UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Caractérisation phénotypique via Grain Scan et génotypique via SSR de l'orge

Présenté par : BELMRHAR Laila

Encadré par :

- **Mme SQALLI Hakima (FST, Fès)**
- **Mr IRAQI Dris (INRA, Rabat)**
- **Mr SRIPADA Udupa (INRA/ICARDA, Rabat)**
- **Mme HENKRAR Fatima (ICARDA, Rabat)**

Soutenu le : 11/06/2019

Devant le jury composé de :

- Mme SQALLI Hakima
- Mme MANNI Laila
- Mme HENKRAR Fatima

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Tout d'abord, louange à Dieu qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes.

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 :

Mr. Khalid AMRANI JOUTEI coordonnateur de la filière (Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources).

Mes encadrants de l'INRA : Mr Driss IRAQI, coordinateur de l'unité de Recherche en Biotechnologie, qui m'a donné l'opportunité d'intégrer l'unité et a tenu confiance en moi pour m'avoir attribué des missions valorisantes durant mon stage .Mr Sripada UDUPA, biotechnologiste et généticien de l'ICARDA, pour son encadrement, sa grande sympathie à mon égard et ses efforts accomplis pour veiller sur la bonne réalisation de ce travail. Mme HENKRAR Fatima de m'avoir consacré de son temps avec beaucoup de sympathie. Je ne vous remercierais jamais assez Madame.

Mon encadrant : Mme Hakima SQALLI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour ses conseils, soutient, assistance, son sens de responsabilité et niveau aiguisé d'encadrement scientifique.

Toute l'équipe de l'unité de biotechnologie, et plus particulièrement à Mlle NYIRAGUHIRWA Solange pour son aide, soutient et ses conseils.

Mme MANNI Laila, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, d'avoir accepté de juger ce travail.

Mon oncle Mr MEZIAN Driss, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar el Mehraz pour ses conseils et son aide tout le long de mon parcours scolaire et universitaire.

Finalement, mes remerciements vont aussi à ICARDA, INRA Maroc, FAO/ITPGRFA, l'Union Européenne, la CRP-Blé et du Programme de subventions de collaboration ICARDA-Maroc pour leur soutien.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, je dis :

Merci

Dédicaces

Je dédie ce Modeste travail à toutes les personnes qui me sont très chères, et avec lesquelles j'ai tout partagé :

A mes très chers parents :

En témoignage de mon amour, mon affection et ma grande reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation et mon bien être afin que je puisse me consacrer de mes études.je leur présente mon travail si modeste, mais qui sera certes un premier pas pour leur rendre hommage et les remercier pour leurs grands efforts accomplis à mon égard.

A ma chère sœur Sara et mes chers frères Soufiane et Ilyas :

Merci pour votre soutien, je vous souhaite une vie comblée et une félicité éternelle et de réussite, je vous aime.

Aux familles BELMRHAR et GHIBOUB :

Je vous prie de trouver dans ce travail, le témoignage de mon affection, et ma prière pour vous de santé, de bonheur et de réussite.

A mes cousins et cousines :

Nour, Zahra ,Btissam, Aya , Zayd, Hamza , Amine et plus particulièrement à Soukaina , pour son accueil durant mon séjour à Rabat, son aide et ses conseils .je vous aime toutes et tous.

A mes chers ami(e)s :

Hanae, Rim, Rania, Zakaria, Mustapha et Youssef .je vous aime

A mes collègues :

A toute la promotion licence Biotechnologie et valorisation des Phyto-Ressources 2018/2019. Bon courage à toutes et à tous je vous souhaite un avenir radieux.

A ceux qui auront l'occasion d'avoir ce modeste travail entre les mains.

LISTE DES FIGURES

		Page
Figure 1 :	**Distinction entre l'orge à 2 rangs et l'orge à 6 rangs.**	**2**
Figure 2 :	**Evolution de la superficie (en million d'ha), production (en million de t) et rendements (en hg/ha) de la culture d'orge pendant les deux dernières décennies (FAO, 2018).**	**6**
Figure 3 :	**Profil électrophorétique du test qualité de15 accessions d'orge sur gel d'agarose 1.2%.**	**14**
Figure 4a :	**Profils électrophorétiques des marqueurs SSR utilisés sur gel d'acrylamide 6% les amorces Bmac0113 et Bmac0316**	**14**
Figure 4b :	**Profils électrophorétiques des marqueurs SSR utilisés sur gel d'acrylamide 6% les amorces Bmac0032 et Bmac0040**	**15**
Figure 5 :	**Dendrogramme montrant la relation génétique entre 15 accessions d'orges**	**18**

LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau 1 :	**d'orge nouvellement commercialisées au Maroc.**	**4**
Tableau 2 :	**Production mondiale d'orge (en Mt) de 2005 à 2010 (FAO, 2010).**	**5**
Tableau 3 :	**Comparaison des marqueurs moléculaires les plus utilisés chez l'orge (Becker et Heun, 1995).**	**8**
Tableau 4 :	**Accessions utilisées dans l'analyse génotypique.**	**9**
Tableau 5 :	**Composants du Master Mix et volumes nécessaires.**	**11**
Tableau 6 :	**Marqueurs SSR utilisés, séquence d'amorce, taille prévu, température d'hybridation (Tm) et localisation chromosomique.**	**12**
Tableau 7 :	**Génotypes individuels révélés pour chaque amorce.**	**15**
Tableau 8 :	**Diversité génétique calculée chez les 15 accessions d'orge.**	**16**
Tableau 9 :	**La distance génétique mesurée entre les différentes accessions**	**17**
Tableau 10 :	**Mesures statistiques de l'aspect des graines établi par « Grain scan »**	

LISTE D'ABREVIATIONS

ADN :	**Acide DesoxyriboNucleique**
AFLP:	**Amplified Fragment LengthPolymorohism**
APS:	**Ammonium PerSulfate**
BET:	**Bromure d'Ethidium**
CTAB:	**Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide**
dNTP:	**2'-DesoxyriboNucleoside 5'-Triphosphate**
EDTA:	**Ethylene Diamine Tetraacetic Acid**
FAO :	**Food and Agriculture Organisation**
ICARDA:	**International Center for Agricultural Research in the Dry Areas**
NJ :	**Neighbour-Joining**
Pb :	**Paires de Bases**
PCR :	**Polymerisatio Chain Reaction**
PIC :	**Polymorphism Information Content**
RAPD :	**Random Amplified PolimorphicDNA**
RFLP :	**Restriction Fragment Length Polymorphism**
SSR :	**Simple Sequence Repeat**
TBE :	**tampon Tris-Borate-EDTA**
TEMED :	**TetraMethyl-Ethylene-Diamine**
TRIS :	**Trishydroxymethylaminomethane**
UV :	**Ultraviolet**
µl :	**Micro Litre**

