCTTCTCTACCAA	55°C	148	0.76	
Bmac0181	4H	F : ATAGATCACCAAGTGAACCAC R : GGTTATCACTGAGGCAAATAC	55°C	177	0.75	
Bmac0209	3H	F : CTAGCAACTTCCCAACCGAC R : ATGCCTGTGTGTGGACCAT	58°C	176	0.64	
Bmac0273	7H	F : ACAAAGCTCGTGGTACGT R : AGGGAGTATTTACCCCTTG	55°C	186	0.63	
Bmac0316	6H	F : ATGGTAGAGGTCCCAACTG R : ATCACTGCTGTGCCTAGC	55°C	135	0.69	
Bmag0005	5H	F : TCCATGATGATGTGTGCATAGA R : CGGATCCCAACAAACACAC	58°C	173	0.45	
Bmag0013	3H	F : AAGGGGAATCAAAATGGGAG R : TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	58°C	155	0.72	
Ebmac0806	6H	F : ACTAAGTCCTTTCACGAGGA R : GTGTGTAGTAGGTGGTACTTG	55°C	168	0.78	

1-4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%

Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%.

→ Préparation du gel : 22,5 mL d'acrylamide 40% (Annexe 2) a été mélangé avec 15 mL du TBE 5× puis complété à 150 mL avec l'eau distillée.

La plaque de verre a été préalablement lavée avec NaOH et de l'eau pour empêcher l'adhésion du gel sur la plaque et faciliter sa répulsion.

Juste avant de couler le gel sur la plaque, 400 µL de persulfate d'ammonium (APS) (voir Annexe 2) et 111 µL du tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Annexe 2) ont été ajoutés pour catalyser la polymérisation de l'acrylamide et fabriquer un gel de polyacrylamide.

→ Préparation des échantillons : Cinq µL du bleu d'acrylamide (Annexe 2) a été ajouté sur les produits PCR.

→ Dépôt des échantillons sur le gel de polyacrylamide 6% : Sept µL de chaque échantillon a été déposé dans un puits du gel dissous dans du tampon TBE 0.5×, sans oublier le marqueur de taille 100 pb (voir Annexe 5). La migration a été lancée sous 300 mA.

→ Lecture du gel : Après migration, le gel a été coloré dans la solution du bromure d'éthidium (BET à 0.001 mg/mL), lavé avec l'eau, et par la suite visualisé sous UV.

1-5. Analyse des données

Après analyse des produits d'amplification, les profils révélés ont été notés (A, B ou C...) pour chaque accession. L'analyse de la matrice des données pour le calcul de la matrice des distances génétiques et le dendrogramme a été réalisée par le programme statistique Power Marker. Il s'agit d'un ensemble complet de méthodes statistiques pour l'analyse de différentes données génétiques de marquage, spécialement conçu pour les SSR/SNP (Liu, 2004), pour le calcul de la distance génétique ainsi que pour la réalisation du dendrogramme.

Pour décrire la diversité génétique, Nous avons calculé deux paramètres principaux dans notre étude qui sont : le contenu de l'information polymorphe (PIC) et l'indice de diversité (ID).

$$PIC_j = n(1 - \sum P^2_{ij}) / (n - 1)$$

Avec j: amorce concernée, n: taille de bande i et Pij: fréquence de marqueur i révélé par amorce j à travers la somme de bande.

$$ID = n/(n - 1)(1 - \sum p^2)$$

Avec n : nombre des échantillons, p : fréquence de l'allèle.

Le programme Power Marker (Version 3.25; Liu et Muse, 2005) a été utilisé pour construire un dendrogramme à partir des distances génétiques calculées à partir des données initiales. Ce logiciel permet de classer les accessions selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Using Method Average) (Benzecri., 1973), à partir de la matrice de distances génétiques. Cette classification hiérarchique commence par la fusion de deux unités les plus proches puis on recalcule la distance du nouveau groupe au reste des unités en créant une nouvelle matrice de distance. La nouvelle distance correspond à la moyenne arithmétique des distances entre les éléments regroupés.

Cette méthode a été choisie sur la base des travaux antérieurs ayant montré que la classification UPGMA est mieux adaptée que la classification NJ (neighbor joining) avec une meilleure structuration des groupes avec des embranchements plus robustes (Divaret, 1998).

III. Mutation chimique

Pour chaque concentration 2000 graines ont été prises, avec une population de 100 graines pour un témoin négatif. Chaque population doit être homogène et exempte de blessures et maladies.

1. Méthode de mutagenèse

Ce protocole donne des instructions pour la mutagenèse par EMS des graines d'orge. Les graines sont le matériel végétal le plus couramment mutagénisé. Ce protocole comprend trois étapes principales: (i) pré-trempage des graines dans l'eau; (ii) préparation d'une solution EMS et mutagenèse; et (iii) l'élimination des EMS et le lavage des graines avec une solution de désactivation et de l'eau avant la plantation.

- Les graines d'orge ont été lavées 3 fois avec l'eau, puis une seule fois avec l'eau distillée ;
- Une désinfection avec 45 mL d'hypochlorite de sodium pendant 15 min a été effectuée ;
- Les graines ont été lavées avec l'eau distillée, puis Pré-trempées dans 800 mL d'eau pendant 4h à température ambiante :

Pré-trempe des graines pour amener les embryons à la phase G1 ou au début de la phase S. La période de pré-trempe dépend du tégument. Les graines ayant un tégument dur et épais nécessitent plus de temps que d'autres avec un tégument fin et tendre.

- Incubation des graines dans 300 mL d'eau distillée a été réalisée avec deux concentrations différentes d'EMS : 0.6% et 0.8% pendant 16h à température ambiante avec une agitation douce :

Le trempage des graines améliore l'absorption totale, le taux d'absorption et la distribution du mutagène dans le tissu cible. La pénétration d'une quantité maximale de mutagène dans le tissu embryonnaire, cible réelle du traitement mutagène, est renforcée. Le tissu de méristème de l'embryon d'orge commence la synthèse de l'ADN après 16-20 h de trempage, qui est l'une des étapes les plus sensibles qui produit une fréquence de mutation élevée avec relativement peu de dommages chromosomiques.

- La solution d'EMS a été versée dans un récipient d'élimination présumée de substances cancérogènes contenant NaOH 0.5 M.
- La solution mutagène en excès, a été éliminée, en ajoutant 250 mL d'anhydride de sodium 200 mM, pendant 30 min.
- Pour enlever les traces d'EMS dans l'embryon de la graine 2 lavages avec 1 L d'eau distillée ont été effectuées, le 1^{er} pendant 30 min et le 2^{ème} pendant 1h :
- A la fin du traitement les graines ont été plantées ou transférées sur des plateaux recouverts de papier Whatman et séchées à l'air à + 4°C pendant la nuit avant la plantation :

On plante séparément, chaque graine dans un pot qui contient du sol sableux avec du terreau, pH (5-6.5), à base de tourbe brune, tourbe blonde et engrais composé, destiné aux plantes normales qui n'ont pas spécifiquement besoin d'un substrat acide ou alcalin.

NB : Des précautions doivent être prises lors de l'utilisation d'EMS ou d'autres mutagènes. Portez un équipement de protection individuel, y compris des blouses de laboratoire, des gants, des lunettes de protection et des couvre-chaussures jetables, lorsque vous manipulez des produits chimiques dangereux. Porter deux couches de gants pour éviter le contact de la peau avec des gants contaminés.

2. Rendement de la G1

a. Observation phénotypique

La 1^{ère} génération nous a permis une analyse phénotypique au cours des stades de développement de la plante. En ordre chronologique on a déterminé :

- Le pourcentage de germination : Après 15 jours de la plantation on mesure le nombre de plantes germées pour le contrôle et pour chaque concentration d'EMS.
- Le taux de survie à maturité : Lorsque les plantes atteignent le stade de maturité on calcule le taux de survie pour chaque concentration de mutagène.
- La longueur des plantules : Au début de la floraison, quand les premières anthères sont visibles, la longueur des plantules atteint son maximum, à ce stade on mesure la longueur de la tige principale à partir du ras du sol jusqu'aux sommet des barbes de l'épi. Elle est exprimée en cm.
- Nombre de tallage : Après deux mois de la plantation, lorsqu'on est sûr de fin tallage ; la tige maîtresse se redresse, les talles commencent à se redresser, on mesure le nombre de talles obtenus pour chaque concentration et on le compare avec le témoin négatif.
- L'épiaison : On note la date d'apparition d'épi afin de déterminer la précocité de ce stade.
- Nombre de grains par épi (NG/E).
- La floraison : On note la date d'épanouissement des fleurs pour déterminer la précocité de ce stade.

Une analyse phénotypique a inclut aussi la sensibilité et la résistance vis-à-vis de certaines maladies, comme le charbon nu, le mildiou, rayure réticulée et la verse.

CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET
DISCUSSION

I. Evaluation du polymorphisme phénotypique

1. Analyse des caractères agro-morphologiques

Les premières mesures et observations agro-morphologiques à l'œil nu des 24 accessions sont présentées dans l'annexe 7. Toutes les accessions ont été sensibles à la verse, et uniquement 2 accessions Acsad60 et Merzagua étaient sensibles au charbon nu de l'orge.

Par ailleurs des traits agro-morphologiques liés au stade de développement d'orge ont été observés. Nous avons relevé 3 grands groupes : précoce (10 jours séparent les accessions précoces), tardif (10 jours séparent les accessions tardives), très tardif (10 jours séparent les variétés très tardives (Figure 4).

