

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET ASSOCIATION MARQUEUR SSR PHÉNOTYPE POUR LA TOLÉRANCE AU STRESS HYDRIQUE CHEZ LE BLÉ DUR (*TRITICUM DURUM* DESF)

Bousba Ratiba, PhD

Djekoun Abdelhamid, Professor.

University Constantine 1 , Algeria

Duraa Susan, PhD

National Center for Agricultural Research and Extension (NCARE)/Biotechnology unit,
Baq'a'a, Jordan

Ykhlef Nadia, Professor.

University Constantine 1 , Algeria

Abstract

The objective of this study is to investigate the genotypic differences for several morpho physiological parameters in different water conditions. Twenty varieties of durum local and introduced were grown in pots. Measures of morpho physiological parameters were performed. These measures have focused on the rate of chlorophyll (SPAD unit), the relative water content RWC%, Cell Integrity (%), leaf area (cm²) and stomatal resistance. The results show a significant variability between varieties and between treatments. The distribution follows a normal variation in phenotypic continuous quantitative variation. Data variability morphophysiological were used for association analysis marker / phenotype. The majority of used markers are associated with studied traits under water stress like; *WMS135*, *WMC54*, *WMC63*, *WMC165*, *WMC 150* *WMC167*, *WMS198*, *WMC177*, *WMS 6et* *WMC235*; located respectively on chromosomes 1A, 3B, 2A, 3A, 4A, 2A, 2A, 2B, 4B and 5B, which are respectively involved in the variation in the studied characters. These markers could be used for marker-assisted selection in durum wheat breeding under drought conditions , and new strategies could be developed to safeguard and improve our autochthon germoplasm for drought tolerance.

Keywords: Wheat, microsatellites, tolerance to water stress, association marker / phenotype

Résumé

L'amélioration des céréales porte maintenant sur des caractères très complexes, présentant en majorité une distribution continue. La valeur phénotypique d'un individu dépend du génotype (facteurs génétiques) mais aussi des conditions environnementales (Fleury D, 2010). L'objectif de cette étude est d'étudier les différences génotypiques pour plusieurs paramètres morpho physiologiques sous différentes conditions hydriques. Vingt variétés de blé dur locales et introduites ont été cultivés dans des pots. Des mesures des paramètres morphophysiologiques ont été réalisées. Ces mesures ont porté sur le taux de chlorophylle (Unité SPAD), la Teneur relative en eau TRE% , L'Intégrité cellulaire(%), la surface foliaire (cm²) et la résistance stomatique. Les résultats obtenus montrent une forte variabilité significative entre les variétés et entre les traitements. La distribution de la variation suit une loi normale, à variation phénotypique continue, quantitative. Les données de la variabilité morphophysiologique ont été exploitées pour une analyse d'association marqueur/phénotype. La majorité des marqueurs associés sont spécifiques au stress hydrique dont les marqueurs *WMS135*, *WMC54*, *WMC63*, *WMC165*, *WMC 150*, *WMC167*, *WMS198*, *WMC177*, *WMS6* et *WMC235* localisés sur les chromosomes 1A, 3B 2A 3A 2A 2B 4A 2A 4B 5B , qui sont impliqués respectivement dans la variation des caractères étudiés . Ces marqueurs une fois validés peuvent constituer des candidats potentiels pour la sélection assistée dans le but d'introgresser les caractères contrôlant au mieux l'état hydrique.

Mots clés: Blé, microsatellites, tolérance au stress hydrique, association marqueur/phénotype

Introduction

Bien que la sélection classique des céréales, ait obtenu des résultats encourageants elle ne parvient plus aujourd'hui à évoluer aussi rapidement. L'amélioration de blé porte maintenant sur des caractères très complexes, présentant en majorité une distribution continue (Maccaferri, et al., 2006). Parmi les nouvelles méthodologies permettant d'étudier de tel traits, l'utilisation de méthodes d'association phenotype/genotype (Ibrokhim et al, 2008), grâce aux techniques de génotypage moléculaire à l'aide de marqueurs moléculaires, Le principe est de réaliser une corrélation statistique entre la variation phénotypique observée pour un caractère et la variation allélique observée au niveau génétique . Les marqueurs les plus couramment utilisés sont les microsatellites. Ces microsatellites sont hautement

polymorphes par la variation du nombre de répétitions et de ce fait très informatifs. . De plus, ils sont facilement détectables par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et reproductibles. Cependant, ces marqueurs sont fréquemment utilisés, car plus de 2000 microsatellites hautement polymorphes ont été ordonnés de manière précise (en moyenne, 1 tous les 1.6 cM) [Dib et al., 1996]. Ainsi que le degré de polymorphisme élevé des microsatellites est fortement apprécié pour les études d'association génétique ou, pour la cartographie de gènes impliqués dans La tolérance aux stress abiotiques.

L'introduction des variétés améliorées dans les programmes de croisement dans la zone méditerranéenne avec les variétés locales se caractérisant par une meilleure adaptation et une faible productivité, amènera à une meilleure compréhension du déterminisme génétique et physiologique de la réponse au manque d'eau et par conséquent améliorer la tolérance à la sécheresse chez le blé. L'objectif de ce travail est d'étudier à travers une caractérisation phénotypique basée sur l'analyse des caractères morpho-physiologique, et moléculaire à l'aide de marqueurs microsatellites, la relation entre les phénotypes et le génotype de vingt variétés de blé dur locales et exotiques sous conditions de manque d'eau.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal est formé de vingt variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf.) (locales et introduites) (tableau.1) , Nous ont été fournies par : l'institut technique des grandes cultures El khroub Constantine 'ITGC et des variétés obtenus dans le cadre du projet *Wheat* NEPAD