SOMMAIRE

	Page
Introduction générale	**1**
Revue bibliographique	
I. Généralités sur l'orge	**2**
1. Taxonomie	**2**
2. Historique	**3**
3. Description botanique	**3**
4. Différentes variétés de l'orge	**4**
5. Production mondiale et importance économique	**5**
6. l'importance économique de l'orge au Maroc	**5**
7. Importance nutritionnelle de l'orge	**6**
II. Caractérisation phénotypique et Génotypique de l'orge	**6**
1. Etude phénotypique en utilisant le Grain Scan	**6**
2. Etude génotypique par des marqueurs moléculaires.	**7**
Matériels et Méthodes	
I. Analyse génotypique	**9**
1. matériel biologique	**9**
2. extraction d'ADN	**9**
3. Test qualité	**10**
4. Technique de la PCR	**11**
5. Analyse des données	**13**
II. Analyse phénotypique	**13**
1. Matériel biologique	**13**
2. Grain Scan	**13**
Résultats et Discussion	
I. Evaluation du polymorphisme moléculaire	**14**
1. test qualité	**14**
2. Amplification par PCR	**14**
3. Distance génétique de Nei	**16**
4. Le dendrogramme	**17**
II. Evaluation du polymorphisme phénotypique en étudiant l'aspect de la graine	**18**
Conclusion générale	**20**
Références bibliographiques	**21**
Références bibliographiques	**22**

Présentation de la structure

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est un organisme public dont les origines remontent à 1914 avec la création de deux stations à Rabat et à Marrakech. La création officielle de l'INRA a eu lieu en1980 dont la mission principale est d'entreprendre les recherches pour le développement agricole au Maroc.

Les objectifs globaux sont :

- Améliorer la productivité, la compétitivité et la durabilité de la production agricole,
- Caractériser, préserver et valoriser les ressources naturelles,
- Améliorer la qualité, valoriser et diversifier les productions végétales et animales,
- Analyser la demande sociale et les systèmes de production.

Objectifs de l'INRA :

Amélioration de la productivité compétitivité et durabilité de la production agricole

Amélioration et valorisation des productions végétales et animales

Analyser la demande sociale et les systèmes de production

Les divisions de l'INRA :

Division de la gestion des ressources humaines et financières (DGRHF)

Division scientifique (DS)

Division de l'information et de communication (DIC)

Constitué de huit départements scientifiques et dix centres régionaux de recherche agronomique

Organisation du CRRA Rabat :

Le centre régional de la recherche agronomique de rabat est divisé en quatre types de structures, selon la nature de la recherche effectuée

Unité de recherche su l'amélioration des plantes (PAM , culture fourragère, betterave a sucre et céréales)

Unité de recherche sur l'environnement et la conservation des ressources naturelles

Unité de recherche sur la production animale et fourragère

Unité de la biotechnologie Généralement focalisée sur :

- Sélection assistée et recherche de gènes d'intérêts pour l'amélioration des céréales pour la tolérance à la sécheresse, maladies et insectes ;
- Étude et valorisation des ressources génétiques chez les céréales et autres ;
- Recensement génétique et moléculaire des pathogènes, insectes et bactérie – levure chez les céréales, arbres fruits et autres.

Introduction générale

L’orge (*Hordeum vulgare*), originaire vraisemblablement d’Asie, est l’une des plus anciennes céréales cultivées. Il résulte de deux événements de domestication distincts qui se seraient produits dans le croissant fertile (Morelle et Grec, 2007). Au plan mondial vers la fin des années 80, l’orge figure au quatrième rang des céréales après le blé, le riz et le maïs. Cette espèce possède une caractéristique essentielle résidant dans son extraordinaire adaptation à des conditions extrêmes (Jestin, 1992).

L’orge est cultivée au Maroc depuis l’antiquité. Elle joue un rôle capital aussi bien en alimentation humaine qu’animale. Elle peut être cultivée dans toutes les régions agricoles du Maroc. L’orge couvre une superficie de 2.000.000 ha au Maroc, ce qui représente le 1/3 de l’ensemble des surfaces cultivées (Andich et Alaoui, 2003).

Pour l'utilisation rationnelle des ressources génétiques, l'information sur la diversité génétique est essentielle. Les techniques moléculaires se sont développées pour l’analyse génétique et la compréhension de la structure et le comportement du génome. Ces techniques moléculaires, en particulier, celles reposant sur les marqueurs moléculaires sont utilisées dans le domaine de la variation génétique.

Des marqueurs de microsatellites ou de répétitions de séquences simples (SSR) sont développés plus récemment pour les principales plantes cultivées. Les microsatellites sont 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).

Les marqueurs SSR sont abondants, dispersés dans tout le génome et présentent des niveaux de polymorphisme plus élevés que les autres marqueurs génétiques. En outre, ils 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. Ils sont 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, cette étude de la diversité par l’utilisation des marqueurs microsatellites, de 15 accessions d’orge est menée. Le principal objectif du présent travail est donc d’évaluer la diversité génétique des accessions d’orge par des approches phénotypiques et moléculaires, afin de comprendre les différences et les similitudes existantes entre elles. Cette étude 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.

Revue bibliographique

I. GENERALITES SUR L'ORGE

L'orge cultivée (*H. vulgare*), est généralement une plante diploïde (2n=14) et nettement autogame (Jestin, 1996). Des formes tétraploïdes (2n=28) peuvent apparaitre 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 grands types (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 2 rangs et l'orge à 6 rangs.

1. Taxonomie

La classification de l'orge est donnée comme suit :

Règne	*Plantae*
Division	*Magnoliophyta*
Classe	*Lilopsida*
Ordre	*Cyperales*
Famille	*Poaceae*
Genre	*Hordeum*

2. Historique

L'orge cultivée a probablement résulté de la domestication de l'espèce sauvage à deux rangs, *Hordeum vulgare spontaneum*, en Mésopotamie, il y'a 35.000-40.000 années. L'une des caractéristiques des espèces sauvages est la fragilité du rachis, critère important pour préserver l'espèce. Les premières domestications ont probablement concerné la recherche des types à rachis plus solide pour une meilleure adaptation à la récolte. La culture de l'orge a apparemment été pratiqué en Egypte il y'a 18.000 ans. L'orge à six-rangs a été cultivée aux environs de 6000 AC. Durant l'âge de la pierre, l'orge s'est répondu en Inde, Europe et Afrique du Nord.