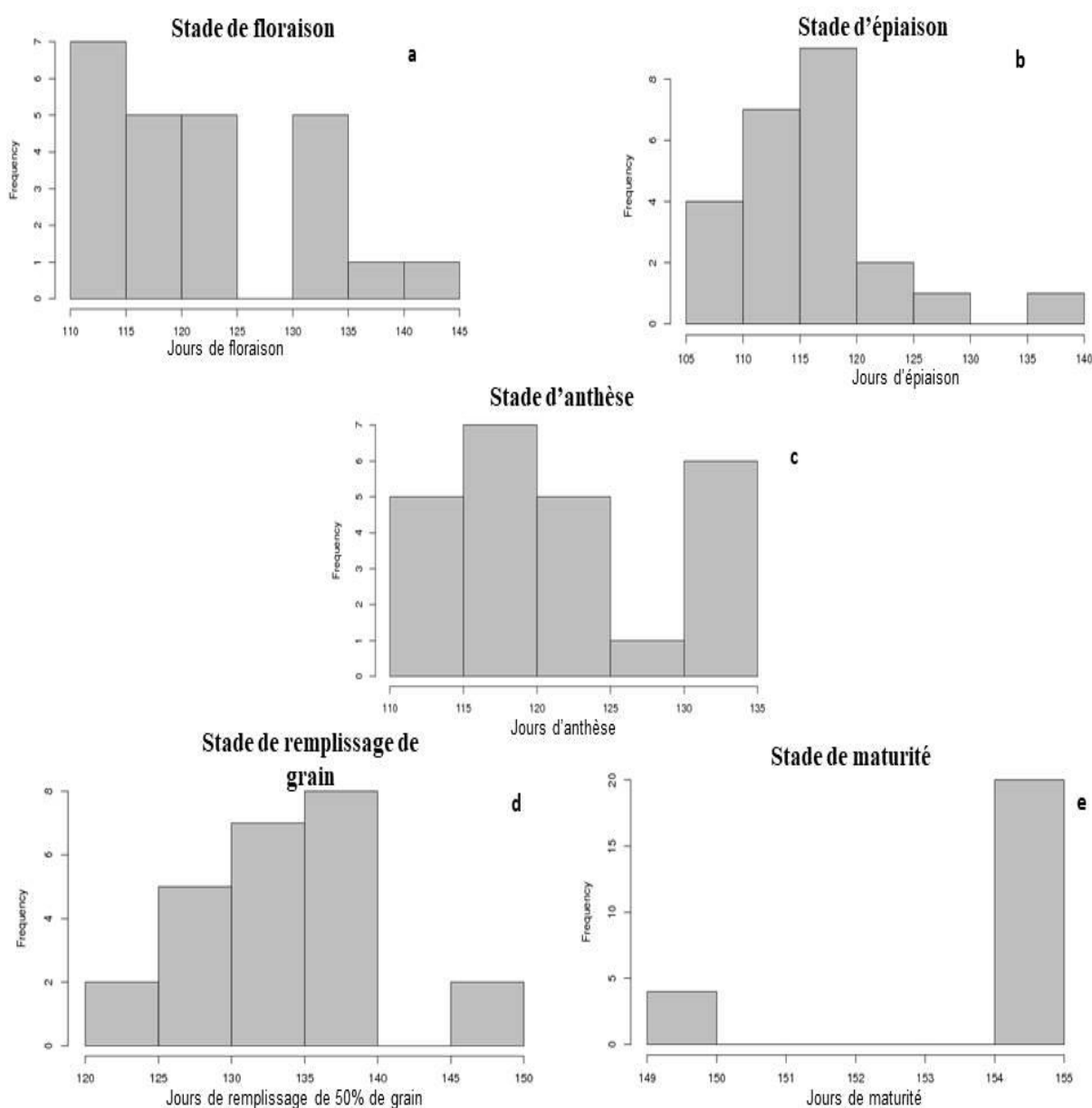


Figure 3: Observation phénotypique des stades de développement d'orge : a) stade d'épiaison, b) stade de floraison, c) stade d'anthèse, d) stade de remplissage de grain, e) stade de maturité

Les accessions : AdRAR, Aglou, Arig 8, Tidas, Tissa, BNGT500, BNGT528, BNGT532 BNGT622, V26 et V29, sont plutôt précoces. Acsad60, Amalou, Azilal, Massine, Merzagua, Rabat071, BNGT625, 51, 54, Tombari et Rihane, sont plutôt tardives alors que BNGT513 et BNGT612 est plus tardive.

Les valeurs moyennes ainsi que la déviation standard (DS) de la totalité des variables mesurées sont assignées dans le tableau 9.

L'épi est observé dans un minimum de 105 jours et un maximum de 138 jours avec une moyenne de 115 jours. Ainsi pour la plupart des 24 accessions, elles atteignent le stade d'épiaison dans 117 jours.

Dans le stade de floraison les 24 accessions sont dispersées avec un écart-type de 8.93 entre 110 jours et 141 jours. La moyenne de floraison est de 121 jours avec une majorité d'accessions qui fleurissent en 132 jours.

Tableau 9: Mesure statistiques des stades de développement d'orge

	Epiaison	Floraison	Anthèse	Remplissage de grain	Maturité
Minimum	105	110	114	124	149
Maximum	138	141	132	149	155
Moyenne	115,66	121,79	121,37	133,37	154
Mode	117	132	117	138	155
Médiane	117	120	119	132	155
Ecart-type	7	8,93	6,97	6,92	2,28

Les anthères apparaissent entre 114 et 132 jours avec une moyenne de 121 jours.

La date du début du remplissage du grain est estimée au moment où le grain occupe en longueur environ 50% de la taille des glumelles. L'intervalle de remplissage de grain est de [124,149] jours, et la moyenne est de 133 jours (Tableau 9).

La maturité est le stade clé qui marque la fin de la période de remplissage des grains. Le grain durcit et sa coloration passe du vert au jaune. Toutes les accessions atteignent ce stade dans la même période qui varie entre 149 jours et 155 jours (Tableau 9).

2. Analyse des données

Après l'analyse des caractères agro-morphologiques, les résultats obtenus permettent de calculer la distance génétique et aboutissent à la formation d'un dendrogramme qui illustre la relation entre les accessions étudiées.

Les accessions analysées ont été regroupées en se basant sur des similarités morphologiques dans 4 groupes :

Le premier groupe a regroupé les accessions qui sont tous d'origine tunisiennes : 54, Rihane, BNGT652, Tombari, BNGT612 et 51 (Figure 6). Leur distance génétique varie de (0) entre l'accension 54 et Rihane qui se sont révélés identiques à (1,19) entre l'accension Tombari et BNGT612 (Figure 5).

Le deuxième groupe a rassemblé 8 accessions qui sont d'origine marocaine à l'exception d'une accession : Massine, Rabat071, Acsad60, Azilal, Merzagua, Tissa, Amalou, BNGT513 (Figure 6).

Le troisième groupe a réuni 3 accessions marocaines : Aglou, Arig 8, Tidas et 2 accessions tunisiennes : BNGT622 et BNGT500 (Figure 6). Les distances génétiques entre ces accessions varient entre 0,24 et 0,35 ce qui distingue les accessions très proche (Figure 5).

Le quatrième groupe est constitué de 4 accessions tunisiennes : BNGT528, V29, BNGT532, V26 et une accession marocaine : AdRAR (Figure 6). Les accessions tunisiennes se sont révélées très proche, avec une distance génétique varie de 0,3 et 0,6. Avec une distance assez éloigné de 1,22 avec l'accession marocaine (Figure 5).

[illegible]

Figure 4: Matrice des distances génétique (phénotype).

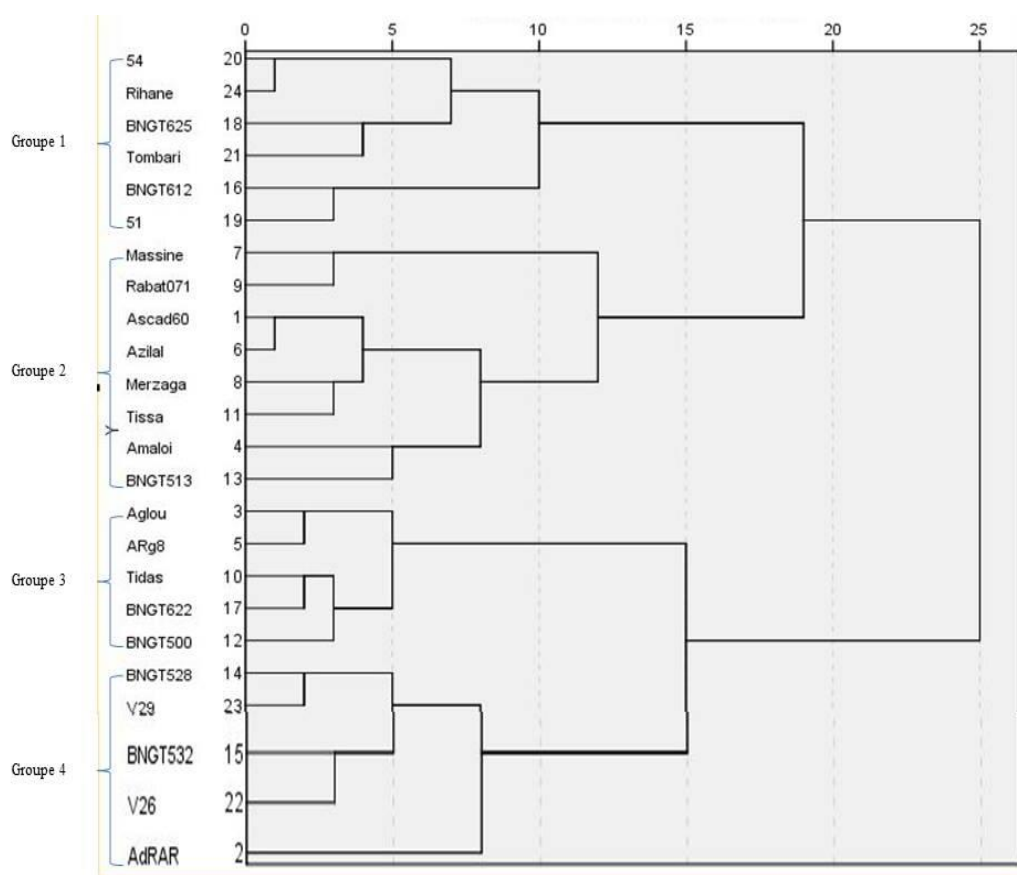


Figure 5: Dendrogramme montrant la relation phénotypique entre les 24 accessions d'orge marocaines et tunisiennes

II. Evaluation du polymorphisme moléculaire

1. Test qualité

a. Electrophorèse sur gel d'agarose 1.2%

Le test qualité effectué après l'extraction d'ADN nous permet d'avoir une idée sur la réussite de l'extraction. C'est un test qualitatif, se traduit par la présence ou l'absence des bandes, ainsi des smears qui apparaissent lors de la dégradation d'ADN. Aussi c'est un test quantitatif qui permet d'estimer la concentration d'ADN à travers le marqueur de taille et l'intensité de fluorescence des bandes.

Selon le profil électrophorétique (Figure 7), les 24 accessions d'orge analysées se caractérisent par la présence d'une bande d'ADN avec une taille supérieure à 21000 pb. Les bandes obtenues en général ne présentent pas la même intensité de fluorescence. Avec ces résultats on peut conclure la présence d'ADN et on peut réaliser des dilutions afin d'obtenir une concentration finale de 50 ng/μL dans un volume final de 100 μL.

