Mise en évidence du gène *Lr35* de résistance adulte du blé tendre à la rouille brune par un marqueur moléculaire ISSR

Ben El Maati F.[1], *Jlibene M*[1], *Moumni M.*[2]

1. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre Régional de Meknès, Maroc (CRRA). jlibene@yahoo.com

2 . Département de biologie, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc.

Pour correspondance, e-mail : fbenmaati02@yahoo.fr

Résumé

La rouille brune peut être à l'origine de pertes de rendement importantes, difficiles à apprécier. Les traitements des céréales en végétation avec les fongicides sont assez efficaces. La principale technique de lutte est l'utilisation de variétés résistantes, qui constitue une composante essentielle pour la majorité des programmes de sélection et un moyen de contrôle efficace à considération aussi bien écologique qu'économique. Cependant, la pression de sélection exercée par les variétés à résistance monogénique favorise le développement de nouveaux biotypes capables de contourner ces résistance, ce qui nécessite la recherche continue et rapide de nouvelles sources de résistance. Cette recherche a été largement facilitée par l'avènement des techniques de marquage moléculaire durant ces dernières années. Actuellement, il est possible de développer une approche moléculaire par le biais de l'utilisation de marqueurs moléculaires dont les marqueurs ISSR (inter simple sequence repeat), afin de sélectionner des génotypes plus résistants à la rouille brune du blé. C'est pour cet objectif que nous nous sommes intéressés dans cet article à leur application sur la résistance du blé tendre vis à vis de la rouille brune des feuilles.

Ainsi, nous avons testé 6 amorces contenant un motif dinucléotidique (AG) sur des variétés de blé tendre (T. aestivum) résistantes et autres sensibles à la rouille brune, et aussi une techniques codominante la RFLP. Cette application nous a permis d'identifier le marqueur ISSR F2-900 lié au gène Lr35 de résistance à la rouille brune.

Mots clés : gène Lr35, ISSR, RFLP, Triticum aestivum, Puccinia triticina, rouille

إبراز الجين المقاوم لمرض الصدأ بين عينات من القمح الطرى بواسطة المؤشر ISSR

بن المعطى فاطمة ، جلين محمد و المومنى محيى الدين

ملخص

يحدث مرض الصدأ البني أضرارا هامة بالقمح بالمغرب. لمحاربة هذا الداء يتم استعمال الأصناف المقاومة مع أن هناك موادا كميائية جد فعالة. تستعمل الأصناف المقاومة لفعاليتها وسهولة استعمالها بالأضافة إلى أهميتها على صعيد الكلفة والحفاظ على البيئة. مما أدى بالمسؤولين على برامج التربية إلى وضع هده النقطة من ضمن أولوياتهم. لكن التغيرات الدائمة للفطر تهدد بقصر عمر المقاومة و فعاليتها. توجد الآن تقنيات حديثة تساعد على ابراز الجينات المسؤولة على المقاومة، من بينها RFLP و(ISSR (inter simple sequence repeat

الهدف من هده الدراسة تكمن فى استعمال هذه التقنيات لابراز جين المقاومة Lr35.

باستعمال المؤشر وهكدا استطعنا أن نبرز وجود الجين ISSR F2-900 ISSR F2-900 من بين عينات القمح المستعملة.

الكلمات المفتاح : Lr35 جين، *Puccinia triticina*, *Triticum aestivum*, RFLP, ISSR ، الصدأ البنى

Identification of resistant genotypes of wheat to leaf rust using an ISSR marker linked to Lr35 resistance gene

Ben El Maati F., Jlibene M., Moumni M.

Abstract

Leaf rust is able to induce considerable losses to wheat in Morocco. Use of resistant cultivars is the main technique used to control the disease, despite effectiveness of chemical treatments by fungicides. It is considered most effective and practical in addition to its positive effects on the environment and the cost. However, the rapid change in the fungal population makes search for resistance a continuous effort. Development of molecular approach particularly ISSR (inter simple sequence repeat) marker application helped identify resistant genotypes. The objective of this paper is to apply such technique to identify resistant genotypes. Six primers containing AG - dinucleotide sequences, in addition to RFLP, were used. This application allowed identification of ISSR F2-900 genetic marker linked to Lr35 resistance gene.

