

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Institut National Agronomique – El Harrach – Alger
المعهد القومي للعلوم الفلاحية – الحراش – الجزائر

MEMOIRE

En vue de l'Obtention du Diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

Option:

**Phytopathologie et Amélioration de la Résistance des
Plantes aux Maladies**

Thème:

**Etude du polymorphisme génétique chez l'orobanche de la
fève: *Orobanche crenata* Forskall. en Algérie, par
l'utilisation des marqueurs moléculaires
RAPD et AFLP**

Présenté par : Melle AOUALI SOUHILA

Devant le jury d'examen:

Président : Louanchi M.
Directeur de thèse : Bouznad Z.
Codirecteur de thèse : Zermane N.
Examineurs : Khelifi L.
Keddou M.
Invité d'honneur: Feliachi K.

Année Universitaire : 2004/2005

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de génétique moléculaire et de mapping génétique de l'AGERI du Centre de Recherche Agronomique du Caire, grâce à un financement par l'UNESCO (bureau régional du Caire) .

A l'aboutissement de ce travail, je voudrais exprimer ma sincère gratitude et mes vifs remerciements au Prof. BOUZNAD Zouaoui, Directeur de la post-graduation de l'Institut National Agronomique d'El Harrach (Alger), pour avoir supervisé ce travail. Je lui suis grandement redevable pour son aide et pour ces critiques constructives, pour ses orientations et ses encouragements tout au long de ce travail.

Je voudrais aussi exprimer ma profonde reconnaissance à mon coo-dirécteur de thèse ZERMANE Nadjia, pour l'inspiration qu'elle m'a donné et pour m'avoir initié au domaine des plantes parasites, pour ses orientations, ses précieux conseils et ses encouragements continus, son aide morale et la confiance qu'elle m'a témoigné.

Je suis aussi particulièrement reconnaissante au Dr. FELIACHI Kamel, Directeur de l'Institut National de la Recherche Agronomique Algérien, pour son aide précieuse et son support moral et effectif dans l'accomplissement de mon travail de recherche, pour ses encouragements et ses conseils constructifs.

Je remercie sincèrement:

Le Dr. LOUANCHI Meriem, Maitre de conférence à l'Institut National Agronomique d'El Harrach (Alger), pour avoir accepté de présider ce jury.

Le Dr. KHELIFI Lakhdar, Maitre de Conférence à l'Institut National Agronomique d'El Harrach (Alger), pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Le Dr. Keddam Mohamed, Directeur de la recherche de l'institut national de la protection des végétaux, pour avoir si gentiment accepté d'examiner ce modeste travail.

Je n'oublierais pas de remercier vivement le Prof. Dr MADKOUR Magdy, Directeur adjoint du Centre de Recherche Agricole (ARC-Egypt), pour m'avoir aidé à accomplir mes manipulations au laboratoire de génétique moléculaire et de mapping génétique de l'AGERI. Je remercie aussi tout le staff de l'AGERI, et particulièrement le Dr. EL KHISHINE Dina, Dr. SAAD EID Mohamed, le Dr. Radi Amina, et le Dr. Shokry Ahmed, pour leurs orientations scientifiques, leur chaleureux accueil, et leur support moral tout au long de mon séjour à Giza.

J'adresse aussi, une reconnaissance particulière à Mr. FAIED Mohamed, pour m'avoir initié aux techniques de marquage moléculaire, pour m'avoir orienté, et pour avoir consacré son savoir scientifique et technique pour me former.

Je remercie également le Dr. EL ITRIBY Haniya, Directrice de l'AGERI, et le Dr. Taymour, pour leurs encouragements, toutes les facilités qu'ils m'ont fournies et l'égard qu'ils m'ont témoigné.

Au témoignage de leur sincérité et pour leur support moral, et leurs encouragements je n'oublierais pas de remercier tous mes amis, qu'ils se reconnaissent par eux même.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail.....

à la mémoire de mes grands-parents, qui auraient été sûrement fier de moi aujourd'hui,