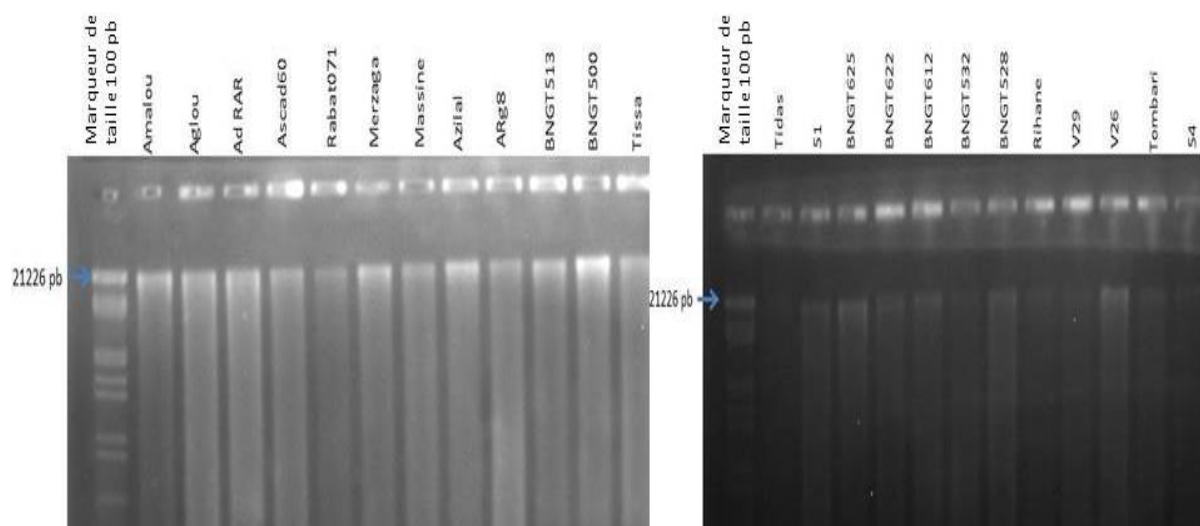


Figure 6: Profil électrophorétique du test qualité des 24 accessions d'orge sur gel d'agarose 1.2%.

b. Dosage spectrophotométrique

Les concentrations obtenues varient entre 32.61 et 471.74 ng/μL avec une moyenne de 179.32 ng/μL (Annexe 6). Le ratio A260/280 varie entre 1.78 et 2.1 et le ratio A260/230 varie entre 1.94 et 2.7 (Figure 8).

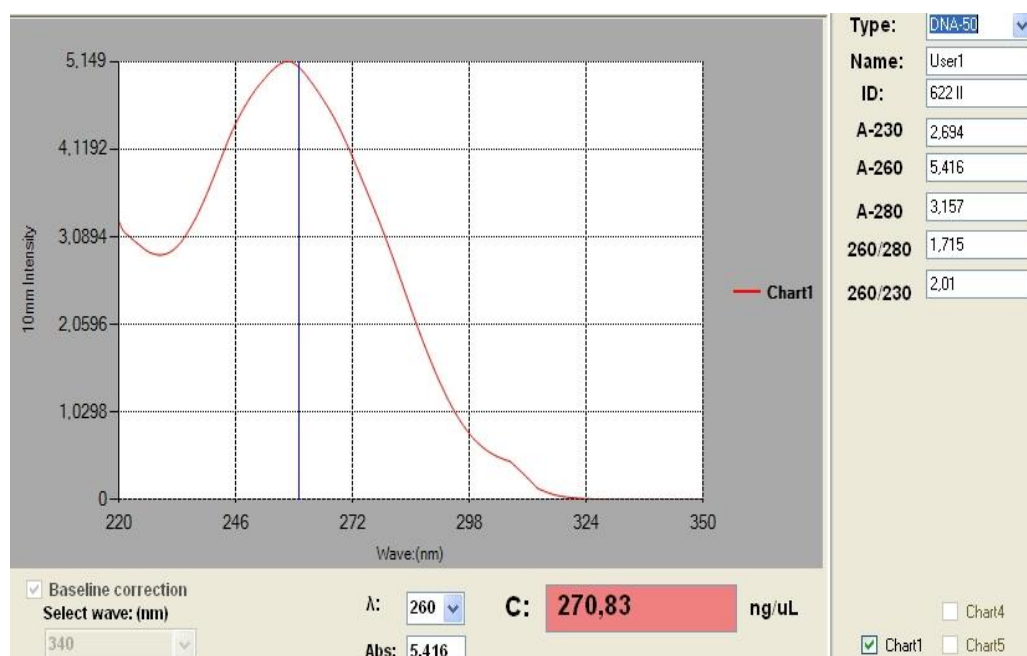


Figure 7: Profil du test qualité d'une accession d'orge par spectrophotométrie

2. Amplification par PCR

a. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 6%

L'étude avec 13 amorces dans 11 accessions d'orge marocaines a révélé 56 allèles au total, avec un minimum de 3 allèles chez les amorces Bmac0018, Bmac0040 et Bmac0093 et un maximum de 6 allèles chez les amorces Bmac0067, Bmac0134 et Bmac0181 avec une moyenne de 4 allèles par amorce (Figure 9). Dans les 13 accessions tunisiennes on a eu un minimum de 3 allèles chez les amorces Bmac0093, Bmac0209 et Bmag0005 et un maximum de 7 allèles pour l'amorce Bmac0067 avec une moyenne de 4 allèles par amorce et un total de 58 allèles (Tableau 10).

Les 13 amorces étudiées ont produit au total 81 fragments d'ADN amplifiés chez les 24 accessions d'orge, avec une moyenne de 6 bandes par amorce (Figure 9). Le nombre d'allèles varie de 4 pour l'amorce Bmac0093 et Bmac0209, à 9 pour l'amorce Bmac0067 et Bmac0181 avec une moyenne de 6 par amorce (Tableau 10).

Le nombre d'allèles par amorce est habituellement affecté par l'accession, les séquences d'amorces et les conditions du protocole.

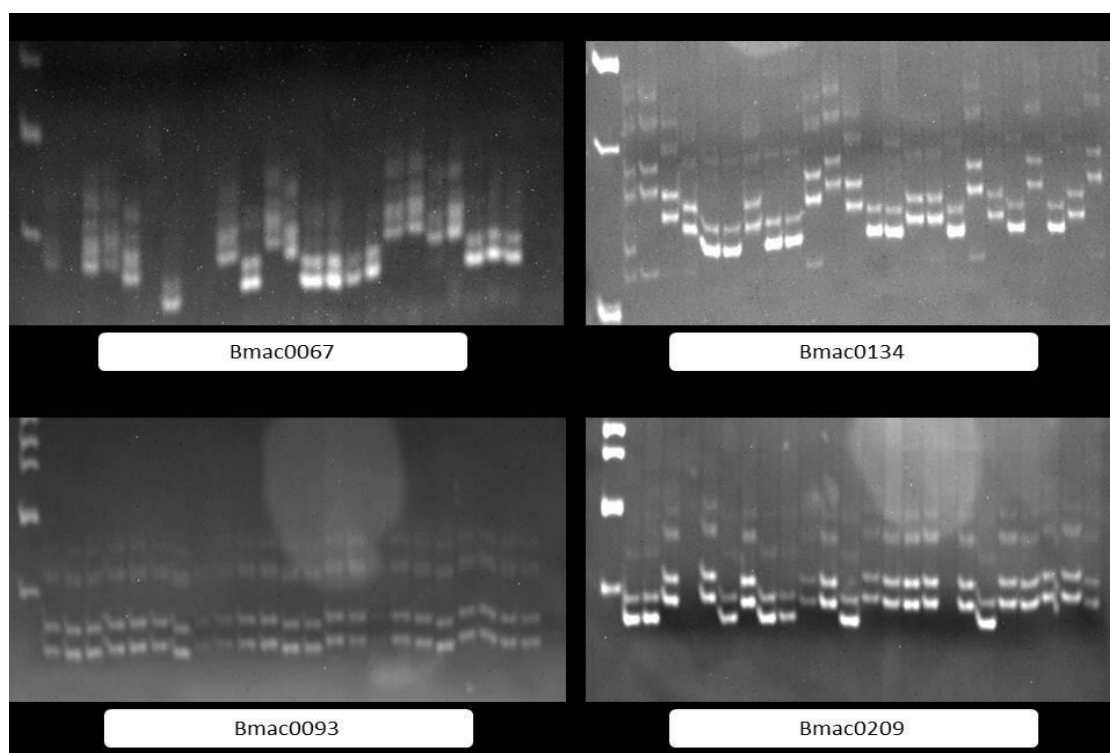


Figure 8: Profils électrophorétiques de certains marqueurs microsatellites parmi les 13 marqueurs utilisés sur gel de polyacrylamide dénaturé à 6%.

Les valeurs du PIC se sont révélées proches et varient de 0,52 pour l'amorce Bmac0093 à 0,86 pour l'amorce Bmac0067 et Bmac0181 avec une moyenne de 0,74 (Tableau 10).

La valeur PIC a révélé que Bmac0067 et Bmac0181 étaient considérées comme les meilleurs marqueurs pour 24 géotypes d'orge suivis par Bmac0134. Bmac0093 pourrait être considéré comme un marqueur moins puissant.

La diversité génétique des 13 amorces chez les 24 accessions d'orge varie de 0,57 pour l'amorce Bmac0093 à 0,88 pour l'amorce Bmac0067 avec une moyenne de 0,77 (Tableau 10).

Ces résultats révèlent que les marqueurs choisis ont été suffisants pour détecter la diversité des 24 accessions d'orge.

Tableau 10: Liste des 13 amorces SSR utilisées, nombre d'allèle (NA), leur température d'hybridation (T_m), taille des bandes, l'indice de diversité (ID) et contenu de l'information polymorphe (PIC)

				Total			11 Accessions Marocaines			13 Accessions Tunisiennes		
Amorces	NA	T _m	Taille des bandes (rangée en pb)	NA	ID	PIC	NA	ID	PIC	NA	ID	PIC
Bmac0018	6H	66°C	130-250	6	0,78	0,74	3	0,58	0,49	4	0,69	0,65
Bmac0040	6H	58°C	170-500	6	0,79	0,76	3	0,59	0,53	5	0,72	0,68
Bmac0067	3H	55°C	150-300	9	0,88	0,86	6	0,82	0,79	7	0,84	0,82
Bmac0093	2H	55°C	150-380	4	0,57	0,52	3	0,63	0,55	3	0,40	0,36
Bmac0096	5H	58°C	170-300	5	0,76	0,72	4	0,67	0,61	4	0,69	0,65
Bmac0134	2H	55°C	120-280	8	0,82	0,79	6	0,81	0,78	5	0,76	0,72
Bmac0181	4H	55°C	140-280	9	0,87	0,86	6	0,79	0,76	5	0,75	0,71
Bmac0209	3H	58°C	170-310	4	0,67	0,62	4	0,72	0,67	3	0,40	0,36
Bmac0273	7H	55°C	130-260	6	0,82	0,80	4	0,73	0,68	5	0,78	0,75
Bmac0316	6H	55°C	100-250	6	0,73	0,70	4	0,62	0,57	5	0,74	0,70
Bmag0005	5H	58°C	160-300	5	0,78	0,74	4	0,73	0,68	3	0,64	0,57
Bmag0013	3H	58°C	130-300	7	0,81	0,78	5	0,74	0,70	5	0,72	0,68
Ebmac0806	6H	55°C	140-300	6	0,81	0,78	4	0,62	0,57	4	0,71	0,66
M*				6	0,77	0,74	4	0,70	0,64	4	0,68	0,64

M* : Moyenne par amorces, **NA** : nombre d'allèle, **ID** : indice de diversité, **PIC** : contenu de l'information polymorphe

Le deuxième groupe est constitué de 4 accessions Tunisiennes ; BNGT513, 51, BNGT500, BNGT625, et une accession Marocaine Tissa (Figure 11). La distance génétique la plus élevée est indiquée entre Tissa et BNGT625 (0.83) alors que la distance la plus faible est indiquée entre 51 et BNGT625 (0.5) (Figure 10).