Key-words: Lr35 gene, ISSR, RFLP, *Triticum aestivum*, *Puccinia triticina* , leaf rust

Introduction

La recherche de marqueurs moléculaires étroitement liés aux gènes de résistance, est une étape importante avant leur exploitation pratique pour accélérer et améliorer l'efficacité des programmes de sélection (Hospital, 2001 ; Moreau et al., 2001 ; Eagles et al., 2001 ; Dekkers et Hospital, 2002).

En effet, plusieurs gènes de résistance aux maladies ont été récemment localisés dans le génome du blé tendre par l'établissement de liaisons entre ces derniers et des marqueurs moléculaires sur les différentes cartes génétiques (Gupta et al., 1999; Yencho et al., 2000 ; Langridge et al., 2001). A cet effet, des sources de résistance contre la rouille brune ont été identifiées pour le blé, on parle de gènes Lr pour la résistance au « Leaf rust » et de gènes Sr pour la résistance au « stem rust» (Boulif, 1987).

Depuis 1968, Van Der Plank a rapporté que face à la rouille brune le blé manifeste deux types de résistances : **Résistance spécifique, Résistance non spécifique**

La résistance non spécifique a été détectée chez les cultivars de blé qui ne possèdent aucun gène majeur connu ou ayant des gènes majeurs devenus inefficaces. Bien que la génétique de la résistance non spécifique, soit principalement quantitative, Borner et al. 2000 ont rapporté que des gènes majeurs uniques peuvent être impliqués dans cette résistance. En effet, ces auteurs ont montré dans leur étude que le nombre de gènes majeurs impliqués dans la résistance adulte à la rouille brune qui est bien caractérisée par Lr35 (qui se trouve sur le chromosome 2B) (Seyfarth et al. 1999) reste faible en comparaison avec les gènes à résistance spécifique (Lr39, Lr21). D'autres auteurs ont montré que la résistance adulte à la rouille brune est gouvernée par 2 gènes (Lr35 et Lr13) à effets additifs prédominants (Keller et al. 1999 ; Messmer et al. 2000 ; Liu et al. 2001).

Toutes les variétés de blé n'ont pas le même comportement vis à vis de *Puccinia trticina*, ainsi elles peuvent être classées selon leur résistance à l'égard de cet agent pathogène. Toutefois, ce classement varie suivant les années et les régions.

Suivant des études réalisées dans ce domaine au Maroc (Houari, 1969 ; Talibi, 1984), les variétés du blé cultivées au Maroc sont classées vis à vis de la rouille brune en 3 catégories : **Variétés à sensibilité absolue, Variétés à comportement variable, Variétés résistantes**.

Des auteurs ont testé la réaction au champ des variétés et des lignées du blé marocain vis à vis de *P. triticina*, et ils ont rapporté que parmi toutes les variétés du blé tendre testées seule Jouda s'est montrée résistante à la rouille brune (Houari, 1969 ; Talibi, 1984). Plus tard, d'autres ont ajouté que Jouda s'est montrée résistante au stade adulte en réduisant la taille des pustules et en prolongeant la période de latence 50 (Ezzahiri, 1990). Le terme 'Latence 50' exprime le temps entre l'inoculation et l'apparition de 50% des pustules. Alors que les autres variétés de blé tendre telles que Nasma et Siete Cerros, se

sont montrées sensibles au stade adulte à la rouille brune, ce qui confirme les résultats de Matal (1981), qui a trouvé que ces deux variétés se sont montrées sensibles à la rouille brune dans plusieurs régions du Maroc, et de Talibi & Matal (1981) qui ont rapporté que la variété Nasma est très sensible par rapport à Jouda. En effet, la différence entre Nasma et Jouda réside dans le fait que la variété Jouda possédant le gène Lr1, comme la variété Nasma, se montre plus résistante que cette dernière car elle est supposée avoir le gène Lr35 résistant au stade adulte de la plante (Abdel Hak et al. 1980).