Et

*à mes parents, qui sans eux je n'aurais jamais été
ce que je suis aujourd'hui*

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	1
Chapitre 1 . REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1. Introduction à l'étude de l'<i>Orobanche crenata</i> Forskall.	6
1.1.1 Presentation de la plante parasite	6
1.1.1.1. Description botanique de l'<i>Orobanche crenata</i> Forsk. (1775)	6
1.1.1.2. Description botanique de l' <i>Orobanche ramosa</i> / <i>Orobanche aegyptiaca</i>	10
1.1.2. Ecologie et biologie	14
1.1.3. Importance et dégâts causés par <i>Orobanche crenata</i> Forsk. dans le monde et en Algérie	
1.1.3.1. Importance dans le monde	14
1.1.3.2. Importance en Algérie	15
1.1.4. Symptomatologie et parasitisme	17
1.1.5. Variabilité chez le genre <i>Orobanche</i>	
1.1.5.1. Approche morphologique et cytologique	18
1.1.5.2. Dormance et viabilité	19
1.1.5.3. Agressivité et virulence	21
1.1.5.4. Polymorphisme génétique	22
1.1.5.4.1. Etude des allozymes	23
1.1.5.4.2. Polymorphisme de l'ADN génomique	23
1.1.6. Résistance génétique de la fève à <i>O. crenata</i>	26
1.1.7. Sources et nature de la résistance chez la fève à l'<i>O. crenata</i>	26
1.1.8. Stratégies de lutte contre l'<i>O. crenata</i> Forsk.	29
1.2 .Les marqueurs moléculaires	
1.2.1. Définition et propriétés des marqueurs moléculaires	31
1.2.2. Les applications des marqueurs moléculaires	32
1.2.3. Les différents types de marqueurs moléculaires	
1.2.3.1. Les marqueurs protéiques	32
1.2.3.2. Les marqueurs d'ADN	33
1.2.3.2.1. Marqueurs d'ADN basés sur l'hybridation moléculaire	34

1.2.3.2.2. Marqueurs d'ADN basés sur l'amplification par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction)	
1.2.3.2.2.1. Technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	35
1.2.3.2.2.2. Technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	35

Chapitre 2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal.....	40
2.2. Analyse électrophorétique des protéines natives (SDS PAGE)	
2.2.1. Préparation du gel d'électrophorèse.....	40
2.2.2. Préparation des échantillons.....	41
2.2.3. Electrophorèse.....	41
2.2.4. Coloration du gel et révélation des bandes protéiques.....	41
2.3. Extraction et purification de l'ADN génomique	
2.3.1.Extraction par la procédure du Kit Dneasy Plant	41
2.3.2. <i>Méthode de DOYLE & DOYLE (1990) modifiée</i>	
2.3.2.1. Extraction.....	44
2.3.2.2. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN	44
2.4. Analyse du polymorphisme de l'ADN par la technique RAPD.....	44
2.4.1. Amorces utilisées dans l'analyse RAPD	44
2.4.2. Préparation des mélanges réactionnels de la PCR	44
2.4.3. Programme PCR et profils de températures	45
2.4.4. Séparation par électrophorèse des produits de la PCR	46
2.4.5. Visualisation, dénombrement des bandes et photographie des gels	46
2.5. Analyse du polymorphisme de l'ADN par la technique AFLP.....	46
2.5.1. Description des différentes étapes de la méthode	
2.5.1.1. Restriction et digestion de l'ADN.....	46
2.5.1.2. Ligation des adaptateurs.....	47
2.5.1.3. Réaction de pré-amplification.....	47
2.5.1.4. Amplification sélective.....	48
2.5.1.5. Electrophorèse des produits d'amplification.....	49
2.5.1.6. Fixation, coloration et développement des bandes électrophorétiques.....	49
2.6. Analyse statistique des résultats.....	49

Chapitre 3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Analyse du polymorphisme protéique.....	53
3.2. Analyse du polymorphisme de l'ADN.....	57
3.2.1. Optimisation des conditions de la RAPD.....	57
3.2.1.1. Qualité de l'ADN	57
3.2.1.2. Programme-PCR	57
3.2.2. Identification des marqueurs RAPD et analyse des profils électrophorétiques.....	58
3.2.2.1. Variations génétiques intra et interspécifiques révélées par l'analyse RAPD.....	62
3.2.2.1.1. <i>Variation interspécifique</i>	62
3.2.2.1.2. <i>Variation intraspécifique</i>	66
3.2.3. Identification des marqueurs AFLP et analyse des profils électrophorétiques.....	67
3.2.4. Analyse comparative des deux types de marqueurs.....	76
4. Conclusion générale... ..	82
5. Références bibliographiques	87
6. Annexes	103