Le troisième groupe a réuni les accessions Amalou, Aglou, AdRAR et Massine qui sont tous d'origine Marocaine, avec la distance génétique la plus élevée entre Aglou et Massine (0.75) et la plus faible entre Amalou et Aglou (0.45) (Figure 11).

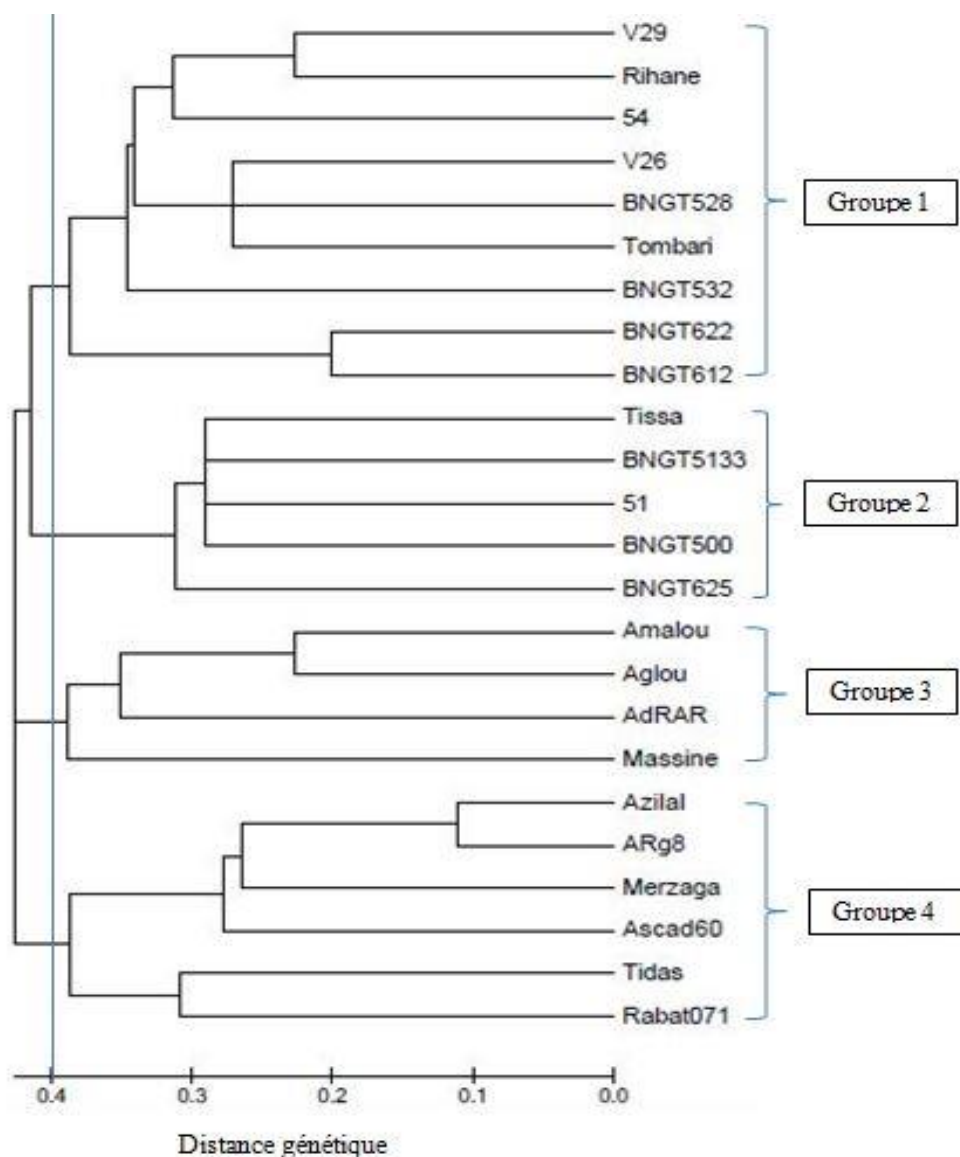


Figure 10: Dendrogramme montrant la relation génétique entre 24 accessions d'orges Marocaines et Tunisiennes

Révéle par la méthode UPGMA basée sur la distance génétique des allèles partagés

Le quatrième groupe a rassemblé 6 accessions Marocaines; Azilal, Arig 8, Merzagua, Acsad60, Tidas et Rabat071. Tidas et Rabat071 ont marqué la distance génétique la plus élevée (0.92), et la plus faible a été entre Azilal et Arig 8 (0.22) (Figure 10).

Prenons en considération l'origine de chaque accession, les distances génétiques les plus élevées (1) se sont révélées entre 5 accessions marocaines, 4 accessions tunisiennes et entre presque toutes les accessions des deux pays (Tableau 11) ce qui explique la diversité génétique entre l'orge marocain et tunisien.

Tableau 11: Les accessions d'orge les plus éloignées

Distance génétique = 1		
Maroc	Tunisie	Maroc – Tunisie
Arig 8 – AdRAR	BNGT528 – 51	Amalou et 51, Aglou et 54, Amalou et 54, Arig 8 et 54,
Tidas – AdRAR	BNGT612 - 54	Acsad60 et 54, BNGT500 et Amalou, BNGT513 et
Tidas – Amalou		Amalou, BNGT528 et Arig 8, BNGT622 et Aglou,
Tidas – Merzagua		BNGT622 et Amalou, BNGT625 et Amalou, Merzagua
Tissa – Azilal		et 54, Mergazua et BNGT528, Rabat071 et BNGT528,
		Rihane et Aglou, Rihane et Amalou, Rihane et Arig 8,
		Rihane et Merzagua, Rihane et Rabat071, Tidas et
		BNGT532, Tidas et BNGT 622
		Tissa et 54, Tissa et BNGT612, Tombari et Aglou,
		Tombari et Amalou, V26 et Tissa, V29 et Aglou, V29 et
		Amalou, V29 et Arig 8, V29 et Acsad60, V29 et Azilal,
		V29 et BNGT612, V29 et Merzagua, V29 et Tissa.

III. Mutation chimique

1. Observation phénotypique

Le suivi des différents stades de développement d'orge nous a permis de comparer l'action d'EMS à deux concentrations (0,6% et 0,8%) sur le cycle biologique de la plante étudié.

Les jours d'atteinte des stades épiaison et floraison, anthèse et maturité sont présentées ci-dessous (Figure 13).

La précocité de Rabat071 a été retardée significativement avec les deux traitements EMS 0,6% et EMS 0,8% respectivement :

Retard de la germination : 17,64% et 29,41 ;

Retard de l'épiaison : 20,65% et 21,97% ;

Retard de la floraison : 26,04% ;

Absence d'apparition d'anthère à l'extérieur d'épi (Figure 12);



Figure 11: Absence d'apparition d'anthère à l'extérieur de l'orge mutée

Retard de remplissage de grain : 22,64% et 27,35% ;

Retard de maturité : 14,04% et 17,35%.

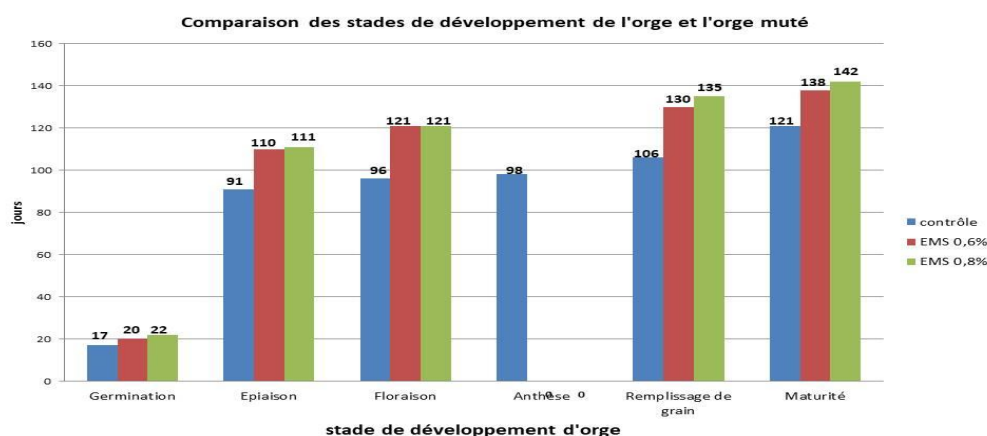


Figure 12: Histogramme de comparaison des stades de développement de l'orge et l'orge muté

Le traitement avec EMS 0.6%, le trempage à 16h a montré un taux de germination et de survie à maturité élevé par rapport au traitement avec EMS 0,8% (Figure 14). Le taux de germination du contrôle a été de 92,71% alors que le traitement avec EMS 0,6% a réduit ce taux à 39,5% et encore moins à 3,4% avec le traitement d'EMS 0,8% d'EMS, dont 26,1% et

0,79% des plantes respectivement pour les traitements à 0,6% et 0,8% ont pu survivre jusqu'à maturité.



Figure 13: Comparaison de la germination entre le contrôle, traitement EMS 0,6% et EMS 0,8%

Les hauteurs des plantules ont été mesurées pour étudier l'inhibition de la croissance induite par ces traitements (Figure 15).