D'autre part, Diouri (1988) a montré que la majorité des variétés de blé tendre marocaines testées au laboratoire vis à vis des différentes races de *P. triticina*, se sont montrées sensibles. A l'exception de Jouda qui s'est montrée plus résistante à toutes les races de *P. triticina* testées au laboratoire (selon la méthode Ezzahiri).

Le tableau 1: résume des données agronomiques apportées du CRRA de Meknès sur la réaction au champ, des variétés du blé tendre par année d'observation.

Tableau 1 : Réaction au champ des variétés du blé tendre vis à vis de *P. triticina*, par années d'observation, réalisée au CRRA de Meknes (Jlibene).

Variétés	**2001**	**2002**	**2003**
Siete Cerros	S	MS	S
Nasma	MS	MS	MR
Fertas	S	S	S
Tegyey 32	MS	S	S
Achtar	MS	MS	MS
Saba	S	S	S
Massira	MS	S	MS
Potam	MS	MS	MS
Kanz	MS	MS	MS
Tagyey	S	S	S
Sais*4/14-2	S	S	S
Amal	MS	MS	MS
Marchouch	S	S	S
Sais	MR	MR	MR
Acsad 59	MS	MR	MR
Khair	MS	MS	MS
Jouda	R	R	R

R : Résistante, S : Sensible, MR : Modérément Résistante, MS : Modérément Sensible

L'amélioration génétique classique du blé tendre vis-à-vis de la rouille brune donne d'excellents résultats et a permis le développement de plusieurs cultivars résistants aux différents biotypes de cette maladie. L'utilisation de variétés de blé résistantes à la rouille brune constitue un moyen de contrôle efficace et qui prend en considération l'aspect écologique aussi bien qu'économique. Cependant, le développement de ces variétés est un processus de longue haleine qui nécessite plusieurs générations (Foster et al., 1991 ; Ratcliffe et al., 1994). Avec le développement rapide de nouveaux biotypes, les méthodes traditionnelles de sélection deviennent lourdes et plus compliquées.

Tous ces problèmes inhérents à la sélection conventionnelle de la résistance à la rouille brune justifient la mise au point de stratégies plus efficaces et rapides pour le contrôle de cette maladie. Alors, une prévision de la rouille s'impose, si l'on veut fiabiliser la lutte fongicide dans la zone de prédilection de cette maladie. Nous avons ciblé notre étude aux variétés de blé tendre qui manifestent une certaine résistance, correspondant à la présence dans le génome de l'hôte de gènes majeurs de résistance, s'exprimant à tous les stades de la plante. En utilisant d'abord la technique ISSR pour identifier le marqueur ISSR qui peut être lié au microsatellite du gène Lr 35 de la résistance adulte à la rouille brune, qui sera marqué avec le DIG-High Primer par amorçage aléatoire (random priming). Ce marqueur va être utilisé par la suite comme sonde pour hybrider les séquences d'ADN fixées à la membrane, obtenues par RFLP, avec lesquelles il est homologue.

L'objectif de ce travail est d'identifier le marqueur moléculaire lié à la résistance adulte des variétés marocaines du blé tendre à la rouille brune par le biais des marqueurs moléculaires ISSR.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de lignées de blé tendre développées à l'INRA de Meknès (Jlibène, 1996). Ces lignés constituent les principales variétés cultivées au Maroc (Nasma, Marchouch, Kanz, Tilila, Amal, Achtar, etc.). Ces variétés sont attaquées par la rouille brune puisqu'elles sont toutes sensibles à *P. triticina,* et une source de résistance à *P. triticina* (Jouda), non attaquée par la rouille brune, ainsi qu'une variété mexicaine utilisée par l'INRA de Meknès, connue par sa résistance à *P. triticina* dans les croisements (Sannine...). Cette résistance a été efficace depuis la dernière épidémie qui a eu lieu au Mexique en 1977 (Dubin et Torres, 1981).