3. Description botanique

3.1. Partie végétative

La partie végétative comme celle des autres céréales est composée des tiges cylindriques, creuses entre les nœuds, contenant 5 à 7 nœuds, et des feuilles attachées à chaque nœud. La feuille est souvent couverte de cire qui donne l'aspect blanchâtre. Certaines variétés ne produisent pas de cire, leurs feuilles sont donc brillantes. La feuille est composée d'une graine qui entoure la tige d'un limbe qui flotte librement et d'un collet qui relie les deux. Aux extrémités du collet se trouvent deux oreillettes qui embrassent la tige. Une petite membrane ligule est attachée au collet (Alaoui, 2005).

3.2. Partie reproductive

L'inflorescence est un épi qui contient trois épillets à chaque nœud du rachis. Le rachis est l'axe qui contient les épillets. Chaque épillet contient une seule flore. L'orge à six rangs aux trois flores fertiles, l'orge à deux rangs n'a que la flore centrale qui est fertile. Chaque flore est soutenue par une paire de glumes minces lancéolées portant une barbe fine. La graine est un caryopse entouré de deux enveloppes, l'Emma et Palea. La partie externe, l'Emma a généralement à son extrémité une barbe, un capuchon, ou une pointe arrondie ou pointue. Les deux enveloppes, l'Emma et Palea, adhèrent à la graine. Au battage elles se détachent de la graine dans le cas des orges nus. Les barbes peuvent être rugueuses ou lisses selon les variétés. Les barbes lisses le sont généralement à la base et deviennent rugueuses à l'extrémité. Les capuchons ressemblent à une fourchette à trois dents (Alaoui, 2005).

3.3. Graine

La graine peut être de couleur blanche, noire, rouge, violette, ou bleue, selon la concentration en pigments d'anthocyanine. La coloration bleue résulte de la présence d'anthocyanine dans les grains d'Aleurone. La présence d'anthocyanine dans le péricarpe donne la coloration rouge. La présence du pigment dans les deux tissues produit la coloration violette, visible dans les orges nues. La coloration noire est due à une substance semblable à la mélanine (Alaoui, 2005).

4. Différentes variétés de l'orge

Il existe plusieurs variétés récemment commercialisées possédant des caractéristiques agronomiques et qualitatives différentes (Tableau 1).

Tableau 1 : Variétés d'orge nouvellement commercialisées au Maroc.

variété	Zone d'adaptation	Poids de 1000 grains(g)	Précocité	Production de paille	Tolérance aux maladies
Tamellalt (2 rangs)	Bour	35-37	Précoce	Moyenne	Tolérante à la RB, à l'oïdium et à l'helminthosporiose
Azilal (2rangs)	Bour	35-37	Très précoce	Moyenne	Tolérante à la rouille et à l'oïdium.
Massine (6 rangs)	Bour favorable et irrigué	38-40	Semi précoce	Importante	Moyennement résistante à la rouille et tolérante à la cécidomyie.
Oussama (6 rangs)	Bour	35-37	Semi précoce	Importante	Moyennement résistante à la RJ et à l'oïdium.
Amira (6 rangs)	Bour	37-39	Semi précoce	Importante	Moyennement résistante à la RB et à l'oïdium et résistante à la cécidomyie.
Hispanic	Bour	37-39	Semi précoce	Faible moyenne	Moyennement sensible à la rouille et à l'oïdium.

RB : Rouille Brune RJ : Rouille Jaune

5. 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.

Les Etats-Unis, avec 61,5 millions de tonnes en 2010 (Tableau 2), se distinguent par la plus grande production en orge, soit l'équivalent de 41,75 % de la production mondiale. La Russie, l'Ukraine et le Canada viennent en seconde position.

Tableau 2: Production mondiale d'orge (en Mt) **de 2005 à 2010 (FAO, 2010)**

Pays	2005-2006	2006-2007	2007-2008	2008-2009	2009-2010
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

6. 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 était 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 (Saidi *et al.*, 2001).

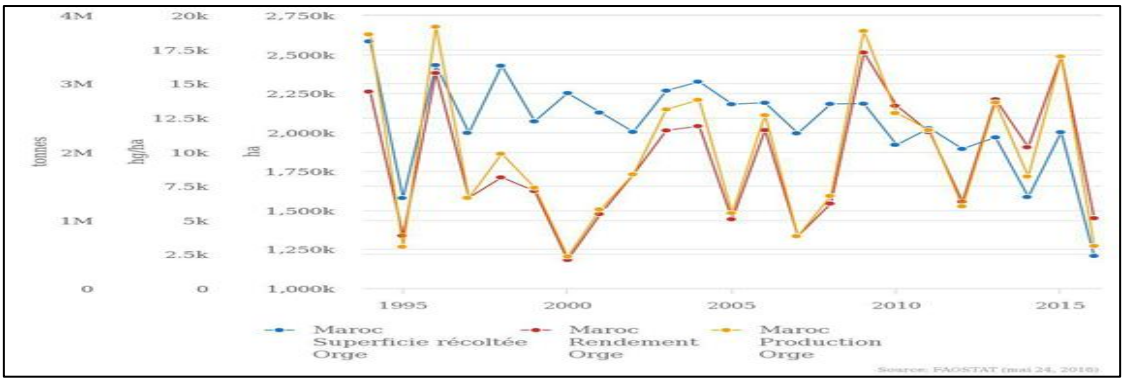


Figure 2: Evolution de la superficie (en million d'ha), production (en million de t) et rendements (en hg/ha) de la culture d'orge pendant les deux dernières décennies (FAO, 2018).

7. 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.

II. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DE L'ORGE

1. Etude phénotypique en utilisant le "Grain Scan"

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 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 (couleur des feuilles, taux de graines) (Batlle et Tous, 1997 ; Gharnit *et al*., 2004).

2. Etude génotypique par des marqueurs moléculaires

2.1. Définition d'un marqueur moléculaire

Un marqueur moléculaire est polymorphe et renseigne sur le génotype de l'individu le portant et sur les génotypes des locus voisins. Il est composé de fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre. Ce sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique permettant d'identifier le polymorphisme entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus. Ils sont utilisés aussi dans l'établissement d'une carte génétique.

2.2. Caractéristique des marqueurs moléculaires

Un bon marqueur doit être :

- ✓ Neutre : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu ;
- ✓ Polymorphe : c'est-à-dire variable entre individus en possédant de nombreux allèles permettant de caractériser les différents individus ;
- ✓ Codominant : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères de ses parents homozygotes ;
- ✓ Insensible au milieu et non épistatique ;
- ✓ Multi allélique : en possédant plusieurs allèles au même locus ;
- ✓ Reproductible, économique et manipulé à grande échelle.

2.3. Différents marqueurs moléculaires employés chez l'orge

De nombreux marqueurs moléculaires sont mis à la disposition des chercheurs, et de nouveaux sont régulièrement décrits. Les marqueurs les plus utilisés chez l'orge sont les SSR : marqueurs microsatellites : Simple Sequence Repeats.