Tableau. 1. origine des génotypes étudiés

| N° | Varieties' | Origine | N° | Varieties' | Origine |
|----|----------------|-------------------|----|----------------|----------------------|
| 1 | Bensweif | Egypt | 11 | Beliouni | Algerie |
| 2 | Line3D | Egypt | 12 | Gta Dur | Cimmyt (Mexique) |
| 3 | Djenah Khetifa | Tunisie | 13 | Vitron | Espagne |
| 4 | Kyperounda | Espagne | 14 | Djenah Khetifa | Algerie |
| 5 | Oued znatie | Algerie | 15 | GG Rkham | ITGC Tiaret |
| 6 | Waha | Icarda | 16 | cannizzo | Italie |
| 7 | Cirta | Algerie | 17 | colosseo | Italie |
| 8 | Hedba3 | Algerie | 18 | Bouslem | Selection Itgc Setif |
| 9 | Bidi17 | Selection Algerie | 19 | Amar1 | Syrie |
| 10 | Rahouia | Algerie | 20 | Beltagy2 | Syrie |

Conduite de l'essai

Dix graines sont mises à germer dans des boites de pétrie. Après germination, les plantules sont repiquées dans des pots en plastique sur un mélange de terre/sable 3 / 1 . Les pots sont disposés d'une manière aléatoire (randomisation totale). Les plantes sont irriguées à la capacité aux champs des pots jusqu'au stade floraison. A ce stade les pots sont séparés en

deux lots. Chaque lots à subit un traitement hydrique différent jusqu'à la fin de l'essai: le premier lot concerne les plantes témoins, il est irrigué à saturation. Parallèlement le deuxième lot est privé d'irrigation, il représente les plantes stressées. Les pots de ce dernier sont pesés quotidiennement afin de quantifier les pertes en eau du sol et par conséquent estimer la capacité au champ en fonction de la durée de privation de l'irrigation (réduction de la capacité au champ). Les taux de réduction retenus, dans cette étude, sont 100%, 50% et 10% de la capacité au champ. Le maintien de ces seuils de capacité au champ, nous permet de tester les variétés étudiées sur plusieurs niveaux de stress hydrique, Témoin (100%), modéré 50% et stress sévère. 10%CC. L'essai est réalisé sous serre, sous une moyenne de température de $36.75 \pm 10^{\circ}\text{C}$ et une humidité de l'air de $47.55 \pm 8 \%$.

Caracterisation phénotypique

Mesure de la chlorophylle (Unité SPAD)

Le taux de chlorophylle est déterminé à l'aide d'un chlorophylle meter , model MINOLTA de type SPAD). Avant toute mesure, l'appareil doit être réglé (nombre de signal par tour) et calibré (N=0). Dans ce protocole le taux de chlorophylle est évalué par unité SPAD.

Teneur relative en eau TRE%

La teneur relative en eau (TRE %) ou (RWC), a été mesurée à partir de la formule de (Clarck et Mc-Caing ,1982)

Intégrité cellulaire

Ce paramètre est réalisé à l'aide d'un appareil portatif de mesure conductivimetre . Le pourcentage des cellules endommagées est estimé par la formule suivante : $(C1/C2)*100$ avec C1 étant la conductance lue à 50°c et C2 est celle lue à 100°c (Saad Allah et al, 1990).

Surface foliaire (cm2)

Résistance stomatique

La résistance stomatique est mesurée à l'aide d'un appareil portatif de mesure (poromètre (AP4) à point de rosée). Les mesures sont effectuées au stade floraison sur la feuille étandard complètement attachée en raison de trois répétitions pour chaque mesure. La résistance stomatique est estimée par $m2.s.mol^{-1}$.

Caractérisation moléculaire

L'étude moléculaire a été réalisé, au niveau de l' ICARDA Syrie .

Extraction et quantification de l'ADN

L'extraction d'ADN a porté sur 50 mg de jeunes feuilles prélevées à partir des plantes âgées de 12 jours. L'ADN a été extrait à partir des feuilles , broyées dans l'azote liquide selon la méthode de . Saghai-Marroof (1984),

Marqueurs microsatellites utilisés

Un jeu de 25 marqueurs microsatellites pour les locus étudiés, Les noms de ces marqueurs, leurs séquences, les motifs de base et leur taille sont présentés dans le Tableau. 2, les marqueurs sont de deux types, obtenus par deux sources : les de marqueurs de type Xgwm ou WMS (Xgwm; Roider et al., 1998) le deuxième type; wheat microsatellite consortium (WMC) a été sélectionné dans la base de données www.graingenes.org. Ces marqueurs moléculaires ont été utilisés pour examiner la diversité génétique des écotypes locales et introduites. Le génotypage a été réalisé après amplification par PCR avec des amorces fluorescentes (tableau.2). Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur Applied Biosystems, Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées au cours de ce travail sont données dans le tableau.2. Chaque échantillon de PCR est constitué d'un mélange de Mix avec un volume final de 10 µl : contenant un mélange optimisé de 1× PCR buffer, 2.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP mix, 0.05µM de chaque amorce (Au total, 26 loci ont été utilisés initialement, les informations relatives à ces loci sont présentées au tableau.2). 1.0U Taq polymerase, (purifiée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*), et 60 ng de DNA. Les thermocycles utilisés sont basés sur les conditions générales suivantes : une étape de dénaturation initiale de 4 min à 94°C, 35 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94°C (60 sec),- une étape d'hybridation des amorces à une température spécifique 58-60°C de ces dernières (1 min), une étape d'élongation à 72°C (1 min) et une étape d'élongation finale (7 min) à 72°C. La microplaque a été placée dans un thermocycleur Applied biosystems. Un contrôle sur gel d'agarose à 2 % des produits de PCR est réalisé afin de vérifier la qualité de l'amplification. La plaque est mise à l'abri de la lumière à l'aide d'une feuille aluminium pour éviter la dégradation du fluorochrome.