Méthodes

a) Extraction de l'ADN génomique

Le matériel foliaire a été récolté sur les différentes plantes au stade 5-6 feuilles (plante adulte). 0,5 à 1g de chaque échantillon est broyé dans l'azote liquide. Le broyat est extrait en utilisant le CTAB selon la méthode de Silva et Procunier, 1994.

b) Le choix des amorces

Les 6 amorces ISSR testées pour le criblage du gène de résistance à la rouille brune des feuilles ont été procurées du laboratoire Eurobio. Leur séquence est donnée dans le tableau 2.

Tableau 2 : séquences nucléotidiques des 6 amorces ISSR utilisées.

Primer	Séquence
ISSR F1	AGAGAGAGAGAGAGAGTA
SN39 F2	AGAGAGAGTAGAAGAGCTGC
SN39 F3	GAGAGAGAGTAGAAGAGC
ISSR R1	AGAGAGAGAGAGAGAGCA
SR39 R2	AGAGAGAGCATCCACGA
SN39 R3	AGAGAGAGAGCATCCACC

c) Amplification par ISSR

L'amplification de l'ADN extrait a été effectuée par la technique d'ISSR (Ben El Maati et al. 2004). Le produit amplifié est déposé sur gel d'agarose 2% afin d'étudier la différence des profils éléctrophorétiques entre les variétés résistantes et les variétés sensibles à la rouille brune des feuilles.

d) Extraction du fragment d'ISSR cible à partir du gel low melting agarose

Après la localisation du fragment d'ISSR cible sur le gel low melting agarose, il a été coupé du gel en une bandelette puis élué dans du Tris-EDTA (pH=8) pendant 15 min à 50°C. On ajoute le même volume de phénol-chlorophorme, et on centrifuge pendant 5 min à 14000g. Ensuite deux extractions au phénol-chlorophorme sont effectuées pour éliminer l'excès de gel.

On prélève le surnageant qui contient l'ADN et on y ajoute le 1/10 du volume de NaAc 3M et 2V d'éthanol à –20°C. Après une nuit de précipitation a –20°C, on centrifuge à 14000 g pendant 30 min et on effectue deux lavages à l'éthanol 70%.

e) Marquage du fragment excisé

Le marquage froid du fragment cible est réalisé par amorçage aléatoire à l'aide du système DIG, qui est basé sur une haptène stéroïde, la digoxigénine alkali-labile, couramment présent dans la digitaline. Ce DIG est couplé au dUTP via une liaison ester-alkaline. Après marquage froid de la sonde, nous avons effectué une RFLP (Restriction fragment length polymorphisme)

Technique RFLP

a) Principe

Elle consiste en la mise en évidence de différences dans les profils de restriction entre génotypes pour une ou plusieurs enzymes de restriction donnée. Ces différences peuvent être liées soit à la perte ou à l'addition d'un site de restriction, soit à des mutations de type insertion-délétion. Cette technique repose sur l'utilisation d'un fragment d'ADN préalablement marqué comme sonde pour repérer, par hybridation moléculaire, des fragments génomiques qui lui sont homologues.

b) Digestion de l'ADN génomique

L'ADN génomique des différentes lignées de blé tendre étudiées est clivé pendant 8h à 37°C en présence de 1 U de chaque enzyme de restriction dans un volume réactionnel total de 50 μl. Neuf enzymes de restriction (PstI, EcoRI, EcoRV, BamHI, HindIII, SacI, ScaI, XbaI, InfI) ont été utilisées séparément et en combinaison double et triple (40 combinaisons en total) pour la digestion de l'ADN génomique de nos variétés.

c) Traitement du gel et transfert

Après migration des échantillons sur gel d'agarose 0.8% sous faible voltage pendant 8 à 12h, un traitement de ce gel a été effectué afin d'assurer un bon transfert.