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). Ce sont des marqueurs codominants, extrêmement polymorphes, faciles à manipuler et permettant le multiplexage. Ils requièrent très peu d'ADN (quelques nano grammes) 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 (Pillen *et al*., 2000). 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 (Matus et Hayes, 2002).

2.4. Comparaison des marqueurs moléculaires employés chez l'orge

Une étude comparative entre cinq types de marqueurs (Tableau 3) a montré que les marqueurs SSR révèlent 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).

Tableau 3 : Comparaison des marqueurs moléculaires les plus utilisés chez l'orge (Becker et Heun, 1995).

	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

Matériels et méthodes

I. ANALYSE GENOTYPIQUE

1. Matériel biologique

Dans le but d'étudier la diversité génétique de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) quinze accessions sont utilisés pour l'analyse génotypique. Les 15 accessions sont d'origines différentes (Tableau 4).

Tableau 4 : Accessions utilisées dans l'analyse génotypique.

Numéro	Code	Nom scientifique	Pays d'origine
1	IG16939	*Hordeum vulgare L. subsp. Vulgare convar. vulgare*	Russie
2	IG18921	*Hordeum vulgare subsp. distichon*	Turquie
3	IG23588	*Hordeumvulgare L. subsp. vulgareconvar. vulgare*	Macédoine
4	IG24450	*Hordeumvulgaresubsp. vulgare*	
5	IG24454	*Hordeumvulgaresubsp. vulgare*	
6	IG28675	*Hordeumvulgare L. subsp. vulgareconvar. distichon (L.) Alef.*	Turquie
7	IG28741	*Hordeumvulgaresubsp. distichon*	
8	IG28858	*Hordeumvulgaresubsp. vulgare*	
9	IG28859	*Hordeumvulgaresubsp. vulgare*	
10	IG143862	*Hordeumvulgare L. subsp. vulgareconvar. distichon (L.) Alef.*	Etats unis
11	IG143941	*Hordeumvulgare L. subsp. vulgareconvar. vulgare*	
12	IG143881	*Hordeumvulgare L. subsp. vulgareconvar. vulgare*	Grèce
13	IG138195	*Hordeumvulgaresubsp. distichon*	Erythrée
14	IG28623	*Hordeumvulgaresubsp. vulgare*	Turquie
15	IG143960	*Hordeumvulgare L. subsp. vulgareconvar. vulgare*	Inde

Après la récolte des feuilles d'orge à partir de 15 plantes semées dans des polypots au champ de l'institut national de la recherche agronomique de Rabat (INRA). Les échantillons sont placés dans le lyophilisateur pendant une durée de 48h afin de sécher les feuilles et de faciliter leur broyage.

2. Extraction d'ADN

Après broyage des feuilles pendant 5 min, on a obtenu une poudre très fine. Dans des tubes de 2 ml contenant le broyat, un volume de 1.5 ml de la solution préparée (0.2% β-mercaptoéthanol+ 2% CTAB) est ajouté. La solution de CTAB chauffée à 65°C permet la lyse membranaire, l'inactivation d'ADNase et la dénaturation des protéines. On a incubé les tubes au bain marie à 65°C pendant 1h avec agitation légère chaque 15 min.

Après incubation, 500 µl de chloroforme est rajouté dans chaque tube à température ambiante et avec agitation manuelle pendant 15 min afin de faire solubiliser les pigments chlorophylliens, les protéines dénaturées, les lipides et les débris cellulaires. On a placé les tubes en centrifugeuse pendant 15 min à 13000 rpm et à température ambiante. Puis 1 ml de surnageant est récupéré et mis dans des nouveaux tubes de 2 ml stériles, sur lequel, 666 µl d'isopropanol sont ajoutés afin de précipiter l'ADN. Les tubes sont incubés à température ambiante pendant 30min.

Après centrifugation à 4°C à 13000 rpm pendant 10 min, le culot d'ADN est récupéré, puis lavé avec 1 ml d'éthanol 70% et centrifugé pendant 5 min.

Enfin, après l'élimination du surnageant, les tubes sont séchés sous vide à une température ambiante. Le culot d'ADN est dissout 100 µl d'eau distillée stérile et stocké à 4°C pendant une nuit.

3. Test qualité

L'électrophorèse sur gel d'agarose nous renseigne sur la présence d'ADN, sa qualité et sa quantité.

a. Préparation du gel d'agarose 1.2%

A raison d'une masse de 3,6 g d'agarose pour un volume de 300 ml du tampon TBEx5. 30 ml du TBE est ajouté à 3,6 g d'agarose et on complète avec l'eau distillée jusqu'à 300 ml. Le mélange est fondu au four à microondes. Après qu'il soit bien solubilisé, le mélange est refroidi dans un bassin rempli d'eau jusqu'à atteinte de 60°C de température.

Avant de couler le gel, les peignes sont placées pour former les puits et le niveau est réglé pour que le support du gel soit horizontal. Le gel est coulé lentement en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Après solidification, les peignes sont enlevés et le gel est placé dans l'appareil, immergé dans le tampon de migration TBE 0.5×.

b. Préparation des échantillons

Dans des tubes stériles (tubes PCR) placés dans la glace, 4 µl d'eau distillée stérile sont déposé avec 3 µl de bleu d'agarose et 3 µl d'ADN extrait.

c. Dépôt des échantillons sur le gel d'agarose

10 µl de chaque échantillon préparé, sont déposés dans un puis du gel (le 1er puit est réservé au marqueur de taille lambda).

La migration est lancée à 60 V au départ puis augmentée à 80 V.

d. Lecture du gel

Après migration, le gel est immergé dans une solution du bromured'éthidium (10 mg/ml) pendant 20 min avec agitation, puis lavé par l'eau pendant 10 min. Les bandes ont été visualisées sous UV.

4. Technique de la PCR

La PCR (polymérase chaine réaction) est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copie d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- une **dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins ;
- une **hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherche ;
- puis une **élongation** grâce à une **ADNpolymérase.**

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une amplification exceptionnelle de séquence de l'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute).

a. Amplification d'ADN par PCR

La PCR est réalisé avec un volume total de 10 µl

Pour réaliser une PCR, il faut d'abord déposer 2 µl d'ADN dans une plaque PCR, puis, préparer, dans un tube de 1,5 ml, une solution Master Mix (Tableau 5).

Tableau 5 : Composants du Master Mix et volumes nécessaires.