Migration sur séquenceur

Dans un souci d'économie et de rapidité, les produits de PCR d'un même individu ont été groupés par trois selon le fluorochrome utilisé au cours de la PCR. Cela permet de faire migrer au cours d'un même run d'analyse les produits de trois marqueurs. Les allèles de ces derniers sont différenciés par la couleur du fluorochrome porté par les amorces de PCR VIC (tétrachloro_uorescéine, _uorescent dans le vert), FAM (5-carboxy fluoescéine, fluuorescent dans le bleu) et HEX (6-carboxy 2',4',7',4,7 -hexachloro fluuorescéine, _ fluuorescent dans le jaune). (lecture trois à trois, fluorochrome Fam couplé avec un fluorochrome Hex et Vic). Cette stratégie a été appliquée à l'ensemble des marqueurs microsatellites analysés. On prélève 1 µL de produit PCR pour chaque microsatellite, que l'on place dans le même puits du génotypeur (multiplexe) contenant 5 µL de Formamide 5µL ROX (formamide, Applied

biosystems) (Le ROX sert d'étalonnage pour les poids moléculaires) contenant un marqueur de taille Genescan G350 . (qui stabilise la dénaturation de l'ADN) et 0,3 µL de marqueur de taille (rouge). A l'aide d'un thermocycleur, on chauffe notre mélange à 95°C pendant 5 min, puis on le place tout de suite dans la glace (pendant au moins 10 min) afin de stopper toute renaturation éventuelle de l'ADN. La microplaque est alors centrifugée (1500 tours/min pendant 1 min) afin d'éliminer les éventuelles bulles qui rendraient impossible l'injection de la solution dans le capillaire et donc l'analyse de l'échantillon. Les paramètres de l'analyse sont rentrés dans le génotypeur (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems), notamment : la gamme de coloration utilisée Le temps de migration est fixé à 3 h.

Analyse statistique des données

L'analyse de la variance a été effectuée par le logiciel SAS ainsi que les traits quantitatifs par le SPSS V.15 .

Etude d'association entre phénotype et génotype

Les données génotypiques et phénotypiques simulées sont soumises a un test d'association par régression logistique sous TASSEL 2.0.1 software (<http://www.maizegenetics.net/>).en prenant en compte la matrice de structure génétique optimale.

| Tableau. 2 Description des marqueurs SSR utilisés len; lenght , lab; labels ,ps;product size loc,localisation | | | | | | |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|------------|------------|----------------|------------|
| Marker | Forward Primer (5' -> 3') | Reverse Primer (5' -> 3') | len | lab | ps (pb) | loc |
| <i>WMC54</i> | TATTGTGCAATCGCAGCATCTC | TGCGACATTGGCAACCACTTCT | 22 | NED | 142 | 3B |
| <i>wmc63</i> | GTGCTCTGGAAACCTTCTACGA | CAGTAGTTTAGCCTTGGTGTGA | 22 | VIC | 192 | 2A |
| <i>WMC78</i> | AGTAAATCCTCCCTTCGGCTTC | AGCTTCTTTGCTAGTCCGTTGC | 22 | Fam | 241 | 3B |
| <i>WMC105</i> | AATGTCATGCGTGTAGTAGCCA | AAGCGCACTTAACAGAAGAGGG | 22 | Fam | 192 | 6B |
| <i>WMC_150</i> | CATTGATTGAACAGTTGAAGAA | CTCAAAGCAACAGAAAAGTAAA | 22 | NED | 165 | 2A |
| <i>WMC_153</i> | ATGAGGACTCGAAGCTTGGC | CTGAGCTTTTGC GCGTTGAC | 20 | Fam | 177 | 3A |
| <i>WMC_165</i> | CACACTCGCACGATTTTCCTAT | TCGGTTACTGGAAGTGGTCT | 22 | NED | 188-193 | 3A |
| <i>WMC167</i> | AGTGGTAATGAGGTGAAAGAAG | TCGGTCGTATATGCATGTAAAG | 22 | VIC | 185 | 2B |
| <i>WMC168</i> | AACACAAAAGATCCAACGACAC | CAGTATAGAAGGATTTTGAGAG | 22 | Fam | 319 | 7A |
| <i>WMC177</i> | AGGGCTCTCTTTAATTCTTGCT | GGTCTATCGTAATCCACCTGTA | 22 | VIC | 184 | 2A |
| <i>WMC179</i> | CATGGTGGCCATGAGTGGAGGT | CATGATCTTGCGTGTGCGTAGG | 22 | VIC | 184 | 2A |
| <i>WMC235</i> | ACTGTTCTATCCGTGCACTGG | GAGGCAAAGTTCTGGAGGTCTG | 22 | VIC | 235 | 5B |
| <i>WMC307</i> | GTTTGAAGACCAAGCTCCTCCT | ACCATAACCTCTCAAGAACCCA | 22 | NED | 145 | 3B |
| <i>WMC322</i> | CGCCCCACTATGCTTTG | CCCAGTCCAGCTAGCCTCC | 17 | NED | 95 | 3A, 3B |
| <i>WMC445</i> | AGAATAGGTTCTTGGGCCAGTC | GAGATGATCTCCTCCATCAGCA | 22 | Fam | 229 | 5A |
| <i>WMS06</i> | CGT ATC ACC TCC TAG CTA AAC TAG | AGC CTT ATC ATG ACC CTA CCT T | 22 | VIC | 207-196 | 4B |
| <i>WMS108</i> | ATT AAT ACC TGA GGG AGG TGC | GGT CTC AGG AGC AAG AAC AC | 20 | Fam | 135-137 | 3B |
| <i>WMS118</i> | GAT GGT GCC ACT TGA GCA TG | GAT TG TCA AAT GGA ACA CCC | 20 | Fam | 110 | 5B |
| <i>WMS135</i> | TGT CAA CAT CGT TTT GAA AAG G | ACA CTG TCA ACC TGG CAA TG | 20 | VIC | 153-176 | 1A |
| <i>WMS149</i> | CAT TGT TTT CTG CCT CTA GCC | CTA GCA TCG AAC CTG AAC AAG | 21 | NED | 161 | 4B |
| <i>WMS169</i> | ACC ACT GCA GAG AAC ACA TAC G | GTG CTC TGC TCT AAG TGT GGG | 22 | VIC | 220 | 6A |
| <i>WMS198</i> | TTG AAC CGG AAG GAG TAC AG | TCA GTT TAT TTT GGG CAT GTG | 20 | Fam | 130 | 4A |
| <i>WMS30</i> | ATC TTA GCA TAG AAG GGA GTG GG | TTC TGC ACC CTG GGT GAT TGC | 21 | VIC | 196-205 | 3A |
| <i>WMS304</i> | AGG AAA CAG AAA TAT CGC GG | AGG ACT GTG GGG AAT GAA TG | 20 | VIC | 202 | 5A |
| <i>WMS375</i> | ATTGGCGACTCTAGCATATACG | GGGATGTCTGTTCCATCTTAGC | 22 | NED | 156-204 | 4B |