Liste des tableaux

Tableau	Intitulé	Page
Tableau 1.	Tableau comparatif de la morphologie d' <i>Orobanche crenata</i> et <i>O. ramosa</i> et <i>O. aegyptiaca</i> .	12
Tableau 2.	Estimations du pourcentage d'infestation et des pertes de récoltes dus à l' <i>Orobanche crenata</i> dans divers pays du monde.	15
Tableau 3.	Principales plantes hôtes d' <i>Orobanche</i> spp.d'intérêt économique en Algérie.	16
Tableau 4.	Principales études moléculaires de la diversité génétique du genre <i>Orobanche</i>	27
Tableau 5.	Origine des populations d' <i>Orobanche</i> étudiées	40
Tableau 6.	Profils électrophorétiques des protéines leur poids moléculaire et leur valeurs Rf.	54
Tableau 7.	Indice de similarité Dice, des bandes électrophorétiques	56
Tableau 8.	bandes polymorphiques et communes amplifiées par la RAPD	58
Tableau 9.	Taille en (bp) des fragments spécifiques amplifiés par les amorces RAPD	62
Tableau 10.	Matrice de similarité de la RAPD	62
Tableau 11.	Bandes spécifiques par espèce et par amorce	63
Tableau 12.	Marqueurs discriminants les deux sections du genre <i>Orobanche</i>	64
Tableau 13.	Tableau récapitulatif des marqueurs AFLP	68
Tableau 14.	Tableau récapitulatif des amplifications spécifiques et communes par amorce	69
Tableau 15.	Tableau récapitulatif des marqueurs spécifiques	69
Tableau 16.	Matrice des similarités de l'amorce <i>EcoRI</i> -AAC/ <i>MseI</i> -CAA	70
Tableau 17.	Matrice des similarités de l'amorce <i>EcoRI</i> -ACT/ <i>MseI</i> -CTC	70
Tableau 18.	Matrice des similarités de l'amorce <i>EcoRI</i> -AGC/ <i>MseI</i> -CTG	70
Tableau 19.	Corrélation de Pearson des marqueurs AFLP	72
Tableau 20.	Matrice des similarités des marqueurs AFLP combinés	72
Tableau 21.	Tableau récapitulatif des valeurs PIC	74
Tableau 22.	Comparaison des valeurs PIC et les taux de polymorphisme correspondants	74
Tableau 23.	Corrélation de Pearson, entre le taux de polymorphisme et les valeurs PIC des marqueurs AFLP	75
Tableau 24.	Corrélations de Spearman des matrices de similarité AFLP	75
Tableau 25.	Indice de diversité(DI), ratio multiplex effectif(E) et Indice marqueur (MI) des deux marqueurs RAPD et AFLP	77
Tableau 26.	Analyse des profils générés par la RAD et l'AFLP	77
Tableau 27.	Corrélation de Spearman des matrices de similarité de la RAPD et de l'AFLP	78
Tableau 28.	Matrice de similarité des données globales RAPD et AFLP	79
Tableau 29.	Distances géographiques (Km) entre les différentes localités de collecte	80

Liste des figures

Figure	Intitulé	Page
Figure 1.	<i>Orobanche crenata</i>	8
Figure 2.	Structure florale et la forme de la fleur chez <i>O. crenata</i>	8
Figure 3.	<i>Variation de la couleur chez O.crenata</i>	9
Figure 4.	<i>Orobanche ramosa</i>	11
Figure 5.	Structure florale et la forme de la fleur chez <i>O. ramosa</i>	11
Figure 6.	<i>Structure florale chez la section Trionychon et Osproleon</i>	13
Figure 7.	<i>Comparaison de l'O. crenata et l'O. ramosa</i>	14
Figure 8.	<i>O.crenata</i> sur culture de fève	17
Figure 9.	<i>O.crenata</i> sur culture de pois chiche	17
Figure 10.	Champs de fève complètement infesté par <i>O.crenata</i>	18
Figure 11.	Procédure du DNeasy Plant Mini kit	43
Figure 12.	Profils électrophorétiques des protéines natives.	55
Figure 13.	Dendrogramme des protéines	56
Figure 14.	ADN extrait selon la méthode du Dneasy Plant MiniHand Book	58
Figure 15.	ADN extrait selon la méthode Doyle & Doyle (1990)	58
Figure 16.	Polymorphisme de l'ADN, généré par les amorces B18 et B1	59
Figure 17..	Polymorphisme de l'ADN, généré par les amorces C7 et B12	59
Figure 18.	Polymorphisme de l'ADN, généré par les amorces B13 et C9	60
Figure 19.	Polymorphisme de l'ADN, généré par les amorces B20 et B5	60
Figure 20.	Polymorphisme de l'ADN, généré par les amorces G15 et G19	61
Figure 21.	Dendrogramme de la RAPD	62
Figure 22.	Profils générés avec l'amorce <i>EcoRI-AAC/MseI-CAA</i>	67
Figure 23.	Profils générés avec l'amorce <i>EcoRI-ACT/MseI-CTC</i>	67
Figure 24.	Profils générés avec l'amorce <i>EcoRI-AGC/MseI-CTG</i>	67
Figure 25.	Taux de polymorphisme générés par chaque amorce AFLP	68
Figure 26.	Dendrogramme généré par l'amorce <i>EcoRI-AAC/MseI-CAA</i>	71
Figure 27.	Dendrogramme généré par l'amorce <i>EcoRI-ACT/MseI-CTC</i>	71
Figure 28.	Dendrogramme généré par l'amorce <i>EcoRI-AGC/MseI-CTC</i>	71
Figure 29.	Dendrogramme des trois amorces AFLP combinées	72
Figure 30.	Schéma global des associations des cinq populations d' <i>O. crenata</i>	73
Figure 31.	Représentation des valeurs de la corrélation de Spearman r , des trois amorces AFLP	73
Figure 32.	Représentation graphique des valeurs PIC	75
Figure 33.	Comparaison des valeurs PIC avec les taux de polymorphisme	76
Figure 34.	Dendrogramme des données RAPD et AFLP combinées	79
Figure 35.	Régions prospectées et distances génétiques entre les différentes populations d' <i>Orobanche</i>	80

