

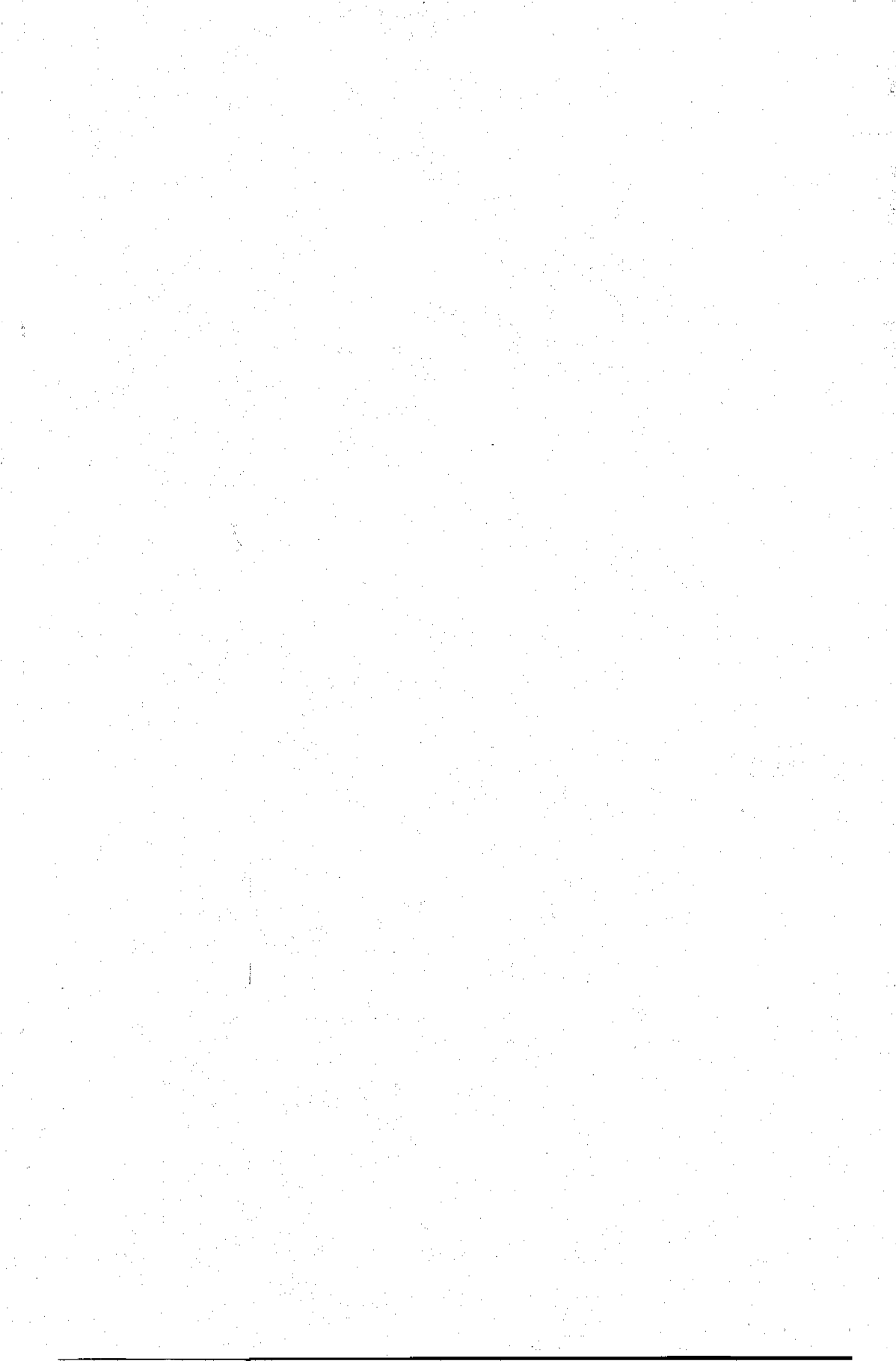
# Adaptation de la méthode ISSR pour la caractérisation du blé tendre au Maroc

*F. Ben El Maati<sup>1</sup>, M. Jlibene<sup>2</sup>, M. Moumni<sup>1\*</sup>,  
F. Mokhtari*

*<sup>1</sup> Laboratoire d'écologie végétale et d'aridoculture Département de Biolo  
Faculté des Sciences. B.P. 524 Université Mohamed Premier Oujda Maroc.*

*<sup>2</sup> Département d'écologie végétale Institut agronomique et vétérinaire Has  
san II. B.P 6202 Rabat Maroc.*