Réactifs	Pour une réaction	Pour 16 réactions
Eau	3.95 µl	64 µl
Tampon x5	2 µl	32 µl
DNTPs 2mM	1 µl	16 µl
Amorce 10µM	1 µl	16 µ
Taq polymérase 5U	0.025 µl	0.08 µl

L'amplification est réalisée avec quatre amorces. L'ADN est amplifié en utilisant le programme suivant : 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.
Seule la température d'hybridation qui varie d'une amorce à une autre.

Tableau 6 : Marqueurs SSR utilisés, séquence d'amorce, taille prévu, température d'hybridation (Tm) et localisation chromosomique.

Amorce	Séquence	Taille prévu	Tm	chromosome
BMAC0113	TCAAAAGCCGGTCTAATGCT GTGCAAAGAAAATGCACAGATAG	**187**	**58°**	**5H**
BMAC0316	ATGGTAGAGGTCCCAACTG ATCACTGCTGTGCCTAGC	**135**	**56°**	**6H**
BMAC0032	CCATCAAAGTCCGGCTAG GTCGGGCCTCATACTGAC	**215**	**60°**	**1H**
BMAC0040	AGCCCGATCAGATTTACG TTCTCCCTTTGGTCCTTG	**236**	**58°**	**6H**

b. Electrophorèse sur gel d'acrylamide 6%

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide a pour but de révéler les bandes d'ADN et permet de savoir si l'amplification est bien effectuée.

c. Préparation du gel d'acrylamide

30 ml d'acrylamide (40 %) sont mélangés avec 20 ml de TBE x5 puis complétés jusqu'à 200 ml avec l'eau distillée.
La plaque de verre est 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, 533 µL de persulfate d'ammonium (APS) et 148 µL du (TEMED) sont ajoutés.

d. Préparation et dépôt des échantillons

5 µL du bleu d'acrylamide sont ajoutés sur les produits PCR.
7 µL de chaque échantillon sont déposés dans chaque puits du gel dissout dans un tampon TBE x5 (le 1^{er}puits est réservé au marqueur de taille 100 Pb). La migration est lancés sous 300 mA.

e. Lecture du gel

Après migration , le gel est immergé dans une solution du bromure d'éthidium (BET), puis lavé avec l'eau et visualisé sous UV.

5. Analyse des données

L'analyse de la matrice des données pour le calcul de la matrice des distances génétiques et le dendrogramme sont réalisés 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 (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 : le contenu de l'information polymorphe (PIC) et l'indice de diversité (H), en utilisant la formule la formule de Nei (Nei, 1987)

$$\mathrm{H} = \frac{n}{(n-1)} * (1 - \sum \mathrm{p})$$

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

Le programme Power Marker (Version 3.25; Liu et Muse, 2005) est utilisé pour construire un dendrogramme à partir des distances génétiques calculées à partir des données initiales.

II. ANALYSE PHENOTYPIQUE

1. Matériel biologique

Le matériel végétal qui a fait l'objet de cette étude phénotypique de l'orge est les graines de 15 accessions de l'orge pris du stock de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Rabat.ces accessions sont numérotées de BA299 jusqu'à BA313 provenant de Chypre, Pakistan, Algérie, Maroc, Libye, Italie et Grèce (voir Tableau 10).

2. Grain scan

Grain Scan est une méthode logicielle permettant de mesurer la taille des graines à partir d'images capturées à l'aide de scanners à plat grand public, de manière robuste et normalisée. L'exactitude et la précision de la méthode sont démontrées à travers le criblage des populations.

Résultats et discussion

I. EVALUATION DU POLYMORPHISME MOLECULAIRE

1. Test qualité

Selon le profil électrophorétique (Figure 3), les 15 accessions d'orge analysées se caractérisent par la présence des bandes d'ADN bien claires. À l'exception de l'échantillon 3 (problème de pipetage pour le test qualité). On peut estimer que l'ADN extrait a une qualité satisfaisante et permet donc de réaliser des dilutions pour l'analyse par PCR.

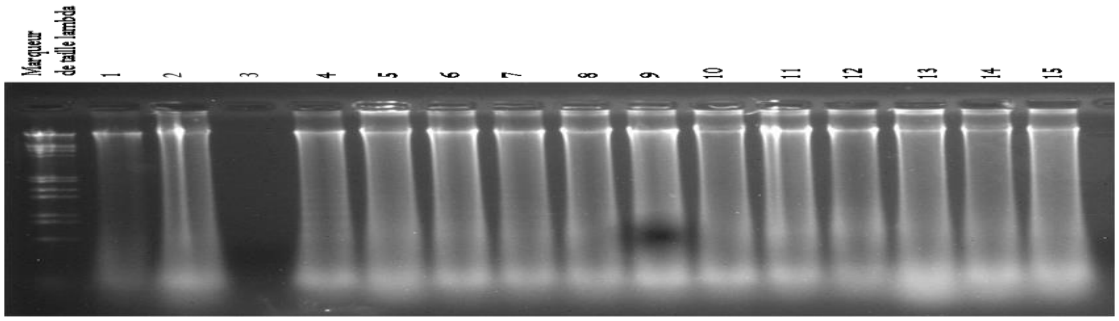


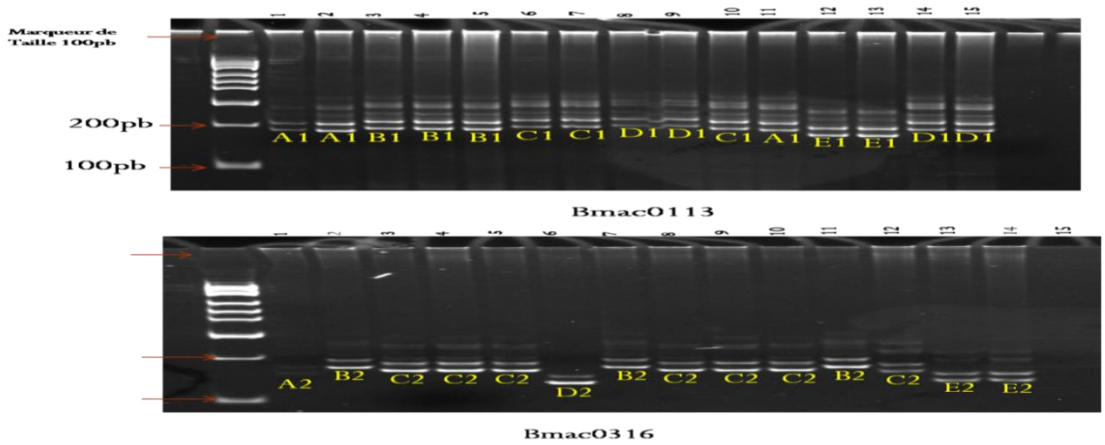
Figure 3 : Profil électrophorétique du test qualité de15 accessions d'orge sur gel d'agarose 1.2%.