Le gel traité est transféré par capillarité sur une membrane de Nylon chargée positivement selon la méthode de Southern (1975).

L'ADN est ensuite fixé irréversiblement à la membrane pendant 2 heures à 80°C.

d) Préhybridation et hybridation

La membrane est d'abord pré hybridée pendant 6 h à 68°C dans 30 ml de solution de pré-hybridation (5 X SSC, 1% réactif de blocage, 0.1% N-lauryl-sarcosyl, 0.02% SDS), à fin de la saturer et d'éviter ainsi toute fixation non spécifique de la sonde.

L'hybridation s'effectue durant une nuit à 68°C dans la même solution de pré-hybridation à laquelle on ajoute la sonde préalablement marquée et dénaturée.

e) Lavages

Les lavages de la membrane sont effectués à 68°C, afin d'assurer une bonne fixation de la sonde et d'éliminer tout l'excès de tampon

f) Immunodétection

La membrane hybridée est soumise à une détection immunologique en la mettant en contact avec une solution d'anticorps hautement spécifique anti- Digoxigénine couplés à une alcaline phosphatase. La révélation proprement dite se fait par coloration. La déphosphorylation du NBT-X phosphate (substrat de l'alcaline phosphatase) par cette enzyme conduit à un changement de couleur du jaune au rouge brique.

Résultats

Lors de cette étude, 6 amorces ISSR ont été utilisées pour étudier le polymorphisme existant entre les variétés résistantes et les variétés sensibles à la rouille brune.

Sont considérées comme bandes polymorphes, les bandes présentes chez les variétés résistantes mais absentes chez les variétés sensibles.

Sur les 6 amorces testées, une seule a détecté ce polymorphisme, ainsi les 5 autres amorces n'ont pas donné le polymorphisme recherché entre les 2 lignées étudiées.

Ce polymorphisme généré par l'amorce F2, est marqué par la présence d'une bande de 900 paires de bases chez les deux variétés résistantes (Jouda et Sannine...), mais qui est absente chez les autres variétés sensibles (Figure 1). Ceci montre que l'amorce F2 a amplifié la bande 900 paires de bases qui n'existe que chez les variétés résistantes. Ce résultat a été déjà montré par la même amorce chez des variétés de blé canadiennes résistantes à la rouille brune (Gold et al. 1999).

Cette bande pourrait donc correspondre au marqueur moléculaire décrit par les auteurs comme étant liés au gène (Lr35) de résistance adulte à la rouille brune. Ceci est d'autant plus confirmé que les variétés Jouda et Sannine... sont connues par leur résistance à *P. triticina*.

La bande correspondante à ce marqueur a été extraite à partir du gel low melting agarose. Elle a été marquée à l'aide d'un nucléotide froid, le dUTP digoxygénine. Ce marqueur a ensuite été utilisé comme sonde afin d'hybrider l'ADN génomique de nos variétés, traitées par les 9 enzymes de restriction par la technique RFLP.

La réaction de coloration a montré que les variétés Jouda et Sannine... ont montré une hybridation spécifique, ce qui est donc en faveur de notre hypothèse, alors que les autres variétés, réputées être sensibles, n'ont montré aucune hybridation (Figure 2).

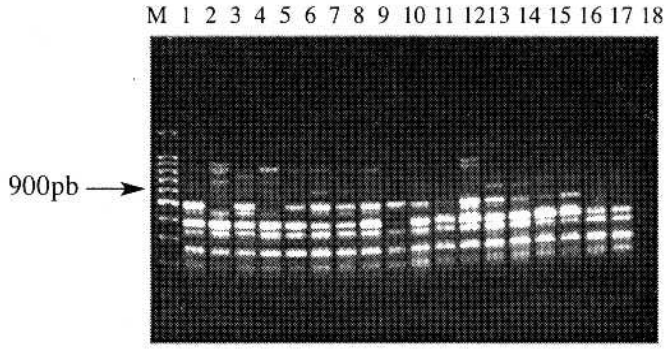

Figure 1 : fingerprint généré par l'amorce ISSR F2 et qui montre le polymorphisme (bande de 900 paires de bases) existant entre les variétés résistantes et sensibles à *P. triticina*.