*E mail : aberrichi@sciences.univ-oujda.ac.ma.*



## Résumé

*Le développement des marqueurs moléculaires ISSR (inter-simple séquence répétée) durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Les marqueurs moléculaires deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection du blé tendre (triticum. aestivum) pour la résistance aux maladies en offrant des solutions alternatives aux problèmes inhérents à l'utilisation des marqueurs phénotypiques traditionnels. Le but de ce travail a été de mettre au point une méthode simple et non-radioactive pour révéler le polymorphisme parmi des régions contenant des ISSR et aussi de déterminer les relations génétiques entre 19 variétés marocaines connues. Le choix des amorces, de la température optimale de réaction ainsi que de la concentration d'ADN, ont été mis au point pour améliorer le spectre de révélation du polymorphisme. Quatre amorces décanucléotidiques contenant un motif di-nucléotidique (AG)<sub>8</sub> CA; (AG)<sub>8</sub> TA ont été utilisés. La température optimale d'amplification est de 60°C alors que la concentration d'ADN est de 10 ng. La méthode a permis de révéler un polymorphisme susceptible de faire l'objet d'investigations pour une éventuelle utilisation dans les programmes de sélection assistés par marquage moléculaire.*

**Mots clés :** ISSR, caractérisation génétique, Triticum.aestivum, Maroc.

## ملخص

سعى هذا البحث إلى إثبات جدوى منهجية بسيطة وغير مشعبة لتطبيق تقنية الملامح المتعددة الأشكال بهدف تطوير استراتيجيات الانتقاء. وتعتمد هذه المنهجية على بصم الجزيئات بواسطة الدورة البسيطة البينية المتكررة ISSR.

**الكلمات المفتاحية :** ISSR، التوصيف الجيني، القمح الطري، المغرب.

## Abstract

*The development of molecular markers ISSR (inter-simple repeated sequence) during the last years makes it possible to establish new approaches to improve the strategies of selection. the molecular markers become an essential tool in the programmes of selection of common wheat (triticum aestivum) for resistance to the problems inherent in the use of the traditional phenotypical markers.*

*The goal of this work was to develop a simple and not-radioactive method to reveal polymorphism among areas containing of the ISSR and also to determine the genetic relation relations between 19 known Moroccan varieties. The choice of the primers, of the optimal temperature of reaction as well as the concentration of ADN, was developed to improve the spectrum of nucleotidic revelation of polymorphism. Four primers deca nucléotidic containing a pattern bi-nucléotidic (Ag) <sub>8</sub> CA; (AG)<sub>8</sub> MT were used. The method made it possible to reveal a polymorphism likely to be the subject of investigation for a possible use in the programs of selection assisted by molecular marking*

**Key words :** Wheat; ISSR; Selection; Polymorphism

## Introduction

La description variétale du blé tendre nécessite différents niveaux : morphologique, biochimique et moléculaires. L'observation morphologique est à la base de description du blé, elle est simple et facile à pratiquer. Mais elle manque de plus de précision, à cause de :

- 1- la variation importante d'expression des caractères observés due à une interaction génotype-environnement,
- 2- manque des caractères discriminants,
- 3- nombres croissant des nouvelles variétés
- 4- la base génétique utilisée de plus en plus étroite.

C'est la raison pour laquelle les marqueurs biochimiques ont été pour aide à la description du blé tendre et l'identification variétale. toutefois, ils ont également montré leur limite : faible nombre accessible, faible niveau de polymorphisme et dépendance des stades de développement physiologique. aussi des nouveaux types de descripteurs, en particulier les marqueurs moléculaires, sont explorés et développés depuis une vingtaine d'années, pour aider à décrire le matériel végétal (Zhang D.2002).

D'après Bretting Widrlechner (1995), les marqueurs moléculaires doivent réunir les caractéristiques idéales suivantes : être des caractères mendéliens à hérédité simple ; avoir plusieurs allèles ; être codominants ; ne pas avoir d'effet pléiotropique ou épistatique ; être stables à tous les stades du développement ; ne pas avoir d'effet sur la croissance ou la reproduction sexuée ; être sélectivement neutres ; être facilement observables et être révélateurs sans ambiguïté.

les marqueurs largement utilisés à ce jour, sont les marqueurs moléculaires issus directement du polymorphisme existant au niveau de l'ADN. Nos nous sommes intéressés aux marqueurs moléculaires de type "empreintes génétiques" ou fingerprint" les plus utilisés chez le blé, tels que les ISSR (inter simple séquence repeats-amplification intermicrosatellites) c'est une amplification sur l'ADN génomique avec des amorces constituées d'un motif répété dinucléotique, de type microsatellite, associé à des bases (2à6) définies au hasard placées en 3' ou 5'. Les fragments amplifiés sont donc situés dans le génome entre deux locus microsatellites (Santoni et al., 2000)

Dans cet article, nous présentons les résultats préliminaires de l'apport des marqueurs ISSR pour l'identification variétale de blé tendre à partir d'extraits foliaires.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal :

Pour la mise au point de la technique ISSR dans notre laboratoire, nous avons analysé un matériel végétal constitué de 19 variétés de blé tendre gracieusement mises à notre disposition par l'INRA de Méknès, il s'agit des variétés traditionnelles marocaines qui sont mentionnées sur le tableau 1.