2. Amplification d'ADN par PCR

À l'aide des marqueurs moléculaires nous avons pu réaliser cette étude afin d'estimer la variabilité génétique entre 15 accessions d'orge de différentes origines géographiques. Ainsi, quatre amorces SSR sont utilisées afin d'en choisir celle qui génère un polymorphisme distinctif.

Les quatre amorces utilisées (Figure 4), (Bmac0113, Bmac0316, Bmac0032 et Bmac0040) ont montré un polymorphisme.

Figure 4a : Profils électrophorétiques des



marqueurs SSR utilisés sur gel d'acrylamide 6% pour les amorces Bmac0113 et Bmac0316

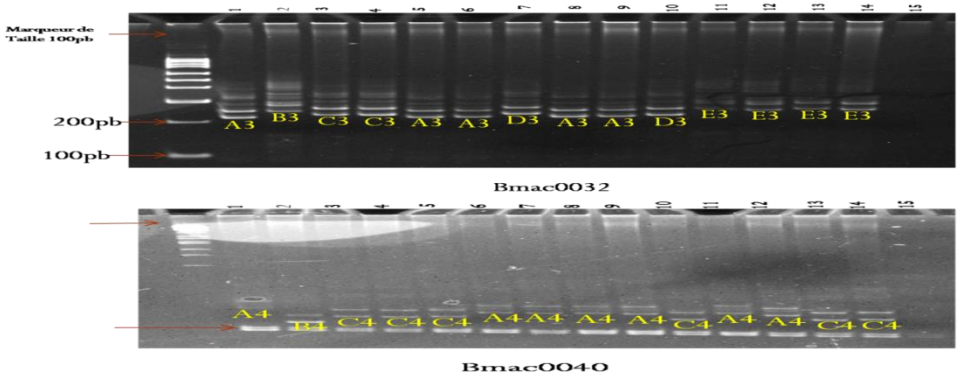


Figure 4b : Profils électrophorétiques des marqueurs SSR utilisés sur gel d'acrylamide 6% pour les amorces Bmac0032 et Bmac0040

En effet, pour l'amorce Bmac0113, l'électrophorèse révèle 5 allèles nommés A1, B1, C1, D1 et E1. Le nombre d'allèles pour l'amorce Bmac0316 est de cinq (A2, B2, C2, D2 et E2). Le même résultat est enregistré pour l'amorce Bmac0032, cinq allèles,(A3, B3, C3, D3 et E4). Tandis que pour l'amorce Bmac0040 l''électrophorèse révèle trois allèles qui sont A4, B4 et C4 (Tableau 7).

Les bandes d'ADN ont des tailles différentes, chaque bande claire dans le gel présente un allèle. Alors chaque amorce a donné un nombre de bandes correspondant au nombre des allèles.

Tableau 7 : Génotypes individuels révélés pour chaque amorce.

Numéro d'échantillons	Bmac0113	Bmac0316	Bmac0032	Bmac0040
1	A1/A1	A2/A2	A3/A3	A4/A4
2	A1/A1	B2/B2	B3/B3	B4/B4
3	B1/B1	C2/C2	C3/C3	C4/C4
4	B1/B1	C2/C2	C3/C3	C4/C4
5	B1/B1	C2/C2	A3/A3	C4/C4
6	C1/C1	D2/D2	A3/A3	A4/A4
7	C1/C1	B2/B2	D3/D3	A4/A4
8	D1/D1	C2/C2	A3/A3	A4/A4
9	D1/D1	C2/C2	A3/A3	A4/A4
10	C1/C1	C2/C2	D3/D3	C4/C4
11	A1/A1	D2/D2	E3/E3	A4/A4
12	E1/E1	B2/B2	E3/E3	A4/A4
13	E1/E1	E2/E2	E3/E3	C4/C4
14	D1/D1	E2/E2	E3/E3	C4/C4
15	D1/D1			

L'étude des 15 accessions d'orge, avec les quatre marqueurs SSR, révèle donc, et au total, 18 allèles avec un maximum de cinq allèles pour les amorces (Bmac00113, Bmac0316, Bmac0032) et trois allèles pour l'amorce Bmac0040 (Tableau 8). Le nombre moyen étant de 4.5 allèles par accession.

Le PIC est une valeur informative sur l'amorce, plus le PIC est élevé plus cette amorce sera utile pour l'étude de la diversité génétique.
Le paramètre PIC révèle que Bmac0113 (PIC = 0,758) est considéré comme le meilleur marqueur pour 15 génotypes d'orge suivis par les amorces Bmac0032 (PIC = 0,704), Bmac0316 (PIC = 0,700) et Bmac0040 (PIC = 0.465).

L'indice de la diversité génétique des amorces Bmac0113, Bmac0316, Bmac0032 et Bmac0040 chez les 15 accessions d'orge varie de 0,561 pour l'amorce Bmac0040 à 0.791 pour l'amorce Bmac0113 avec une moyenne de 0,708 (Tableau 8). Ces résultats révèlent que ces quatre marqueurs choisis sont suffisants pour détecter la diversité des 15 accessions d'orge.

Tableau 8 : Diversité génétique calculée chez les 15 accessions d'orge.

Marqueur	Nombre d'allèles	PIC	Indice de diversité génétique
Bmac0113	5	0.758	0.791
Bmac0316	5	0.700	0.735
Bmac0032	5	0.704	0.745
Bmac0040	3	0.465	0.561
Moyenne	4.5	0.656	0.708

3. Distance génétique de Nei

Le tableau 9 présente les valeurs de la distance génétiques entre les différentes accessions étudiées. Ces valeurs varient entre 0,25 et 0,75. La plus faible distance a été observé entre les échantillons 9 et 5, 8 et 5, 7et 10, 5 et 3, 5 et 4, 14 et 13, et enfin entre 13 et 12, quand a la plus grande valeur a été révélé entre l'accession 9 et 11, 12, 13, 2 et 7, et entre l'accession 8 et 11, 12, 13, 2 et 7…

Une distance génétique faible entre deux individus différents signifie une similarité génétique élevée. Alors que les grandes distances génétiques indiquent que les individus en question sont très différents génétiquement et font donc le choix le plus adéquat de meilleures accessions pour la réalisation des croisements de départ.

Dans plusieurs études précédentes, des faibles distances génétiques ont été enregistrées en se basant sur le pedigree et les marqueurs moléculaires comme RAPD (Manninen and Nissila1997), RFLPs (Graner et al. 1994 ; Davila et al. 1998) or AFLPs (Ellis et al. 1997 ; Schut 1997).