M= Marqueur de taille ladder 100 pb, 1 : Amal, 2 : Jouda, 3 : Achtar, 4 : L254, 5 : Sais, 6 : Marchouch, 7 : Nasma, 8 : Nesser, 9 : Mahdia, 10 : Kanz, 11 : Saada, 12 : Sannine..., 13 : Potam, 14: Baraka, 15 : Acsad59, 16 : Tilila, 17 : Sibara, 18 : Khair.

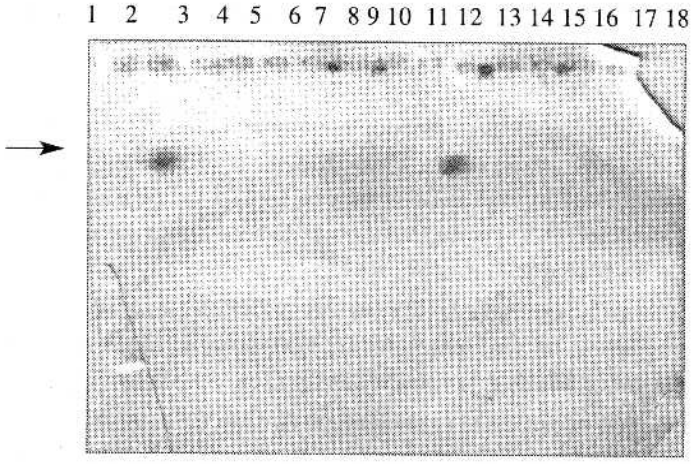

Figure 2 : Membrane montrant les résultats de la RFLP : les hybridations correspondent à la localisation des fragments d'ADN homologues à la sonde, chez les variétés résistantes. La sonde utilisée est le marqueur ISSR F2-900, marqué par un nucléotide froid; le dUTP-DIG.

Discussion

En vue de contribuer à l'amélioration génétique de la résistance du blé tendre à la rouille brune, nous avons cherché à identifier des marqueurs moléculaires ISSR liés aux gènes de résistance à cette maladie.

La technique choisie est une technique d'empreintes génétiques, qui a pu nous fournir plusieurs dizaines de marqueurs, dont le marqueur F2-900 qui a détecté le polymorphisme existant entre les deux lignées de blé étudiées. Ce polymorphisme qui est marqué par une bande de 900 paires de bases présente chez les deux variétés résistantes (Jouda et Sannine...) et absente chez les autres variétés sensibles à la rouille brune.

Après extraction et marquage de ce marqueur ISSR F2-900 par amorçage aléatoire à l'aide d'un nucléotide froid, le dUTP-DIG, une technique codominante la RFLP a été réalisée. Ce qui a donné 2 hybridations spécifiques de ce marqueur sur la membrane contenant l'ADN obtenu par southern blot, au niveau des 2 variétés résistantes (Jouda et Sannine...). Ce qui montre que ce marqueur n'a trouvé sa séquence homologue qu'au niveau du génome de ces 2 variétés résistantes, chose qui peut conclure et approuver les travaux réalisés sur la rouille du blé (Matal, 1981 ; Talibi, 1984 ; Ezzahiri, 1990 ; Seyfarth et al., 1998 ; Gold et al., 1999). Donc, ce marqueur peut être bien lié au gène de résistance adulte à la rouille brune.