Résultats et discussion

Les résultats obtenus, sont regroupés sous forme d'histogramme (Figure.1). cependant, on note une forte variabilité significative entre les variétés et entre les traitements. La distribution de la variation suit une loi normale, à variation phénotypique continue, quantitative. La normalité de la distribution de la variation quantitative des caractères résulte de l'action combinée de nombreux gènes et de l'impact de l'environnement sur l'expression phénotypique. La distribution continue des caractères quantitatifs peut être expliquée par l'implication de nombreux locus et du milieu dans les variations observées. Ces locus expliquant la variation de caractères quantitatifs sont appelés QTL (Quantitative Trait Locus). dans cette étude, l'ensemble des variétés étudiées présentent une chute considérable et hautement significative ($p < 0.01$) (Tableau. 3) du taux de chlorophylle sous régime hydrique sévère (10% CC), en revanche, en condition de bonne alimentation en eau les résultats obtenus montrent des valeurs presque avec une moyenne de l'ordre de 41,6 U.SPAD pour l'ensemble des variétés étudiées. La diminution de la teneur chlorophylle chez des plantes stressées est citée par plusieurs auteurs comme étant l'une des causes majeures de la réduction de la croissance et de la productivité (Guerfel et al, 2009; Ghobadi et al, 2011 et Wang et al, 1997). Ces résultats confirment les observations de Bousba et al 2009, qui montrent que le manque d'eau induit une chute de la teneur en chlorophylle dans les feuilles. La variation de la teneur en eau relative sous différents niveaux de stress hydrique, apporte une information complémentaire sur l'état hydrique de la plante et sur le comportement des variétés vis-à-vis la contrainte hydrique. Cependant les taux de la teneur relative en eau passe de 68,41 % à 37,49 % chez le stressé de la variété *Collesseo*. La TRE est un paramètre hautement influencée par le stress hydrique et qui décrit la capacité de la plante à se maintenir hydratée en conditions déficitaires. Selon (Kacperska, 2004 ; Arraouadi. et al, 2011), le maintien de valeur assez élevée de la teneur en eau relative, en condition de stress peut résulter de deux mécanismes d'adaptation : maintien d'une élasticité élevée des tissus, ou diminution de la pression osmotique. En outre, pour les différentes variétés la mesure de la conductivité cellulaire présente une variabilité génotypique importantes, les différences sont hautement significative ($p < 0.01$). Les valeurs enregistrés montrent une augmentation de ce paramètre allant de 19.15% sous régime non déficitaire