**Tableau 1 :** Type et nom des variétés de blés tendres analysé par ISSR

Numéro	Nom des Variétés	
1	Amal	Variété
2	Achtar	Variété
3	Amal	Variété
4	Jouda	Variété
5	Sais	Variété
6	Marchouch	Variété
7	Nasma	Variété
8	Nesser	Génotype
9	Mehdia	Variété
10	ACSAD 59	Variété
11	Saada	Variété
12	Tilia	Variété
13	Potam	Variété
14	Baraka	Variété
15	Arrehane/jouda	Génotype
16	Marchouch/Saada	Génotype
17	Sibara	Variété
18	Khair	Variété
19	Kanz/KS85	Génotype

### Méthode :

Les grains de blé sélectionné à partir des champs de l'INRA sont mis à germer dans des pots, à la serre de la faculté des sciences de Méknès, la culture dans ces pots a duré 6 semaines pour atteindre le stade de 4ème feuille, l'arrosage de ces pots a été effectuée un jour sur deux.

Pour l'ADN à partir des feuilles de blé tendre nous avons utilisé une version modifiée de la méthode de Murray et al. (1980). Des échantillons de 0,5g de tissu foliaire ont été broyés dans

l'azote liquide, le broyat est mis dans 10 ml de tampon d'extraction préalablement chauffé à 65 °c, puis incubé pendant 30 minutes à 65°C. Du chloroforme-alcool iso amylique a été ajouté à ce mélange, le tout est centrifugé à 4500xg pendant 20 minutes. Le surnageant à été récupéré puis un volume d'isopropanol froid à été ajouté. Le filament d'ADN extrait est rincé dans deux volumes d'éthanol 76 % acétate d'ammonium et dissous dans TE 1x (100mM tris, 1mM EDTA) ; les ARN totaux sont éliminés par incubation de 30 minutes à 37°C en présence d'ARNase; L'estimation de la qualité et la quantité d'ADN extrait à été basé sur gel d'agarose 0,8% dans du TBE1 x (tris, borate, EDTA) puis visualisés à l'aide du bromure d'éthidium (0,5µg/ml).

Les 4 amorces ISSR qui ont été utilisés dans cette étude ont été commercialisés des laboratoires eurobio. Le tableau 1 résume les séquences nucléotidiques de ces amorces testées.

La réaction d'amplification est réalisée dans un volume final de 25µl contenant 10ng d'ADN (concentration optimale de l'amplification), tampon 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 25 pM d'amorces et 2U Taq polymérase (Eurobio).

Les conditions standard de la réctio (25µl dans chaque tube) incluent les éléments et les concentrations suivantes :

ADN	1,0 µl
Primer	0,5 µl
Tampon	2,5 µl
DNTPs	4,0 µl
Taq	0,2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
Eau ultra pure	15,3 µl

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur (Cetus peker elmer) en utilisant les conditions suivantes :

- 1-- un cycle de dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, suivi de
- 2-- 35 cycles (94°C 30 secondes, 60°C 1 minute, 72°C 1 minute) et
- 3-- une phase finale d'élongation à 72°C pendant 7 minutes.

Les produits d'amplifications sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% dans du TBE1 x, les bandes sont visualisées par le bromure d'éthidium sous UV et la dimension des bandes est déterminée par rapport aux bandes du marqueur de taille leader 100pb.

## Résultats et discussion

Un profil moléculaire ISSR est révélé par un ensemble de bandes correspondant à des fragments d'ADN amplifiés avec des tailles différentes. Ces fragments constituent des séquences flanquées de motifs microsatellites. Cela est dû aux amorces ISSR qui sont constituées pour partie d'une séquence microsatellite, et pour partie de bases arbitraires. Deux types d'amorces sont concevables selon les positions relatives de ces deux parties (5' ou 3'). Le nombre de fragments est lié au nombre de répétitions de la séquence microsatellite, et varie aussi en fonction du premier utilisé ; Dans nos résultats préliminaires, une amorce est considérée polymorphe lorsqu'elle présente au moins un marqueur (bande) différent mettant en évidence une discrimination entre les échantillons analysés.