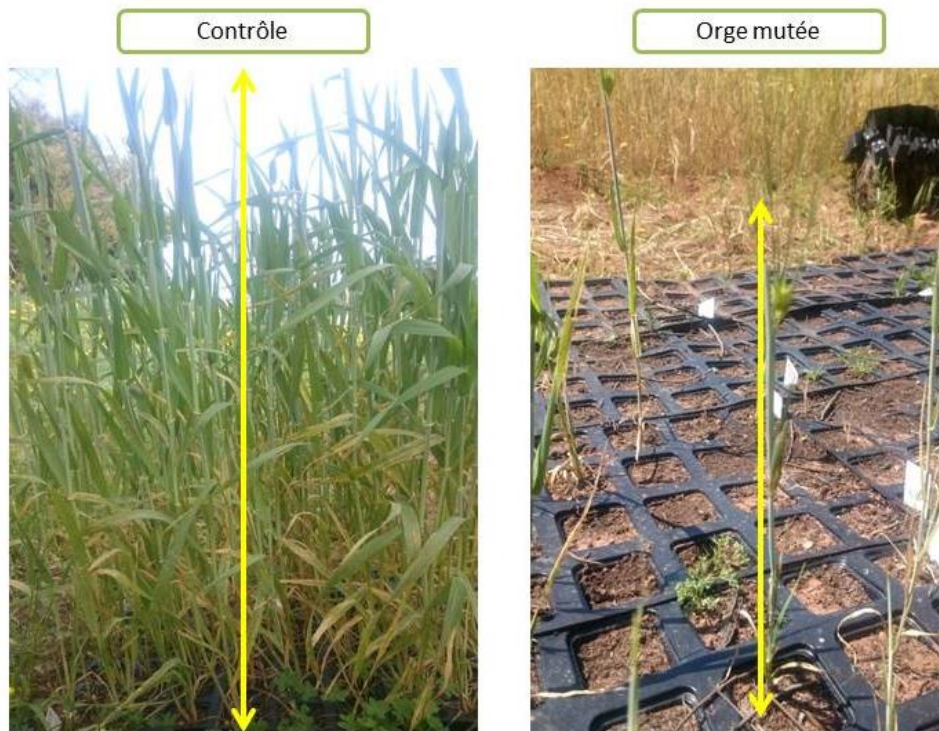


Figure 14: Réduction de la longueur d'orge mutée

La réduction des hauteurs des plantules a été significative avec les deux concentrations 0,6% et 0,8%. La longueur du contrôle a été entre 45 cm et 129 cm avec une moyenne de 90,9 cm, et une longueur dominante de 100 cm. Ces valeurs sont réduites avec le traitement EMS 0,6%, elles varient entre 15 cm et 64 cm avec une moyenne de 31,08 cm et une dominance de 29 cm. On note une différence assez légère de 1 cm avec le traitement EMS 0,8% (Tableau 12).

Tableau 12: Les mesures des composantes du rendement d'orge et d'orge muté

	Contrôle				EMS 0,6%				EMS 0,8%			
	Min	Max	M	Mode	Min	Max	M	Mode	Min	Max	M	Mode
Longueur (cm)	45	129	90,9	100	15	64	31,08	29	11	57	31	28
Talle	1	5	1,86	1	1	6	1,23	1	1	10	1,64	1
NG/E	6	60	33,8	42	1	32	6,61	3	1	32	7,43	1

M : moyenne, Min : minimum, Max : maximum, NG/E : nombre de grain par épi.

L'analyse des composantes du rendement permet de classer la productivité des plantes obtenues (Figure 16).

Le tallage du contrôle fut assez important (1,86 en moyenne) ce qui permet d'atteindre des densités épis satisfaisante. Cette moyenne diminue en appliquant un traitement d'EMS 0,6%. Le contrôle se distingue par un nombre de grain par épis important, on observe des différences importantes entre le contrôle qui atteint jusqu'à 60 graines par épis et le traitement EMS 0,6% et EMS 0,8% qui atteignent un maximum de 32 graines par épi (Tableau 12).

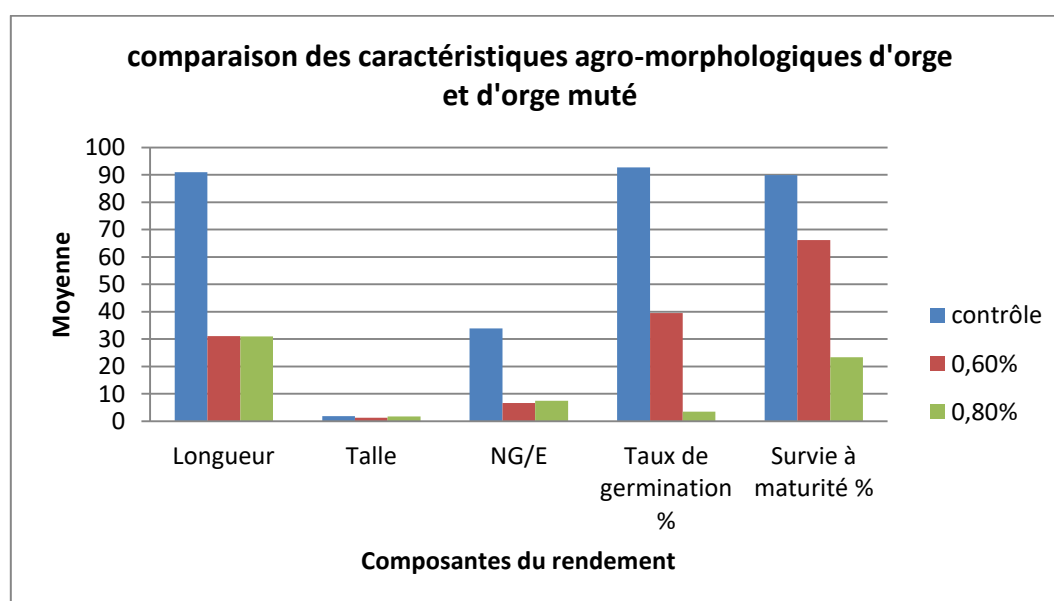


Figure 15: Histogramme de comparaison des caractéristiques agro-morphologiques d'orge et d'orge muté.

Discussion :

La diversité génétique et la différenciation entre les 24 accessions d'orge du Maroc et de la Tunisie utilisant des marqueurs SSR ont été estimées.

L'analyse microsatellites a produit des informations sur la relation entre les variétés, qui sont très utiles pour le programme de sélection et l'identification de variétés appropriées qui peuvent être utilisées comme des parents dans les programmes de croisements. Le rapprochement génétique observé entre certaines variétés est aussi en accord avec leur information pedigree. A titre d'exemple, le rapprochement génétique entre les deux variétés Azilal et Arig 8 observé par analyse microsatellites peut être expliquée par le fait d'origine italienne donc européenne d'Arig 8 et d'Azilal. Ainsi, dans le programme d'amélioration des cultures, ces parents génétiquement semblables n'ont pas pu être choisis dans le futur programme de croisement pour créer une variabilité génétique.

Cette étude est le premier rapport sur la caractérisation génétique des variétés d'orge améliorées du Maroc et Tunisie. En général, les valeurs moyennes de la diversité génétique et le nombre total d'allèles détecté chez les variétés Marocaines (4 et 0.7) étaient similaires par rapport des variétés Tunisiennes (4 et 0,68), mais moins que celles trouvées par Hamza et al (2004) (3,2 et 0,53) et Belghouthi (2007) (3 et 0,5) travaillant sur d'autres accessions d'orge de Tunisie.

En considérant l'origine écopéographique, les génotypes marocains et tunisiens se sont révélés très éloignés, ainsi qu'une diversité moléculaire entre des accessions marocaines (Tableau 10). Donc, dans un futur programme de sélection pour l'amélioration des cultures, nous pouvons choisir ces parents génétiquement divergents pour un programme de croisement afin de créer une variabilité génétique et des ségrégeants transgressifs.

La variation de la diversité génétique et de la distribution des allèles dépend fortement des locus analysés. La distance génétique entre les 24 accessions d'orge basées sur les données de SSR obtenues dans cette étude a montré que ces accessions sont différentes puisque nous comptons quatre groupes différents où un d'entre eux contient deux sous-groupes. Ce résultat signifie qu'il y a beaucoup de génotypes d'orge différents largement distribués dans ces deux pays et il est en accord avec les suggestions de Boeuf (1931), pour lesquelles l'Afrique du Nord est le centre secondaire des céréales dans le monde.

La répartition de nos accessions d'orge étudiées sur différents groupes montre aussi que chaque groupe obtenu dans cette étude partage la même origine et parfois au moins le même caractère agronomique mais avec l'exceptions du deuxième groupe.

D'un autre côté, BNGT622 et BNGT612 de Tunisie ou Amalou et Aglou, du Maroc, ont été regroupés. C'était un peu comparable à celui trouvé par Ivandic et al (2002), Wang et al (2009), et par Bchini et al (2010), où leurs germoplasmes étaient regroupés selon la même région éco-géographique. Cette relation relative observée entre les marqueurs SSR et l'origine géographique des accessions d'orge en Afrique du Nord peut s'expliquer par les conditions d'adaptation à long terme dans les régions ou sous-régions spécifiques de chaque pays. Ces conditions particulières peuvent influencer le comportement du cultivar et conduire à des traitements d'adaptation tels que la précocité pour éviter le déficit hydrique.

Ce résultat renforce les rapports précédents sur la corrélation entre la distribution éco-géographique et les marqueurs SSR (Feng et al (2006) ; Bchini et al (2010)). Il montre également que les marqueurs SSR peuvent être utilisés efficacement pour estimer les distances génétiques entre les géotypes. Cependant, il est suggéré que davantage de données moléculaires sont nécessaires pour distinguer les accessions provenant de la même région et, par conséquent, une utilisation plus efficace de la variabilité existante pour l'amélioration de l'orge au Maroc et en Tunisie.

La diversité morphologique des caractères quantitatifs entre les 24 accessions vient dans le même sens que la diversité moléculaire, par la grande variation à la fois dans la variété marocaine et dans la variété tunisienne qu'elle a montré.

Les accessions étudiées se sont regroupées en quatre groupes. Les accessions locales, Massine et AdRAR ou Arig 8 et AdRAR se sont révélées diverses avec une distance génétique respectivement de 1,95 et 1,27. Cependant BNGT528 et 51 ou BNGT612 et 54 se sont révélées diverses avec une distance génétique respectivement de 1,35 et 0,84. Cela suggère qu'il y a présence de variabilité dans les variétés locales d'orge ainsi dans les variétés tunisiennes.

L'induction des mutations par un agent chimique (EMS) sur l'accession Rabat071 est considérée comme moyen intervenant dans le domaine d'amélioration des plantes cultivées. Habituellement, les traitements mutagènes réduisent la germination des graines, le taux de croissance et la fertilité dans la première génération M1. Il y a une destruction substantielle des plantes à différents stades de développement, ce qui réduit considérablement la survie des plantes résultantes. Par conséquent, un surdosage peut tuer trop d'individus traités et un sous-dosage produira moins de mutations. La dose optimale produira la fréquence élevée des mutations et provoquera une destruction minimale. De nombreux travaux ont estimé qu'une

dose proche de la DL_{50} devrait être l'optimum qui varie en fonction des espèces cultivées et des mutagènes utilisés.

L'évaluation de cette dose repose sur les lésions primaires de M1 qui comprennent la réduction de la hauteur des plantules, de la longueur des racines, de la survie et de la fertilité. Elle correspond au traitement dans lequel la réduction de la croissance et la survie d'environ 20-30% van Harten (1998).

D'après les résultats obtenus le traitement EMS 0,6% pour la variété d'orge Rabat071 pourra être jugé comme optimum, il a un effet significatif sur le pourcentage de germination et la longueur de plantules, ce qui est en accord avec le résultat obtenu par Tomkins et Grant (2014).