La découverte du premier marqueur moléculaire étroitement lié au gène de résistance adulte de la rouille brune a été rapportée par Seyfarth et al. (1998). Ce marqueur de type

RFLP est lié au gène Lr35 localisé sur le chromosome 2B du blé tendre. Seyfarth et al. (1999) ont confirmé, plus tard, des marqueurs STS liés également au gène Lr35 qui contrôle la résistance adulte à la rouille des feuilles, porté par le chromosome 2B, et qui a une taille de 900 paires de bases.

D'autre part et en comparaison avec les données agronomiques de différentes études (Matal, 1981 ; Talibi, 1984 et Ezzahiri, 1990, Jlibene 1996) qui ont montré que parmi toutes les variétés du blé tendre marocaines testées, seule Jouda s'est montrée résistante au champ et au laboratoire vis à vis de *P. triticina*. Ce qui confirme nos résultats moléculaires trouvés par les techniques ISSR et RFLP.

Notre étude a pu identifier qu'entre les 25 marqueurs ISSR générés par les 6 amorces (Ben El Maati et al., 2004), un seul marqueur F2-900, pourrait montrer une liaison avec le gène Lr35 de résistance adulte à la rouille des feuilles.

Chez des lignées isogéniques de blé canadiennes, Gold et al. (1999) ont pu développer des marqueurs ISSR, liés d'une part au gène Lr35 de résistance adulte à la rouille brune des feuilles, qui a la même taille trouvée par notre marqueur ISSR (900 paires de bases) sur nos variétés étudiées.

La mise en évidence d'une liaison entre un marqueur moléculaire ISSR F2 et un gène majeur Lr35 de résistance adulte à la rouille brune, est une aide précieuse pour le sélectionneur. Puisque ces marqueurs moléculaires ISSR peuvent donc apporter de nouvelles réponses aux problèmes liés à la sélection traditionnelle vis-à-vis de la rouille brune, ils permettent de rendre plus précises et plus rapides les opérations classiques de sélection (Najimi, *et al.* 2003).

Les marqueurs moléculaires ont déjà fait leur preuve de robustesse et de précision pour l'étiquetage et la cartographie de caractères d'intérêt chez les plantes particulièrement chez le blé. L'identification de marqueurs moléculaires ISSR liés au gène Lr35 de résistance adulte à la rouille brune va permettre un diagnostic précoce du matériel génétique en sélection pour cette résistance, difficile à évaluer sur la base de phénotype.

Cependant, il y a un risque que ce gène de résistance soit contourné par de nouvelles races virulentes une fois utilisé à grande échelle. Il est donc conseillé qu'il soit utilisé en association avec d'autres gènes majeurs ou accompagné de gènes mineurs pour plus de durabilité.

Références Bibliographiques

Abdel Hak TM., Nabila AE., Bassiouny AA., Dauadi Y. 1980. Control of wheat leaf rust by systemic fungicides. Proceedings of the fifth European and Mediterranean cereal rusts conference, Italy.

Ben El Maati F., Jlibene M., Moumni M. 2004. Study of the polymorphism of common wheat using ISSR markers. JFAE. Vol. 2, (3&4) : 121-125.

Börner A. Röder M. S., Unger O., Meinel A. 2000. The detection of molecular mapping of a major gene for non-specific adult plant disease resistance against stripe rust (*Puccinia stritiiformis*) in wheat. Theoretical and applied genetics 100 (7): 1095-1099.

Diouri M. 1988. Contribution à l'étude de la rouille brune du blé dans le Sous Massa. Thèse. IAV. Hassan II. Rabat.

Dubin HJ., Torres E. 1981. Causes and consequences of the 1976-77 wheat leaf rust epidemic in northwest Mexico. Annual Review of Phytopathology, 19: 41-49.

Dekkers JCM., Hospital F. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations [Review]. Natl. Rev. Genet. 3 (1): 22–32.

Eagles HA., Bariana HS., Ogbonnaya FC., Rebetzke GJ., Hollamby GJ., Henry RJ., Henschke PH., Carter M. 2001. Implementation of markers in Australian wheat breeding. Aust. J. Agric. Res. 52 (11–12): 1349–1356.