Tableau 9: La distance génétique mesurée entre les différentes accessions

OTU	1	10	11	12	13	14	15	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0														
10	0.75	0													
11	0.5	0.75	0												
12	0.5	0.75	0.5	0											
13	0.75	0.75	0.5	0.25	0										
14	0.75	0.75	0.5	0.5	0.25	0									
15	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0								
2	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0							
3	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0						
4	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0	0					
5	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.25	0.25	0				
6	0.5	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0			
7	0.75	0.25	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0		
8	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0	0.75	0.5	0.5	0.25	0.5	0.75	0	
9	0.5	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0	0.75	0.5	0.5	0.25	0.5	0.75	0	0

4. Dendrogramme(NJ)

A travers la matrice de similarité obtenues à partir des données SSR par des calculs entre tous les individus (Tableau 8), et à partir des distances génétiques (Tableau 9), le dendrogramme construit a regroupé les individus qui ont des petites distances génétiques (Figure 3). Ce groupement constitue un moyen efficace pour l'évaluation de la relation génétique entre les différentes variétés. L'arbre phylogénique étale la relation entre les accessions de l'orge analysées.

- Le premier groupe A : est constitué de deux accessions 1 et 2 provenant respectivement de la Turquie et la Russie ;

- Le deuxième groupe B : est constitué de 6 accessions qui sont 11, 12 et13 qui proviennent d'origines différentes, respectivement les Etats Unis, Grèce et l'Erythrée ;

- Le troisième group C : réunie les accessions 6, 7 de la même origine (Turquie) et l'accession 10 qui provient des Etats Unis ;

- Le quatrième groupe D : rassemble les accessions qui sont 3, 4, 5, provenant de la Macédoine, et les accessions 8, 9, 14 qui proviennent de la Turquie et enfin l'accession 15 d'origine d'Inde.

On constate que les accessions 7 et 10 sont très proche dans le dendrogramme, ce qui prouve leur valeur de la distance la plus fable qui est de 0.25

Pour les accessions qui sont très éloignés dans le dendrogramme, présentent la valeur de la distance génétique la plus élevée (0.75). a titre d'exemple les accession 2 et 5, 2 et 12, 13 et 10…

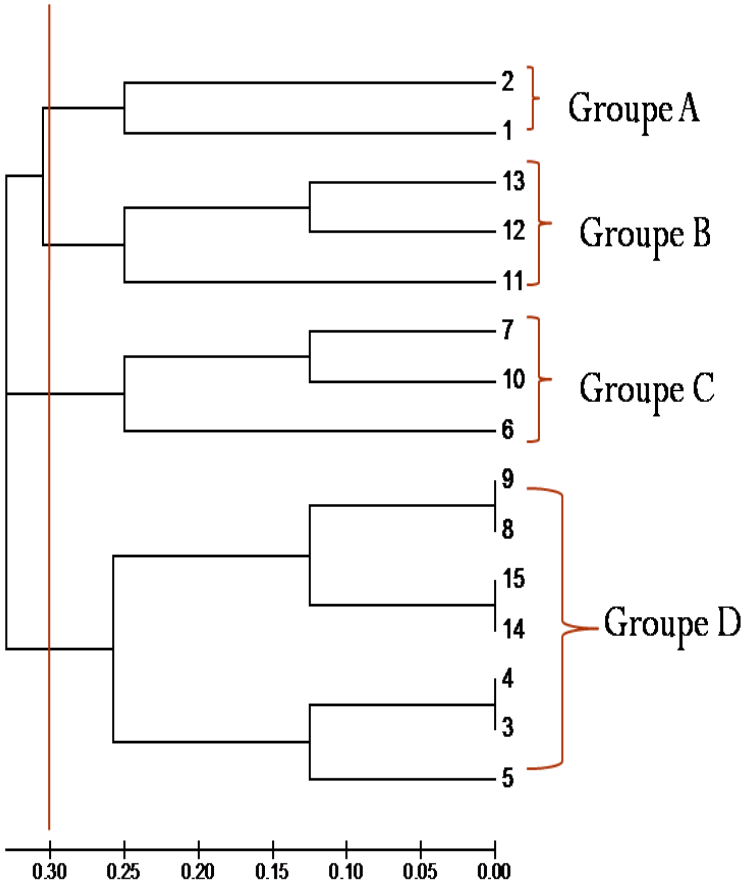


Figure 5 : Dendrogramme montrant la relation génétique entre 15 accessions d'orge

I. EVALUATION DU POLYMORPHISME PHENOTYPIQUE VIA L'ASPECT DE LA GRAINE

Les traits agro-morphologiques liés à la forme des graines de l'orge (la surface, le périmètre, la largeur, la longueur) sont étudié à l'aide du logiciel « Grain scan ». Ainsi que le poids des graines qui sont utilisé sont mesurées par une balance.

Le tableau ci-dessous résume les caractères étudiés avec le grain scan :

Tableau 10: Mesures statistiques de l'aspect des graines établi par « Grain scan »

Accessions	Origine	Nombre de graines	PG (g)	PMG (g)	SG (mm2)	Périmètre (mm)	Longueur (mm)	Largeur (mm)
BA299	Chypre	98	5,1	52,133	23,364	29,639	10,157	2,955
BA300		153	4,63	30,261	14,999	20,861	7,182	2,649
BA301	Pakistan	93	4,98	53,548	24,203	30,141	10,197	3,005
BA302	Algérie	83	4,59	55,301	25,817	33,165	11,530	2,861
BA303	Maroc	80	5,61	70,125	25,931	30,657	10,341	3,124
BA304		96	4,96	51,667	23,055	28,780	9,888	2,987
BA 305	Libye	72	4,8	66,764	26,647	31,350	10,668	3,188
BA306	Algérie	80	5,41	67,625	26,936	32,504	11,028	3,121
BA307	Italie	76	5,11	67,237	26,011	31,485	10,803	3,068
BA308		74	4,82	65,135	24,893	30,474	10,216	3,102
BA 309		76	5,01	65,921	27,891	33,375	11,806	3,030
BA 310	Grèce	83	5,85	70,482	28,607	33,850	11,633	3,146
BA 311		81	5,09	62,840	26,372	32,645	10,887	3,120
BA 312		95	5,75	60,526	25,268	31,074	10,258	3,151
BA 313		67	4,99	74,478	28,761	33,078	11,373	3,239

*PG : Poids des Graines PMG : Poids de Mille Graines SG : Surface des Graines

Le tableau a montré que le plus grand poids, le plus grand périmètre sont enregistrés chez l'accession BA310 tandis que pour la grande surface et la plus grande largeur sont enregistrée chez l'accession BA313, la grande longueur est enregistré chez l'accession BA311. Grace à leurs poids, surface, largeur, et longueur les graines de ces accessions peuvent êtres utilisées dans la germination puis plantées pour donner des nouvelles plantes et d'en faire de nouvelles études moléculaires.