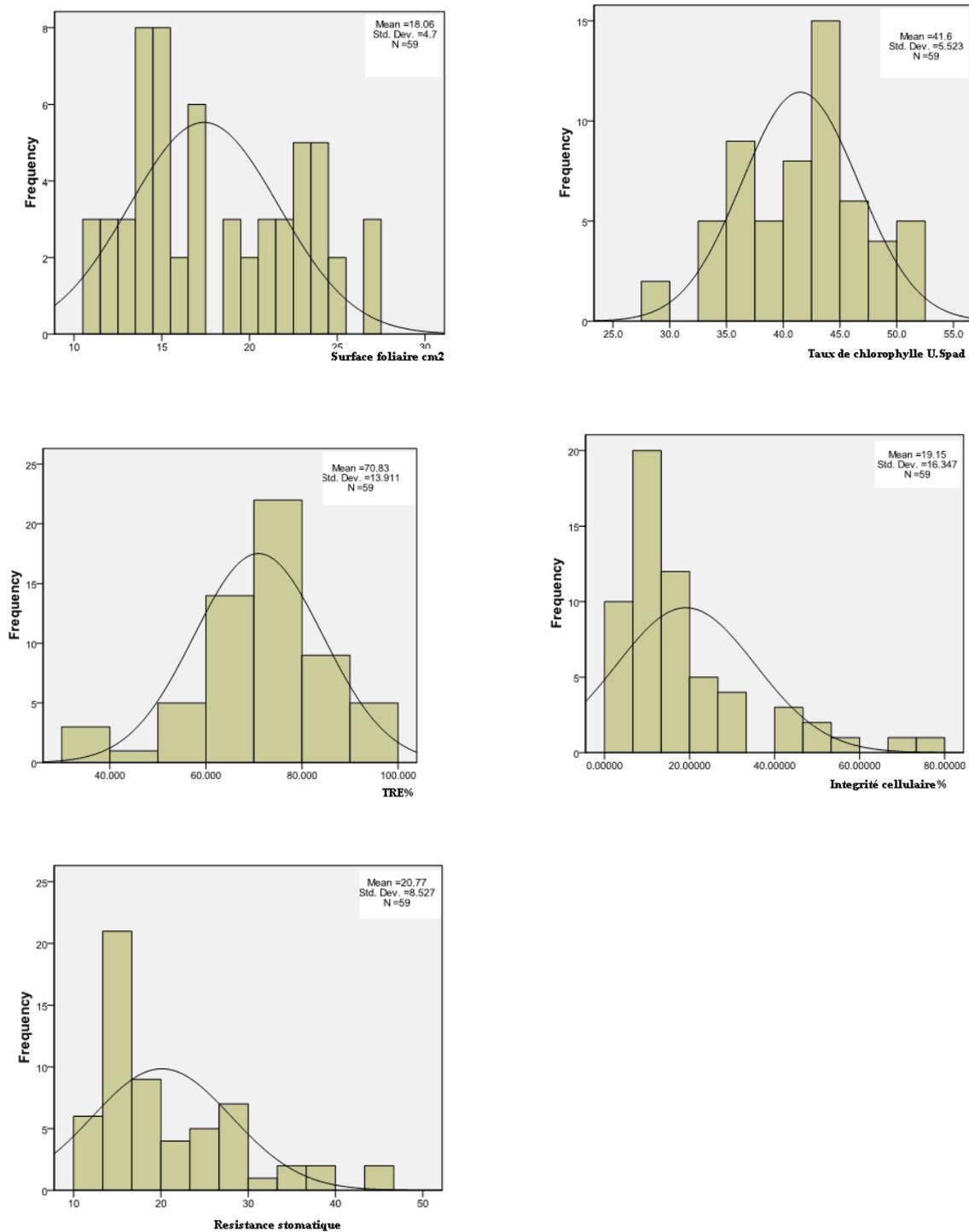


Figure .1a Témoin (100% CC)

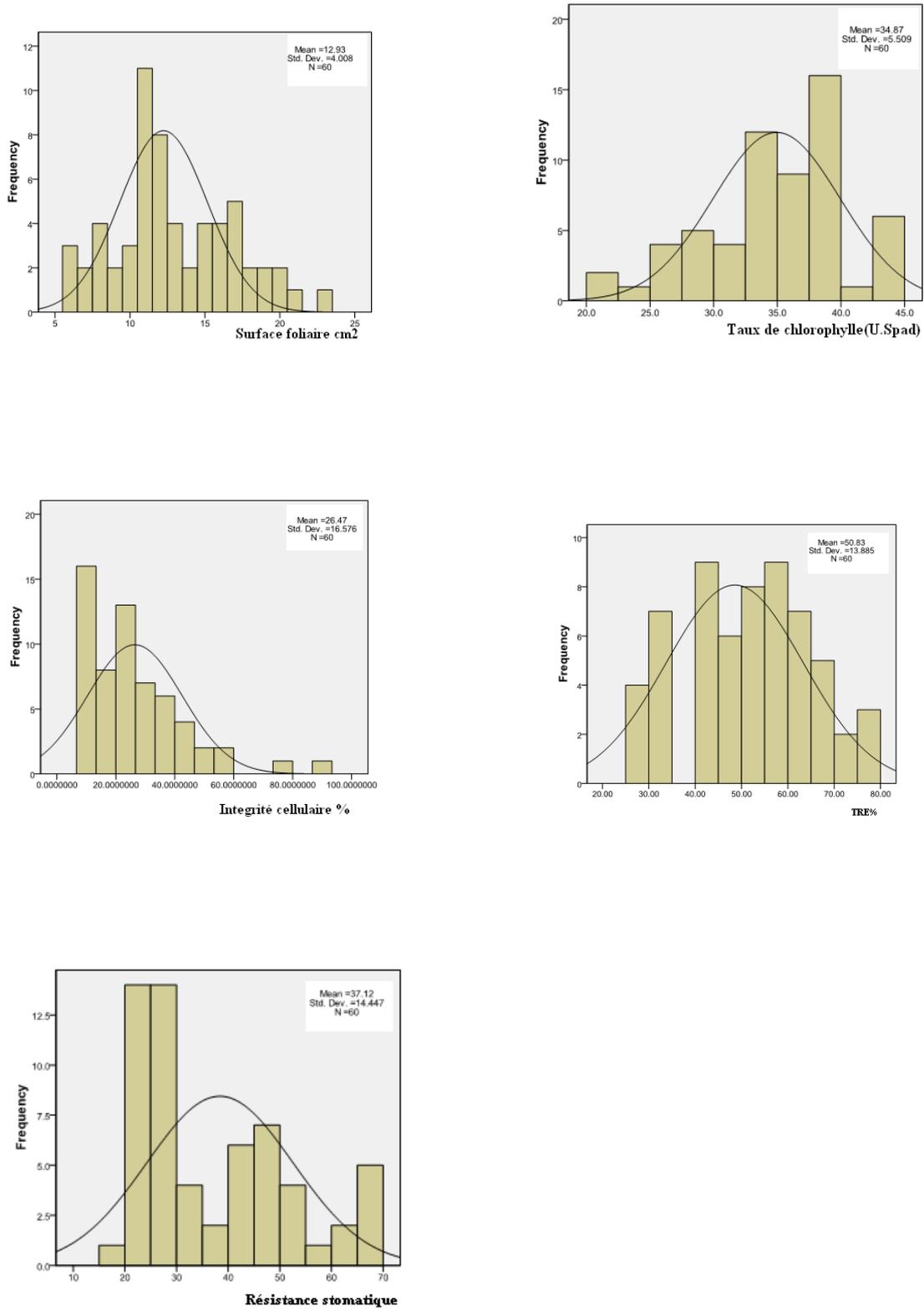


Figure .1 b (50% CC)