En outre les paramètres du traitement jouent un rôle primordial dans l'induction d'un nombre de mutations optimum. Le temps de traitement sort d'un compromis entre la concentration du produit, sa durée d'action et le taux de mutants induits à un niveau de survie acceptable. Nos résultats prouvent que 16h de trempage ont été suffisantes pour induire un taux acceptable de mutants. Confirmé par Natarajan et Shivasankar (1965) et Mikaelsen et al (1967), qui ont trouvé que le taux de mutation d'orge est élevé lorsque les graines sont trempées pendant 16h.

Les résultats présentés ici suggèrent qu'un traitement d'EMS 0,6% à une durée de trempage de 16h peuvent être efficacement réalisés afin d'obtenir un taux acceptable de mutants, ainsi le taux de survie diminue en augmentant la dose.

La fertilité, la spécificité chromosomique, l'hérédité et autres paramètres sont déterminés à partir de M2 jusqu'à M6.

CONCLUSION

L'étude phénotypique basée sur les traits agro-morphologiques des deux provenances d'orge a permis de révéler un polymorphisme inter accessions et intra accessions. La séparation des accessions a été distinguée par une classification hiérarchique *via* la méthode Ward.

L'analyse moléculaire des accessions a été initiée par l'extraction de l'ADN génomique puis l'amplification en PCR par SSR.

L'usage du protocole modifié par Udupa et *al.* (1999) a permis d'obtenir, à partir des feuilles fraîches de l'orge, des extraits d'ADN de bonne quantité variant de 32,61 à 471,74ng/μL et de qualité et dont le rapport de ADN/protéine varie de 1.78 à 2,1.

L'analyse de ces 24 accessions par les marqueurs SSR a permis significativement leur différenciation. Les 13 amorces utilisées en PCR pour amplifier l'ADN de chaque accession, ont révélé au total 81 bandes reproductibles. L'usage de ces bandes SSR dans l'analyse statistique UPGMA a montré une large diversité génétique notamment à un niveau de dissimilarité voisinant 70-80 %.

Le dendrogramme construit à l'issu de l'analyse statistique de ces marqueurs par la méthode UPGMA a montré un degré élevé de diversité génétique et un réarrangement significatif des accessions.

Le 1^{er} groupe renfermant que des accessions tunisiennes dont la distance génétique varie de 0,4 à 1. Le 2^{ème} groupe regroupant quatre accessions tunisiennes ' BNGT513, 51, BNGT500 et BNGT625' et une accession marocaine 'Tissa', cette dernière est génétiquement assez proche de l'accession tunisienne BNGT513 avec une distance génétique de 0,61. Le 3^{ème} groupe reliant quatre accessions marocaines, avec une distance génétique qui varie de 0,45 à 0,83. Enfin le 4^{ème} groupe rassemblant six accessions marocaines avec la distance génétique la proche entre Azilal et Arig 8, et une distance génétique très éloignée entre Tidas et Rabat071.

Cette étude a montré un niveau significatif de diversité génétique parmi les accessions d'orge locales, et entre les accessions de ces deux pays.

Une mutagenèse chimique a été appliquée sur d'accession Rabat071 pour générer d'autres ressources génomiques chez l'orge. La réponse au traitement d'éthyl méthanesulfonate (EMS) a été étudiée en enregistrant et reliant les effets dépendant de la mutagenèse trouvés dans la première génération M1.

Selon des études antérieures deux concentrations ont été appliquées : 0,6% et 0,8%. La concentration optimale doit générer un taux de germination de 30-50%.

L'évaluation phénotypique de la génération M1 a permis de mettre en évidence l'effet de cet agent mutagène sur l'accession Rabat071, et de conclure la concentration la plus convenable pour cette accession. Au total, la présente étude a montré l'efficacité de la concentration EMS 0,6% avec un taux de germination de 35,5% dont 26,1 de survie jusqu'à maturité, alors, la concentration EMS 0,8% a été très toxique et n'a permis que 3,4% de germination. Quant aux composantes du rendement, l'EMS avec les 2 concentrations a réduit significativement la hauteur des plantules, le nombre des talles et le nombre des grains par épis.

Références bibliographiques

- Acquaah G. (2006).** Principles of plant genetics and breeding. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Amri A. (1993).** Comparison of performances of barley, wheat and critical varieties. pp 62-70 in: Project report IFAD/ICARDA/Maghreb, Settat, January.
- Amri A. (1992).** Caractérisation de l'environnement et stratégies d'amélioration génétique de l'orge. Mémoire pour le concours d'ingénieur en chef, INRA, Rabat, pp : 120.
- Battle I. and Tous J. (1997).** Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetic and Crops Plant Research. Gatersleben/International Plant Resources Institute. Rome. Italy.
- Baum B.R., Nevo E., Johnson D.A. and Beiles A. (1997).** Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Genet. Res. Crop Evol. 44, pp: 147-157.
- Bchini H., Ben Naceur M., Sayar R., Khemira H., Ben Kaab-Bettaeib L. (2010).** Hereditas 147 (3) (2010) pp: 114-141.
- Becker J., Vos P., Kuiper M., Salamini F. and Heun M. (1995).** Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol. Gen. Genet. 249, pp : 65-73.
- Belaid DJ. (1986).** Aspect de la céréaliculture algérienne, OPU, pp : 207.
- Belghouti A. (2007).** Caractérisation morphologique et moléculaire de quelques génotypes d'orge, Mémoire de Master de l'Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef (Tunisie).
- Belhadfa H., A. Bentasil, E.A. Chafaai et M. Mekkaoui. (1992).** Evolution de la production et de la consommations des trois principales céréales au Maroc, au cours des cinquante dernières années. Document stéréoscopique, pp : 67.
- Boulal H., Zaghouane O., El Mourid M., et Rezgui L. (2007).** Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orges) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). Ed. TIGC, INRA, ICARDA, Algérie, pp : 176.
- Bretting P.K. and Widrlechner M.P. (1995).** Genetic markers and plant genetic resource management. In : Janick J. ed. Plant Breeding Reviews. New York: John Wiley & Sons Inc. 13, pp : 11-86.
- Bundock P.C. and Henry R.J. (2004).** Single nucleotide polymorphism, haplotype diversity and recombination in the *Isa* gene of barley. Theor. Appl. Genet. 109, pp : 543-551.

- Ceccarelli S. and Grando, S. (2006).** *Hordeumvulgare* L. In: Brink, M. & Belay, G. Editeurs. PROTA 1: Cereals and pulses/Céréales et légumes secs. PROTA, Wageningen, Pays Bas, pp : 92-97.
- Ceccarelli S. and Grando S. (1996).** *Hordeumvulgare* L. In: Grubben, G.J.H. &Partohardjono, S. (Editors). Plant Resources of South-East Asia. Cereals Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 10, pp : 99–102.
- Chiapparino E., Lee D. and Donini P. (2004).** Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47, pp : 414-420.
- Clement-Grandcourt M. et Prats J. (1971).** Les céréales. Ed. Baillière et Co, Paris- France. pp : 51.
- Collins F. S., Brooks L. D. and Chakravarti A. (1998).** A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 12, pp : 1229-1231.
- Crossa-Raynaud P. (1960).** Caroubiers. *Annales Inst. Nat. Recherche Agric. Tunisie.* 33, pp : 79-83.
- Dâvila J.A., Loarce Y. and Ferrer E. (1999).** Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. *Theor. Appl. Genet.* 98, pp : 265-273.
- de la Pena R.C., Smith K.P., Capettini F., Muehlbauer G.J., Gallo-Meagher M., Dill-Macky R., Somers D.A. and Rasmusson D.C. (1999).** Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Theor. Appl. Genet.* 99, pp : 561-569.
- de Vienne D. (1998).** Biotechnologies végétales. Les marqueurs moléculaires et leurs applications. CNED. Paris. pp : 118.
- Feng Z.Y., Li-Li Zhang, Yi-Zheng Zhang, Hong-Qing Ling. (2006).** Genetics and Molecular Biology 29 (2), pp: 330-338.
- Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A. and Sayah F. (2004).** Floral characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). *Moroccan J. Biol.* 1, pp : 41-51.
- Gomez-Macpherson H. (2001).** *Hordeumvulgare*. <http://ecoport.org/ep?plant=1232>.
- Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J., Siedler H., Pillen K., Fischbeck G., Wenzel G. and Herrmann R.G. (1991).** Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* 83, pp : 250-256.
- Grillot G. (1959).** La classification des orges cultivées. *Annales de l'amélioration des plantes*, 4, pp : 446-486.

- Grillot, G. (1939).** Les meilleures variétés d'orge. Extrait de la Terre Marocaine N° 116.
- Hamza S., Ben Hamida W., Ahmed Rebaï A., Harrabi M. (2004),** Euphytica 135, pp : 107-118.
- Hayes P.M.J., Ceroni H., Witsenhoer M., Kuiper M., Zabeau K., Sato A., Kleinhofs D., Kudrna A., Kilian M., Saghai-Marooft D. Hoffman and the North American Barley Genome Mapping Project. (1997).** Characterizing and exploiting genetic diversity and quantitative traits in barley (*Hordeum vulgare*) using AFLP markers. J. Agric. Genomics, Volume 3, Article 2. ([//research/iag/papers97/paper297/indexp297.html](http://research.iag/papers97/paper297/indexp297.html)).
- He C., Sayed-Tabatabaei B.E. and Komatsuda T. (2004).** AFLP targeting of the 1-cM region conferring the *vrsl* gene for six-rowed spike in barley, *Hordeum vulgare* L. Genome 47, pp : 1122- 1129.
- Helentjaris T., King G., Slocum M., Sidenstrang C. and Wegman S. (1985).** Restriction fragment length polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. Plant Mol. Biol. 5, pp : 109-118.
- Heslot H., Ferrary R., Levy R., and Monard C. (1961)** Induction de mutations chez l'orge. Efficacite relatives des rayons gamma, du sulfate d'éthyle, du méthane sulfonate d'éthyle et de quelques autres substances. Effects of ionizing radiation on seeds (Proc. Conf. Karlsruhe, 1960), IAEA, Vienna, pp : 243–250.
- Heslot H., Ferrary R., Levy R., and Monard C. (1959)** Recherches sur les substances mutagenes (halogeno 2–éthyle)amines, derives oxygenes du sulfure de bis (chloro-2–éthyle), ester sulfoniques et sulfuriques, C.R. Seanc. Hebd. Acad. Sci., Paris 248, 729.
- Heslot H. (1977)** Review of main mutagenic compound, in Manual on Mutation Breeding. IAEA Technical Reports Series, No. 119, pp : 51–58.
- IAEA (2015).** IAEA mutant database. Vienna: International Atomic Energy Agency. Available from: <http://mvd.iaea.org/>
- Ivandic V., Hackett C.A., Nevo E., Keith R., Thomas W.T.B. (2002).** Plant Molecular Biology 48 (5-6), pp: 511-527.
- Jacob M. (2016).** Etude comparative des fréquences et types de mutations induites par le méthane sulfonate d'éthyle et le méthane sulfonate de méthyle chez *arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, pp : 44.
- Jestin L. (1996).** L'orge, amélioration des espèces végétales cultivées. Ed. INRA, Paris, pp : 55-70.