La Taille de la graine (La surface, périmètre, longueur et largeur) est importante pour expliquer le rendement de la récolte. Elle est influencée par la nutrition de la plante et la durée de la période de remplissement des graines. Pour l'orge destinée à la fabrication de bière et vin, la taille de graines est un caractère important.

Conclusion générale

Ce travail avait comme but de mesurer La variation génétique de l'orge à deux niveaux: phénotypique et génotypique. Donc afin de répondre à l'objectif souhaité nous avons utilisé une combinaison de différents traits morphologiques et moléculaire pour caractériser 15 accessions de l'orge provenant de différents pays.

L'analyse moléculaire des accessions est initié par l'extraction de l'ADN génomique puis l'amplification en PCR par SSR, a permis de révéler un polymorphisme (PIC de 0.465 à 0.758, et l'indice de diversité génétique de 0.561 à 0.791). Les 4 amorces utilisées en PCR, ont révélé 18 allèles en total. L'usage de ces résultats dans l'analyse statistique NJ a montré une large diversité génétique, le dendrogramme a permis de séparer les accessions de l'orge en 4 groupes. Les quatre marqueurs choisis sont suffisants pour détecter la diversité génétique des 15 accessions étudiées.

L'étude phénotypique a été réalisée par ''Grain Scan'' nous a permis d'analyser la taille des graines des accessions provenant de différents pays. Les résultats obtenus par le Grain Scan ont montré que les graines de l'accession BA313 sont les plus grandes et les plus larges et les graines de l'accession BA310 ont le plus grand poids et le plus grand périmètre tandis que la plus grande longueur des graines est enregistrée chez l'accession BA311.

Grâce aux résultats fournis par ce travail, les prochains travaux peuvent s'intéresser à l'amélioration de l'orge afin de créer de nouvelles variétés à partir de la diversité existante et qui a été révélé par cette recherche. Cela consiste à croiser deux accessions choisies pour leurs caractères intéressants et qui sont très éloignées.

Références bibliographiques

Références

Alaoui S. B. 2005**.** Référentiel pour la Conduite Technique de la Culture d'orge (*Hordeum vulgare*).

Andich K. et S.B. Alaoui. (2003). Elaboration d'un référentiel d'aide à la décicion pour céréales d'automne, Dalil Al fallah. Version 1.0. barley cultivars. Theor. Appl. Genet. 101, pp : 652-660.

Batlle 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.

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.

Ceccarelli S. and Grando S. (1996). *Hordeum vulgare* L. In: Grubben, G.J.H. & Partohardjono, S. (Editors). Plant Resources of South-East Asia. Cereals Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, 10, pp : 99–102

De Vienne, éd.1998. Inra CNED-Aupelf-Uref. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales,

FAO, 2010. Site des données statiqtiques de la FAO (Food Agriculture Organisation of the United Nations) : http://www.fao.org

Grain genes : International database for the wheat, barley, rye and oat

https://fr.wikipedia.org/wiki/Orge_commune

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. INRA, Paris. PP 55-70

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. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating. German

Matus I.A. & Hayes P.M. (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeat. Genome 45, pp : 1095-1106.

McIntosh G.H., Whyte J., McAnthar R. andNestel P.G. (1991). Barley and Wheat foods: Influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. American Journal of Clinical Nutrition, 53, pp : 1205-1209.

Morrell . and Clegg M. T. 2007. Genetic evidence for a second domestication of barley (Hordeum vulgare) east of the Fertile Crescent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104/ 328963294.

ONICL. (1999). Situation du marché de l'orge au Maroc. ONICL/DEI/SEE, Documentation, Maroc, pp : 24.

Pierre ST. & C.A. Gendron (1982). Les céréales et le mais. Les presses de l'université Laval. Québec. p145.

Pillen K., Binder A., Kreuzkam B., Ramsay L., Waugh R., Forster J. and Leon J. (2000).

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.

Sokal R.R. and Michener CD. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kans. Sci. Bull. 38: 1409-1438.

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.

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.

Annexes

Annexes

Solution nécessaire pour l'extraction

Solution stock du tampon d'extraction 2x CTAB :

2X CTAB	POUR 50ML	POUR 250ML
1M TRIS-HCL (PH8)	5ml	25ml
5M NACL	14ml	70ml
0,5M EDTA (PH8)	2ml	10ml
CTAB	1g	5g
EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 50ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution stock d'EDTA :

0,5M EDTA (PH8)	POUR 100ML	POUR 250ML
EDTA	18,6g	46,5g
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 100ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution stock de Tris-Hcl :

1M TRIS-HCL (PH8)	POUR 100ML	POUR 250ML
TRIS BASE	12,114g	30,285g
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 100ml	Complete jusqu'à 250ml

Solution de chloroforme iso-amyle alcool :

CHLOROFORME ISOAMYLE ALCOOL	POUR 25ML	POUR 100ML
CHLOROFORME	24ml	96ml
ISOAMYLE ALCOOL	1ml	4ml

Solution de 70% éthanol :

70% ETHANOL	POUR 100ML	POUR 250ML
ETHANOL ABSOLU	70ml	175ml
L'EAU DISTILLE	30ml	75ml

Solution stock pour les gels

Gel d'agarose 1,2% :

SOLUTION D'AGAROSE	POUR 90ML	POUR 300ML
AGAROSE	1,08g	3,6g
5X TBE	18ml	60ml
L'EAU DISTILLE	Complete jusqu'à 90ml	Complete jusqu'à 300ml

Solution d'acrylamide 40% :

40% D'ACRYLAMIDE	POUR 100ML	POUR 250ML
ACRYLAMIDE	38,66g	96,65g
BIS ACRYLAMIDE	1,34g	3,35g
L'EAU DISTILLE	100ml	250ml

Solution d'acrylamide 6% :

ACRYLAMIDE 6%	POUR 100ML	POUR 200ML
ACRYLAMIDE 40%	15ml	30ml
5X TBE	10ml	20ml
L'EAU DISTILLE	Jusqu'à 100 ml	Jusqu'à 200 ml

Préparation de bleu de charge :

BLEU D'AGAROSE	POUR 10ML	POUR 50ML
1M TRIS-HCL (PH8)	0,5ml	0,25ml
0,5M EDTA (PH8)	0,1ml	0,5ml
50% GLYCEROL	5ml	25ml
BLEU DE BROMOPHENOL	20g	100g

Préparation de bleu de charge :

BLEU D'ACRYLAMIDE	POUR 25ML	POUR 100ML
FORMAMIDE	24,75ml	99ml
BLEU DE BROMOPHENOL	12,5mg	50mg

XYLENE CYANOLE	12,5mg	50mg
L’EAU DISTILLE	1,25ml	5ml