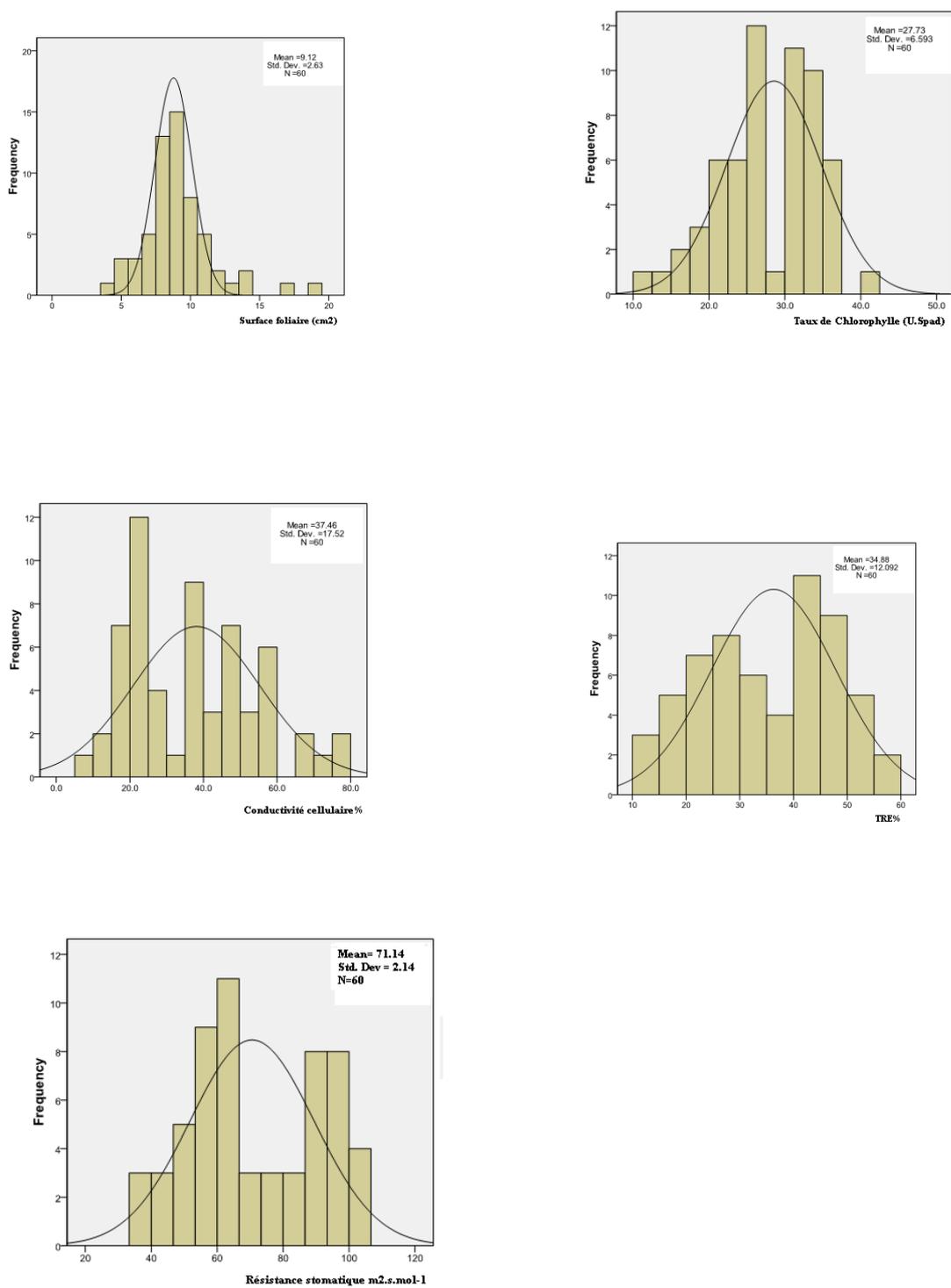


Figure. 1c (10% CC)

Figure 1. Distribution des caractères morpho physiologiques dans les variétés étudiées sous Différents niveaux d'alimentation hydrique a : témoin, b :S1 50%CC et c : S2 10%CC.

(100%cc) jusqu'au 40% sous un régime déficitaire . Plusieurs auteurs ont confirmé que la carence hydrique, provoque une déstabilisation des membranes plasmiques, ce qui a par conséquent une perte d'électrolytes et la fuite d'ions (dont les ions Ca^{2+} à travers la membrane plasmique qui contribue à la perte de turgescence (Campos et al , 2003), une valeur élevée de ce pourcentage traduit une forte fuite d'ions à travers les membranes donc des membranes instables, affectées par le stress .