Ezzahiri B. 1990. Wheat leaf rust. An epidemiological approach to disease development in Morocco and inheritance and expression of adulte plant resistance in Era wheat. Thesis I.A.V. Hassan II. 112 pp.

Foster JE., Ohm HW., Patterson FL., Taylor PL. 1991. Effectiveness of deploying single gene resistance in wheat for controlling damage by the Hessian fly. Environ. Entomol. 20: 964-969.

Gold J., Don H., Fred TS., Taing A. 1999. Development of a molecular marker for rust resistance genes Sr39 and Lr35 in wheat breeding lines. http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v2n1/art04.pdf.

Gupta PK., Varshney RK., Sharma PC., Ramesh B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breed. 118: 369–390.

Houari A. 1969. Contribution à l'étude de la pathogénie de la rouille brune du blé (*Puccinia triticina*). Mémoire de fin d'études, I.A.V. Hassan II, Rabat. 59 p.

Hospital F. 2001. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. Genetics 158 (3): 1363–1379.

Jlibene M. 1996. Mise au point des lignées isogéniques de blé tendre avec différents niveaux de résistance aux rouilles et à la cécidomyie. In : Ezzahiri B., Lyamani A., Farih

A.& El Yamani M. (ed). Symposium Régional sur les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires, Rabat, Maroc, 11-14 Nov., 1996, pp : 257-264.

Keller M., Keller B., Schachermayr G., Winzeler M., Schmid JE., Stamp P., Messmer MM. 1999. Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat x spelt population. Theor. Appl. Genet. 98 (6–7): 903–912.

Langridge P., Lagudah ES., Holton TA., Appels R ., Sharp PJ., Chalmers KJ. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. Aust. J. Agric. Res. 52: 1043–1077.

Liu XM., Smith CM., Gill BS., Tolmay V. 2001. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. Theor. Appl. Genet.102 (4) : 504–510.

Matal N. 1981. Contribution a l'étude de la pathogénie des agents des rouilles noire et brune du blé et sources de résistance à l'oïdium de l'orge au Maroc. Mémoire de fin d'études IAV. Hassan II. 72 p.

Messmer MM., Seyfarth R., Keller M., Schachermayer G., Winzeler M., Zanetti S., Feuillet C., Keller B. 2000. Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat. Theor. Appl. Genet. 100: 419–431.

Moreau L., Charcosset A., Gallais A. 2001. Efficiency of marker-assisted selection compared with conventional selection. OCL-Ol. Corps Gras Lipides 8 (5): 496–501.

Najimi B., El Jaafari S., Jlibene M., and Jacquemin JM. 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. BASE 7 (1): 17-35.

Ratcliffe RH., Safranski GG., Patterson FL., Ohm HW., Taylor PL. 1994. Biotype status of Hessian fly populations from the Eastern United States and their response to 14 Hessian fly resistance genes. J. Econ. Enthomol. 87 (4): 1113-1121.

Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. 1999. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene Lr35 in wheat. Theor. Appl. Genet. 99 (3–4): 554–560.

Silva SVP., Procunier JD. 1994. Genomic fingerprinting using the PCR-random amplified polymorphic DNA technique. In: J.W. Dale and PG. Sanders eds., Methods of gene technology, JAI Press, Middlesex, U.K., vol.2, p : 319-336.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol.: 98-503.

Talibi A. 1984. Progression de la septoriose et de la rouille brune dans un mélange du blé dur et du blé tendre et comparaison du comportement de quelques variétés de blé vis à vis de la rouille brune. Mémoire de fin d'études, I.A.V; Hassan II., Rabat. 58 p.

Van Der Plank, 1968. Disease resistance in plants. Acad. Press, New York. 206 pp.

Yencho GC., Cohen MB., Bryne PF. 2000. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. Annu. Rev. Entomol. 45: 393–422.