- Jestin L. (1992).** L'orge, In amélioration des espèces végétales cultivées. Ed. INRA, Paris, pp : 55-70
- Kharkwal MC., Shu QY. (2009).** The role of induced mutations in world food security. In: Shu QY, editor. Induced plant mutations in the genomics era. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. pp : 33-38.
- Khin TN. (2006).** Rice mutation breeding for varietal improvement in Myanmar. Plant Mutation Rep. 1. pp : 34-36.
- Korzun V., Malyshev S., Voylokov A.J., Boerner A. (2001).** Theoretical and Applied Genetics 102, pp : 709- 717.
- Korzun V., Roder M., Worland A. J., Bomer A. (1997).** Plant Breeding 116, pp : 227-232.
- Liu Z.W., Biyashev R.M. and Saghai-Marooof M.S. (1996).** Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theor. Appl. Genet. 93. Pp : 869-876.
- Li X., Song Y., Century K., et al. (2001)** A fast neutron deletion mutagenesis based reverse genetics system for plants. *Plant J.* 27. pp : 235–242.
- Mahadevappa M., Ikehashi H., Coffman WR., et al. (1983).** Improvement of native rice for earliness through induced mutagenesis. *Oryza.* 20(1) pp : 40-46.
- Maluszynski M. (2001)** Officially released mutant varieties—The FAO/IAEA Database. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 65, pp : 175–177.
- Matus I.A. and Hayes P.M. (2002).** Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeat. *Genome* 45, pp : 1095-1106.
- Mba C., Afza R., Bado S., et al. (2010).** Induced mutagenesis in plants using physical and chemical agents. In: Davey MR, Anthony P, editors. *Plant cell culture: essential methods.* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. Pp : 111-130.
- Mba C., Afza R., Shu QY. (2012).** Mutagenic radiations: X-rays, ionizing particles and ultraviolet. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, editors. *Plant mutation breeding and biotechnology.* Wallingford: CABI. Pp : 83-90.
- Mba C. (2013).** Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy.* 3(1), pp : 200-231.
- McIntosh G.H., Whyte J., McAnther R. and Nestel P.G. (1991).** Barley and Wheat foods: Influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition,* 53, pp : 1205-1209.

- Mikaelsen K. et al. (1967).** Genetic effects of alkylating agents in barley. Influence of post-storage, metabolic state and pH of mutagen solution: 354-374. Seibersdorf Laboratory, International Atomic Energy Agency. Australia.
- Mittelsten Scheid O., Afsar K., and Paszkowski J. (1998)** Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, pp : 632–637.
- Natarajana T. and Shivasankar. (1965).** Studies on modification of mutation response of barley seeds to ethyl methanesulfonate. - *Z. Vererbungsl.* 96, pp : 13- 21.
- Navaro V. (1992).** Estudio y mejora del algarrob. In II Jornadas Sobre Experimentación en Fruticultura. Moncada (Valencia) (unpublished).
- ONICL. (1999).** Situation du marché de l'orge au Maroc. ONICL/DEI/SEE, Documentation, Maroc, pp : 24.
- Pillen K., Binder A., Kreuzkam B., Ramsay L., Waugh R., Forster J. and Leon J. (2000).** Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101, pp : 652-660.
- Powell W., Thomas W.T.B., Baird E., Lawrence P., Booth A., Harrower B., McNicol J.W. and Waugh R. (1997).** Analysis of quantitative traits in barley by use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. *Heredity* 79, pp : 48-59.
- Rafalski A. (2002).** Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, pp : 94-100.
- Ramsay L et al. (2000)** A simple sequence repeat-based linkage map of barley **Genetics** 156, pp: 1997-2005.
- Ramsay L., Macaulay M., Ivanissevich S., MacLean K., Cardie L., Fuller J., Edwards K.J., Tuvešson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmiroli N., Sjakste T., Ganai M., Powell W. and Waugh R. (2000).** A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156, pp : 1997- 2005.
- Rieger R., Michaelis A., and Green M. (1976)** Glossary of Genetics and Cytogenetics. Springer Verlag, New York.
- Rostoks N., Mudie S., Cardie L., Russell J., Ramsay L., Booth A., Svensson J.T., Wanamaker S.L, Walia H., Rodriguez E.M., Hedley P.E., Liu H., Morris J., Close T.J., Marshall D.F. and Waugh R. (2005).** Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics.* 274, pp : 515-527.

- Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz B.G., Jahoor A., Powell W. and Waugh R. (1997).** Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95, pp : 714-722.
- Saade E.M. (1994).** Constraints to the adoption of new barley varieties in Morocco. Report Project INRA/DPV-MARA/ICARDA, Rabat, pp : 88.
- Saghai-Marooif M.A., Biyashev R.M., Yang G.P., Zhang Q. and Allard R.W. (1994).** Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, pp : 5466-5470.
- Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. and Allard R.W. (1984).** Ribosomal DNA spacer-length in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, pp : 8014-8018.
- Saidi S., Lemtouni A., Amri A., and El Mouden. (2001).** Use of Barley Grain for Food in Morocco. In: *Food barley: Importance, Users and Local Knowledge*, (edis) Stefania Grandon, H.Gomez Macpherson, ICARDA, pp : 17-21.
- Sayoud R., Ezzahiri B. et Bouznad Z. (1999).** Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. ITGC, Alger, pp : 30-32.
- Sekkat A. et Leghazali M. (1999).** Utilisation d'orge dans l'alimentation animale. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, Rabat, Document stéréographique, pp : 5.
- Siddiqui B. A. and Khan S. (1999)** Mutagenesis: tools and techniques—a practical view, in *Breeding in Crop Plants: Mutations and In Vitro Mutation Breeding*. Kalyani Publishers, Ludhiana, New Delhi, pp : 20–32.
- Simon M., Codaccioni P., et Coeurx L. (1989).** Identification et classification des variétés d'orge cultivées en France, éd. INRA. France. pp : 16.
- Simons G., Van der Lee T., Diergaard P., Van Daelen R., Groenendijk J., Frijters A., Buschges R., Hollricher K, Tôpsch S., Schulze-Lefert P., Salamini F., Zabeau M. and Vos P. (1997).** AFLP-based fine mapping of the Mlo gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44, pp : 61-70.
- Smith J.S.C., Zabeau M. and Wright S. (1993).** Association among inbred lines as revealed by RFLPs and by a thermocycling methodology, Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs). *Maize Genet. Newsl.* 68, pp : 62-64.
- Sobrinho B., Brion M. and Carracedo A. (2005).** SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.* 154, pp : 181-194.

- Soleimani V.D., Baum B.R., Jonson D.A. (2002).** AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp durum (Desf.) Husn.]. *Theor. Appl. Genet.* 104, pp : 350-357.
- Soltner D. (1988).** Les grandes productions végétales. Collection sciences et techniques agricoles. 16ème édition, Angers. pp : 464.
- SPSS Inc. (1998).** SPSS User's guide. USA, ISBN 0-13-688590-X.
- Struss D. and Plieske J. (1998).** The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. Appl. Genet.* 97, pp : 308-315.
- Stuessy T. E. (1990).** The systematic evolution of comparative data. Columbia Univ. Press, New York, USA.
- Tautz D. (1989).** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.* 16, pp : 6463-6471.
- Tinker N.A., Fortin M.G. and Mather D.E. (1993).** Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85, pp : 976-984.
- Tomkins D.J et Grant W.F. (2014).** Comparative cytological effects of the pesticides menazon, metribromuron and tetrachloroisophthalonitrile in *Hordeum* and *Tradescantia*. Genetics Laboratory, Macdonald Campus of McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Québec.
- Tous J., Romero A., Plana J. and Batlle I. (1996).** Current situation of carob plant material. In Proceedings of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira. Portugal (in press)
- USDA. (2004).** USDA national nutrient database for standard reference, release 17. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Nutrient Data Laboratory, Beltsville Md, United States. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.
- Van Harten A. M. (1998).** Mutation Breeding Theory and Practical Applications. Cambridge University Press, Cambridge.
- Varshney R.K., Thiel T., Sretenovic-Rajcic T., Baum M., Valkoun J., Guo P., Grando S., Ceccarelli S. and Graner A. (2008).** Identification and validation of a core set of informative genetic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley. *Mol. Breeding* 22, pp : 1-13.
- Virk P. S., Pooni H.S., Syed N. H., Kearsey M. J. (1999).** Theoretical and Applied Genetics 98, pp : 462-464.
- Von Bothmer R., Jacobsen N. and Baden C. (1995).** An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. 2nd Edition. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7. IBPGR, Rome, Italy. pp : 129.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kupier M. and Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23, pp : 4407-4414.

Wang A, Yu Z, Ding D. (2009). Comptes Rendus Biologies 332 (4) pp : 393-403.

Wani MR., Kozgar MI., Tomlekova N., et al. (2014). Mutation breeding: a novel technique for genetic improvement of pulse crops particularly Chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: Parvaiz A, Wani MR, Azooz MM, Lam-son PT, editors. Improvement of crops in the era of climatic changes. New York (NY): Springer; 2014. pp : 217-248.

Ward J.H., (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. J. Am. Stat. Assoc. 58, pp : 236–244.

Welsh J. and McClelland M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res. 18, pp : 7213-7218.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 22, pp: 6531-6535.

Williams W.T. (1976). Pattern analysis in agricultural science. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.

Zhu H., Gilchrist L., Hayes P., Kleinhofs A., Kudrna D., Liu Z., Prom L., Steffenson B., Toojinda T. and Vivar H. (1999). Does function follow form? Principal QTLs for *Fusarium* head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploid population of barley. Theor. Appl. Genet. 99, pp : 1221-1232.

Annexes

Annexe 1 Solutions pour extraction d'ADN

Solution stock de Tris-HCl:

1 M Tris-HCl (pH 8)	Pour 100 mL
Tris base (Amresco)	12.114 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 100 mL

Ajuster le pH avec le HCl concentrée jusqu'à pH 8.

Solution stock de NaCl:

5 M NaCl	Pour 250 mL
NaCl (Merck)	73.05 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 250 mL

Solution stock d'EDTA:

0.5 M EDTA (pH 8)	Pour 100 mL
EDTA (Amresco)	18.6 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 100 mL

Ajuster le pH avec les pelletes de NaOH jusqu'à pH 8.