Tableau. 3 Analyse de la variance des variables étudiées

| Source de variation | Taux de Chlorophylle (U.Spad) | | | | | TRE% | | | | Conductivité cellulaire% | | | |
|------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-------------|----------|-----------|-----------|-------------|----------|--------------------------|-----------|-------------|----------|
| | <i>dd</i> | <i>SC</i> | <i>MC</i> | <i>Fcal</i> | <i>P</i> | <i>SC</i> | <i>MC</i> | <i>Fcal</i> | <i>P</i> | <i>SC</i> | <i>MC</i> | <i>Fcal</i> | <i>P</i> |
| Genotypes | 19 | 4068.8 | 214.1 | 22.76 | 0** | 1483.8 | 780.9 | 12.4 | 0* | 36416.8 | 1916.7 | 46.19 | 0** |
| Treatments | 2 | 6033.2 | 3016.6 | 320.63 | 0*** | 3949.0 | 19745.1 | 315.4 | 0* | 10136.1 | 5068.1 | 122.152 | 00* |
| genotypes x treatments | 38 | 884.6 | 23.3 | 2.47 | 0*** | 8829.1 | 232.3 | 3.71 | ** | 7816.9 | 205.7 | 4.958 | 0** |
| Total | 12 | 0 | | | | | | | | | | | |

*, ** et *** significative à 5% , 1% et 0.1% respectivement ns : non significative

Nos résultats montrent que la contrainte hydrique influe sur plusieurs variables ce qui affecte leur morphologie. Cependant on assiste à une réduction de la surface assimilatrice, la moyenne de ce paramètre passe de (20.88cm²) enregistré chez la variété Collesseo à (7.77 cm²) noté chez la variété locale Rahouia. En effet cette contrainte entraîne une réduction hautement significative de la surface foliaire chez l'ensemble des variétés étudiées (Tableau. 4) et notamment chez les variétés locales, ce qui pourrait mettre en évidence leur stratégie appropriée pour résister au manque d'eau, cela par le mécanisme d'économie d'eau. Cette stratégie est identifiée par (Passioura J.2007 ; Anyia et al , 2004) . la résistance stomatique développée par les vingt variétés est également significativement affectée par le régime déficitaire en eau (p<0.05) (Tableau. 4) . Les différences s'observent dès l'installation du stress hydrique et la résistance stomatique augmente au fur et à mesure que le stress devient plus sévère (10%cc) . Nos résultats, sont en accord ceux de (Cornic , 2008 ; Ykhlef et al , 2000) qui ont signalé que le blé dur sous condition de manque d'eau, semble favoriser la

première stratégie qui consiste à activer la fermeture des stomates et à limiter l'intensité de la transpiration par les plantes. selon ces auteurs la fermeture des stomates provoque une diminution de concentrations de CO₂ au niveau des sites de carboxylation qui va se traduit automatiquement par une augmentation de la photo respiration et par une production de CO₂ immédiatement fixé puis relâché.

Tableau. 4 Analyse de la variance des variables étudiées

| Variables | Surface foliaire (cm ²) | | | | | résistance stomatique m ² .s.mol ⁻¹ | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|---------|---------|-------|------|---|----------|-------|------|---|
| | Source de variation | ddl | SC | MC | Fcal | P | SC | MC | Fcal | P |
| Genotypes | 19 | 2025.68 | 106.61 | 54.64 | 0*** | 18691 | 963.74 | 13.61 | 0** | |
| traitements | 2 | 2475.3 | 1237.65 | 634.2 | 0*** | 83927 | 41963.34 | 589.3 | 0** | |
| genotypes x traitements | 38 | 457.86 | 12.04 | 6.17 | 0*** | 12049 | 317.06 | 4.45 | **0 | |
| Total | 120 | | | | | | | | | |

*, ** et *** significative à 5% , 1% et 0.1% respectivement ns : non significative

Associations marqueur - phénotype

En considérant les traitements séparément, le nombre des associations significatives indiquant les présences de QTLs a varié de 1 à 7 QTLs par caractère. Certains loci ont été spécifiques aux conditions de stress hydrique tel que ceux associés aux marqueurs *WMS135*, *WMC54*, *WMC63* *WMC165*, *WMC 150*, *WMC167*, *WMS198*, *WMC177*, *WMS6* et *WMC235* localisés sur les chromosomes 1A, 3B, 2A, 3A, 2A, 2B, 4A, 2A, 4B et 5B , qui sont impliqués respectivement dans la variation des caractères Taux de chlorophylle, RWC, l'intégrité cellulaire, la surface foliaire et la résistance stomatique (tableau.5) . Par contre les marqueurs *WMC445* et *WMS30* ont été spécifiques au condition non déficitaire en eau .D'autres marqueurs sont communs aux deux conditions hydriques tel que les marqueurs *WMC 177*, *WMC63*, *WMC 165*, *WMC54*, *WMC150* et *WMC267*. D'autre part, certains marqueurs sont associés à un seul caractère tel que le marqueur *WMC177*, tandis que d'autres sont associés à la variation de plusieurs caractères à la fois, tel que les marqueurs *WMC167* impliqué dans la variation des traits suivants l'intégrité cellulaire, la surface foliaire et la résistance stomatique ce locus est localisé sur le chromosome 2B et le marqueur *WMC54* significativement associé au taux de chlorophylle et l'intégrité cellulaire localisé sur le chromosome 3B , ce qui montre que le caractère quantitatif est le résultat de l'expression de plusieurs gènes qui influencent partiellement le caractère (De Vienne et Causse, 1998).(Roy et al, 2006 ; Xiaoqing Y et al, 2011). Ces différents QTLs identifiés sont résumés dans le tableau.5. ainsi que d'autres QTLs décrits dans la littérature situés au niveau des mêmes régions chromosomiques, ont été détecté Diab et al, 2008 ont localisés des QTLs et des gènes candidats de tolérance à la sécheresse sur le chromosomes 1B, 2A, 3B, 4B, 5A, 5B, associés avec les caractères physiologiques Ainsi que Le loci *Loxmjt* et *Lox11-1* (only

PAR) gènes codant pour la lipoxygénase, co-segroupe avec les QTLs pour les traits physiologiques sur le 4B et 5B . Bell et Mullet, 1991, rapportent que La lipoxygénase est une enzyme qui catalyse l'hydro peroxydation des acides gras modulés par le déficit hydrique, ainsi ils montrent son rôle important dans la sénescence , la résistance au stress biotique et impliqué dans la biosynthèse de l'ABA (hormone de stress) (Vick and Zimmerman, 1987).