Dans ses essais préliminaires, quatre amorces de dinucléotides d'un motif (AG) répétés, ont été testées pour leur polymorphisme révélé à partir des échantillons analysés. Le tableau 2 résume les séquences nucléotidiques des amorces testées, ces dernières ont été déjà testées et sélectionnées pour leur polymorphisme par Julie et al. (1999). La reproductibilité des résultats ISSR est testée pour les quatre amorces en utilisant au moins deux amplification à partir d'un même échantillon d'ADN.

**Tableau 2 :** Séquences des amorces testées.

Primer	Séquence
ISSR R1	(AG) 8 CA
ISSR R2	(AG)4CATCCACGA
ISSR F1	(AG)8TA
ISSR F2	(AG)4TA(GA)2CTGC

### Température et concentration optimale pour un bon polymorphisme

Dans un premier temps, nous avons essayé trois concentrations différentes 5 ng, 10 ng et 20 ng, seule la concentration 10 ng qui a donné des bandes bien visibles sous UV. Dans un deuxième temps, nous avons testé nos 4 amorces sur les échantillons d'ADN à une température de 54°C, cette température 60°C a donné un bon polymorphisme.

L'amorce ISSR R1, ISSR R2 et F2 ont un polymorphisme important entre les variétés et les génotypes analysés. Signalons que les amorces ISSR R1, ISSR et F2 ont donné aussi un polymorphisme élevé dans le cas des travaux réalisés par Julie et al. (1999). Pour les variétés marocaines, on a pu mettre en évidence un polymorphisme qu'il est possible d'utiliser pour l'identification des variétés de blés tendres, notamment avec l'amorce ISSR R1 qui a donné plusieurs bandes et qui génère ainsi un polymorphisme de type présence absence bien net. Nous citons à titre d'exemple le polymorphisme révélé au niveau de la bande de taille 300pb. Cette amorce (AG)8 CA a été utilisé dans les travaux réalisés par Essais et al. (2004) et elle a montré un bon polymorphisme chez l'olivier cultiver.

Ces résultats obtenus montrent que les marqueurs ISSR ont donné un bon polymorphisme avec un pourcentage de reproductibilité de 90 %, au contraire des résultats obtenus par les marqueurs RAPD (Riede et al. 1994) qui ont donné un polymorphisme avec un faible pourcentage de reproductibilité, ce qui montre que les marqueurs ISSR sont plus fiables et plus polymorphes que les marqueurs RAPD.

En conclusion, ces résultats préliminaires obtenus sur les marqueurs ISSR ont montré un polymorphisme potentiel pour l'identification des variétés de blé tendre nettement distinctes, mais aussi dans le cas des individus ou de génotypes très étroitement apparentés (cas d'homonymie : variété Amal). L'adjonction d'autres amorces ne peut qu'augmenter la discrimination entre les variétés et génotypes analysés.

L'optimisation des essais pour l'obtention d'un ADN de qualité est indispensable pour l'utilisation de ces marqueurs qui pourront être complémentaires aux marqueurs biochimiques et morphologiques utilisés chez le blé. La poursuite de cette étude sur un large échantillon des variétés de blés tendres, et aussi sur celle qui présente une certaine résistance aux maladies (telles que la rouille brune des feuilles) permettra sans doute de quantifier l'apport de ses marqueurs moléculaires pour l'identification et surtout pour l'amélioration des variétés de blés tendre marocaines.

## **Remerciement**

Nous tenons à remercier N. Ouazzani, M. Essadki, de l'Equipe Olivier de l'ENA de Meknes, pour leur compréhension et leur aide au cours de la réalisation de ce travail.



## Bibliographie

- Bretting PK ; Widrechner MP 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. In: Janik, (ed.) plant Breeding Review, Vol 13.
- Essadki M. Ouazzani N.; Lumart R.; ; Mounir M. 2004. ISSR characterization of olive-tree cultivars from morocco and other countries of western Mediterranean basin. Genetic Resources and Evolution. Eagan press.
- Julie Gold ; EJB. 1999. Development of a molecular marker for rust resistance genes Sr39 and Lr35 in wheat breeding lines. By Universidad Católica de Valparaíso-Chile.
- Murray M.G. ; Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA; Nucleic Acids Res 8 : 4321-4325.
- Reide; Danneberger L. ; Sconik PA. 1994. detection of microsatellite polymorphisms without cloning . Nucleic Acids Res 22 : 3257-3258.
- Sambrook ; J.E.F. ; Fritsch ; Maniatis 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor lab.
- Santon S. ; Faivre-rampant P ; Parado E ; Prat D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Agricolture 9 : 311-327.
- Zhang D. 2002. Les apports de la biologie moléculaire en arboriculture fruitière.