Solution stock du tampon d'extraction 2x CTAB:

2 x CTAB	Volume final de 50 mL	Volume final de 250 mL
1 M Tris-HCl (pH 8)	5 mL	25 mL
5 M NaCl	14 mL	70 mL
0.5 M EDTA (pH 8)	2 mL	10 mL
CTAB (Amresco)	1 g	5 g
Eau distillée	Compléter jusqu'à 50 mL	Compléter jusqu'à 250 mL

Solution de Chloroforme / Isoamyl alcool:

Chloroforme / isoamyl alcool (24 : 1)	Pour 25 mL	100 mL
Chloroforme (Scharlau)	24 mL	96 mL
Isoamyl alcool ou 3- Methylbutanol (Sigma)	1 mL	4 mL

Annexe 2 Solutions pour préparation des gels

Tampon de migration 5 X TBE:

5 X TBE	Pour 1 L
Acide borique (Amresco)	27.5 g
Tris base (Sigma)	54 g
0.5 M EDTA (pH 8)	20 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 1 L

Ajuster le pH avec l'acide borique jusqu'à pH 8.

Préparation du bleu d'agarose:

Bleu d'agarose	Pour 10 mL
1 M Tris-HCl (pH 8)	0.5 mL
0.5 M EDTA (pH 8)	0.1 mL
50% Glycérol (Acro Organics)	5 mL
Bleu de bromophénol	20 mg

Préparation du bleu d'acrylamide:

Bleu d'acrylamide	Pour 25 mL
Formamide (Roche)	24.75 mL
Bleu de bromophénol	12.5 mg
Xylene cyanole (Sigma)	12.5 mg
Eau distillée	1.25 mL

Solution d'acrylamide 40% :

40% Acrylamide	Pour 50 mL	Pour 250 mL
Acrylamide (Promega)	19.33 g	96.65 g
Bis acrylamide ou N, N'-Methylenebiacrylamide (Sigma)	0.67 g	3.35 g
Eau distillée	50 mL	250 mL

Préparation d'ammonium persulfate:

Solution d'ammonium persulfate (10 mL)	10%	25%
Ammonium persulfate (Pharmacia Biotech)	1 g	2.5 g
Eau distillée	10 mL	25 mL

Annexe 3

Produits nécessaire pour la PCR

Préparation de 2 mM dNTPs:

2 mM dNTPs	Pour 1000 µL
100 mM dATP (Promega)	20 µL
100 mM dTTP (Promega)	20 µL
100 mM dCTP (Promega)	20 µL
100 mM dGTP (Promega)	20 µL
Eau bi-distillée stérile	920 µL

Préparation de l'amorce 10 pmol/µL:

Amorce F / R	Pour 500 µL
100 µM Amorce Forward (Sigma)	50 µL
100 µM Amorce Reverse (Sigma)	50 µL
Eau bi-distillée stérile	400 µL

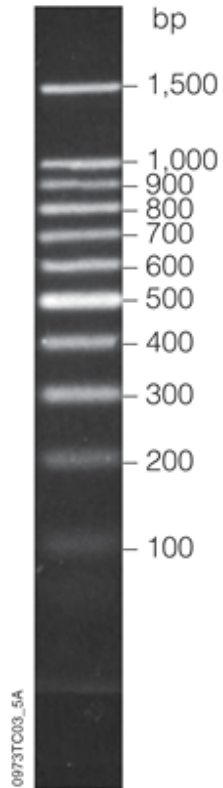
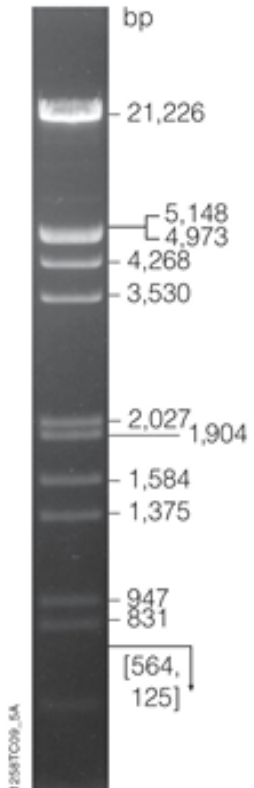
Annexe 4

Solutions pour coloration des gels

Solution de bromure d'éthidium (BET):

Solution dilué de Bromure d'éthidium	Pour 1 L
Bromure d'éthidium (10 mg/mL)	100 µL
Eau distillée	1 L

Annexe 5 Marqueur de taille

 0073TC03_5A 2% agarose Marqueur de taille Bench Top 100 bp DNA Leadder Cat. # G8291 (Promega)	 1258TC09_5A 0.7% agarose Marqueur de taille Lambda DNA/EcoRI + HindIII Cat. # G1731 (Promega)
--	---

Annexe 6**Résultats du test quantitatif et qualitatif d'ADN par Nanodrop2000**

Nom	Type	260nm	280nm	230nm	260/280	260/230	C:ng/uL
Amalou	DNA-50	3,411	1,821	1,477	1,873	2,309	170,578
Aglou	DNA-50	5,25	2,86	2,454	1,835	2,139	262,504
Ad RAR	DNA-50	3,401	1,802	1,37	1,887	2,482	170,091
Acsad60	DNA-50	3,163	1,7	1,314	1,86	2,407	158,196
Rabat071	DNA-50	1,148	0,542	0,423	2,118	2,713	57,409
Merzagua	DNA-50	2,786	1,647	1,267	1,691	2,198	139,315
Massine	DNA-50	3,118	1,698	1,425	1,836	2,188	155,9
Azilal	DNA-50	3,432	1,861	1,512	1,844	2,269	171,63
Arig8	DNA-50	5,256	2,929	2,473	1,794	2,125	262,834
BNGT513	DNA-50	0,652	0,431	0,335	1,512	1,946	32,614
BNGT500	DNA-50	4,182	2,264	1,777	1,847	2,353	209,121
Tissa	DNA-50	4,894	2,675	2,011	1,829	2,433	244,741
Tidas	DNA-50	1,288	0,658	0,609	1,957	2,114	64,443
51	DNA-50	9,434	5,339	4,202	1,766	2,245	471,745
BNGT625	DNA-50	3,46	1,863	1,411	1,857	2,452	173,043
BNGT622	DNA-50	4,675	2,498	2,004	1,871	2,332	233,769
BNGT612	DNA-50	1,871	0,805	0,58	2,324	3,225	93,55
BNGT532	DNA-50	5,147	3,439	3,373	1,496	1,525	257,383
BNGT528	DNA-50	5,265	2,882	2,263	1,826	2,326	263,285
Rihane	DNA-50	2,372	1,309	0,999	1,812	2,374	118,638
V29 II	DNA-50	3,536	1,982	1,538	1,784	2,299	176,835
V26	DNA-50	3,918	2,248	1,943	1,742	2,016	195,935
TOMBARI	DNA-50	1,877	1,1	1,032	1,706	1,818	93,876
54	DNA-50	2,523	1,495	1,231	1,687	2,049	126,169

Annexe7

Tableau des observations phénotypiques

	Ep	Flr	Anth	RG	Mt	Verse	Ch.n	RR	ML
Acsad60	119	121	121	138	155	S	S	R	S
Ad RAR	105	112	114	126	155	S	R	MR	MS
Aglou	105	112	114	126	155	S	R	R	MR
Amalou	117	136	116	124	155	S	R	R	MR
Arig 8	112	114	117	126	155	S	R	R	MR
Azilal	121	124	123	138	155	S	R	R	S
Massine	117	121	121	124	155	S	R	R	R
Merzaga	121	123	126	126	155	S	S	R	S
Rabat 071	117	119	121	135	155	S	R	R	S
Tidas	114	117	117	126	155	S	R	R	MS
Tissa	114	119	121	132	155	S	R	R	R
BNGT500	113	114	117	138	155	S	R	MS	MS
BNGT 513	138	141	114	132	149	S	R	MR	S
BNGT 528	110	114	117	132	149	S	R	MS	MR
BNGT 532	107	110	114	138	149	S	R	MS	MR
BNGT 612	126	132	132	149	155	S	R	MR	S
BNGT 622	114	117	117	132	155	S	R	R	MS
BNGT 625	117	132	132	138	155	S	R	R	S
51	117	122	132	149	155	S	R	MR	R
54	117	132	132	138	155	S	R	MR	MS
Tombari	117	132	132	132	149	S	R	R	MS
V26	107	110	114	132	155	S	R	MR	S
V29	114	117	117	132	155	S	R	MS	MS
Rihane	117	132	132	138	155	S	R	MR	MS

Ep : épiaison, **Flr** : floraison, **Anth** : anthèse, **RG** : remplissage de grain, **Mt** : maturité, **Ch.n** : charbon nu, **RR** : rayure réticulée, **ML** : mildiou, **R** : résistant, **S** : sensible, **MR** : moyennement résistant, **MS** : moyennement sensible.

Résumé

L'étude des accessions d'orge du Maroc et de la Tunisie, au niveau morphologique et moléculaire sera utile pour comprendre leur diversité génétique, pour gérer leur conservation et leur utilisation efficace dans les programmes d'amélioration.

Dans ce contexte, un total de 24 accessions d'orge provenant du Maroc et de la Tunisie utilisant 13 marqueurs SSR ont été analysés dans cette étude.

Un totale de 81 bandes amplifiées a été noté, dont 56 allèles pour les accessions marocaines et 58 allèles pour les accessions tunisiennes. Le nombre maximal de bandes amplifiées s'est avéré par les amorces Bmac0067 et Bmac0181, et le nombre minimal de bandes amplifiées s'est avéré par les amorces Bmac0093 et Bmac0209.

Les 24 accessions d'orge ont été groupées dans quatre classes selon une classification ascendante hiérarchique, chaque groupe a été caractérisé par la même origine écogéographique, à l'exception du deuxième groupe qui a été constitué de 4 accessions tunisiennes et une marocaine.

Les distances génétiques ont montré la variation à la fois dans la variété marocaine et dans la variété tunisienne, ce qui signifie qu'il y a beaucoup de génotypes d'orge différents et largement distribués dans ces deux pays.

Le cultivar d'orge à six rangs Rabat071 a été utilisé pour développer une population mutante. La réponse au traitement avec le méthanesulfonate d'éthyle (EMS) a dû être déterminée en premier, car la sensibilité génotypique de Rabat071 à la mutagenèse chimique était inconnue. Sur la base des expériences antérieures avec la mutagenèse par EMS sur l'orge, deux concentrations d'EMS 0.6% (60 mM) et 0,8% (80 mM) ont été appliquées. La tolérance de 'Rabat071' à la toxicité par l'EMS 0,6% a été acceptable avec un taux de germination de 39,5% dont 26,1% de ces plantes a pu survivre et atteindre la maturité.

Mots clés : Orge (*Hordeum vulgare*), Diversité génétique, Marqueur moléculaire, Classification ascendante hiérarchique, SSR, Mutation, EMS.