Tableau,5 Corrélations des marqueurs avec les différents caractères étudiés

| Traitement Traits | T | | S1 | | S2 | |
|-----------------------------|----------|----------|----------|--------|----------|---------|
| | marqueur | P | marqueur | P | marqueur | P |
| taux de chlorophylle | WMC177 | 0.05* | WMS135 | 0.01** | WMS135 | 0.04* |
| | | | WMC54 | 0.04* | WMC54 | 0.00*** |
| TRE% | WMC63 | 0.019* | | | | |
| | WMC165 | 0.042* | WMS06 | 0.05* | | |
| | WMC445 | 0.042* | | | | |
| | WMC54 | 0.042* | | | | |
| intégrité cellulaire | WMC63 | 0.000*** | WMC63 | 0.01** | WMC63 | 0.03* |
| | WMC165 | 0.016** | WMC165 | 0.03* | WMC165 | 0.04* |
| | WMC445 | 0.001** | WMC150 | 0.00** | | |
| | WMC150 | 0.006** | WMC177 | 0.03* | | |
| | WMC54 | 0.007** | WMS198 | 0.04* | | |
| | WMC167 | 0.016* | WMC54 | 0.05* | | |
| | WMS30 | 0.001** | WMC167 | 0.05* | | |
| surface foliaire | | | WMC167 | 0.02** | WMC177 | 0.05* |
| | | | | | WMS06 | 0.04* |
| | | | | | WMC235 | 0.04* |

Les probabilités de signifiante sont indiquées en symbole : *P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

References:

- Anyia, A.O., Herzog, H., 2004. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *Eur. J. Agron.* 20, 327.
- Arraouadi.S, M. Badri, A. Zitoun, T. Huguet, and M. E. Aouani, 2011, Analysis of NaCl Stress Response in Tunisian and Reference Lines of *Medicago truncatula* *Russian Journal of Plant Physiology.* 58, 316–323
- Bell E, Mullet JE (1991). Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* 230: 456-462.
- Bousba R.,Ykhlef . N andDjekoun .A, 2009. Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum* Desf). *World journal of agricultural sciences* 5(5) : 609- 616

Campos P.S., Quartin V., Ramalho J.c., et Nunes M.A., 2003: Electrolyte leakage and lipiddegradation account for cold sensitivity in leaves of Coffea sp. plants. *Journal of PlantPhysiology* 160, 283-292.

Clarke J.M, (1987). Effect of leaf rolling water loss in *triticum spp.* *Can. J. Plant Sci.* (66): 885-891.

Gabriel Cornic. (Janvier 2008) : Effet de la contrainte hydrique sur la photosynthèse foliaire: De l'utilisation expérimental des relations A/Ci et ACc, article, 36 P

De Vienne D, Causse M (1998) La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs In: De Vienne D (eds) Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales. INRA éditions, pp 89-118

DIAB AA, KANTETY RV, OZTURK NZ , BENSCHER D, NACHIT MM, SORRELS ME, 2008: Drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags associated with components of drought tolerance in durum wheat. *Sci Res Essays* 3: 9-26.

Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morisette, J., Weissenbach, J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152-154.

Delphine Fleury, Stephen Jefferies, Haydn Kuchel and Peter Langridge, 2010, Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 12, pp. 3211–3222,

Ghobadi ,M, S, Khosravi, DKahrizi and F,Shirvani, 2011 Study of Water Relations, Chlorophyll and their Correlations with Grain Yield in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes *World Academy of Science, Engineering and Technology* 78 582 -585

Guerfel Ma, Olfa Baccouri , Dalenda Boujnabh, Wided Char'bi , Mokhtar Zarrouk , 2009. Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure In the two main Tunisian olive (*Olea europea* L.) cultivars *Scientia Horticulturae* 119: 257- 263.

Ibrokhim Y. Abdurakhmonov and Abdusattor Abdukarimov, 2008 Application of AssociationMapping to Understanding the Genetic Diversity of Plant Germplasm Resources *International Journal of Plant Genomics* doi:10.1155/2008/574927 18 pages

Kacperska A., 2004: Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity *physiologia plantarum* 122, 168-

Maccaferri, M., M. C. Sanguineti, E. Natoli, J. L. Araus-Ortega et M. Bensalem l., 2006 A panel of elite accessions of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) suitable for association mapping studies. *Plant Genet. Resour.* 4: 79–85.

Passioura J. 2007. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* 58, 113–117.

Roder M..S, V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M. Tixier, A microsatellite map of wheat, *Genetics* 149 (1998) 2007–2023.

Roy et al, 2006 Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat *CURRENT SCIENCE*, VOL. 90, NO. 5, 10

Saghai Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 8014–8019.

Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage (TASSEL), <http://www.maizegenetics.net/tassel/>.

Vick BA, Zimmerman DC (1987). oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: Stumpf PK (ed) *The biochemistry of plants: A comprehensive treatise*, Vol 9. Academic Press, New York. pp. 53-90.

Wang L.W, A. MShowalter, I. A. Ungar, , 1997 effect of salinity on growth, ion content and cellwall in *Atriplex prostrata*, *Am. J. Bot.* **84**: 1247- 1255.

Xiaoqing Yua, Guihua Baib, Na Luo, Zhenbang Chenc, Shuwei Liua, Jianxiu Liud, Scott E. Warnkee, Yiwei Jianga, 2011, Association of simple sequence repeat (SSR) markers with submergence tolerance in diverse populations of perennial ryegrass *Plant Science* 180 391–398.

Ykhlef. N. Djekoun. A., Bensari. M. , Vignes D , 2000 ; l’efficacité de l’utilisation de l’eau marqueur physiologique de la resistance à la secheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf). *Sciences & technologie* , **10** : 87 - 92.