Liste des abréviations :

APS: Ammonium persulfate

BC : bande commune

BU : bande unique

CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide

DNTPs: Deoxyribonucleosides triphosphates

DMSO: Dimethylsulfoxide

EcoRI : Enzyme de restriction extraite à partir de la bactérie : *Escherichia coli*

EDTA : Ethylenediamine tetraacetate

ISSR: Inter Simple Sequence Repeats

MseI : Enzyme de restriction extraite à partir de la bactérie : *Micrococcus* sp

OA: *O. aegyptiaca*/ -

OCEF: *O. crenata*/Erbaatache/Fève

OCIF : *O. crenata*/INA/Fève

OCKD:*O. crenata*/Khemis El Khechna/*Daucus carota*

OCOF : *O. crenata*/Oued Smar/Fève

OCOP: *O. crenata*/Oued Smar/Pois

OCSF: *O. crenata*/Staoueli/Fève

OCTF:*O. crenata*/Tipaza/Fève

OP : OPERON

ORA: *O. ramosa*/ Oxalis

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PVP: Polyvinylpyrrolidone

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeats

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borate EDTA

TE : Tris-HCl EDTA

TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

1.

Introduction

Introduction:

La fève (*Vicia faba*) est une espèce largement répandue dont l'aire de répartition géographique mondiale est l'une des plus étendues par rapport aux autres légumineuses alimentaires.

Cette culture est connue pour être une source de protéines végétales riche et peu coûteuse pour l'alimentation humaine. En Algérie, elle joue avec le pois chiche un rôle important dans l'équilibre du régime alimentaire qui est essentiellement basé sur les céréales. En plus de son intérêt nutritionnel, elle est introduite en rotation avec les céréales où elle joue un rôle non négligeable dans l'enrichissement des sols en azote.

En Algérie la fève occupait près de 50% de la superficie totale réservée aux légumineuses alimentaires soit une superficie de l'ordre de 60 263 ha et une production totale de 21 560 T et un rendement de 6,7qx/ha. Cette superficie a régressé (une baisse de 52% par rapport à la période 1980-1984) au cours des 30 dernières années, pour finalement se stabiliser autour de 32 110 ha (Feliachi, 2002).

Cependant cette culture a été soumise à de multiples contraintes biotiques et abiotiques qui font que les rendements sont faibles et irréguliers (Kharrat et *al.*,1997). Parmi les facteurs biotiques limitants, les plantes parasites principalement l'*Orobanche crenata*, qui occasionnent des dégâts considérables. L'*O. crenata* affecte la fève, le pois, la lentille le pois chiche, la carotte, le tournesol et la laitue. Les cultures de fèves subissent de grandes pertes de rendement, allant de 5% à 100% de la production totale (Sauerborn & Saxena, 1980). Mesa-Garcia et *al.*(1986) indiquent que le problème de l'orobanche pousse parfois les agriculteurs à abandonner la culture de la fève, entraînant une forte réduction de la production des protéines végétales et à une augmentation des coûts de la fertilisation azotée.

Les espèces appartenant au genre *Orobanche* telles que *Orobanche crenata*, *Orobanche aegyptiaca* et *Orobanche ramosa* sont les espèces les plus dévastatrices. En Algérie, les pertes de rendement dues à cette plante parasite sont importantes, et les surfaces infestées sont estimées à 10% de la surface totale des légumineuses (Abu-Irmalah, 1994).

Bien que les pertes des rendements dues à l'*Orobanche crenata* ne soient pas bien précisées en Algérie, plusieurs services de la protection des végétaux à travers le pays rapportent l'importance des dégâts causés par ce parasite notamment dans les cultures de fève, de petit pois, de lentille, de vesce et de carotte. La situation alarmant

e dans les autres pays du Maghreb et du bassin Méditerranéen, peut nous renseigner sur le danger que représente cette plante parasite pour les cultures de légumineuses alimentaires et plus particulièrement la culture des fèves, ainsi que ses répercussions néfastes sur le plan socio-économique (Zermane, communication personnelle).

Le problème de l'orobanche en Algérie prend de plus en plus d'ampleur. Les régions du littoral sont devenues impropres à la culture des fèves, à cause des fortes infestations des parcelles de culture par cette plante parasite.

D'une manière générale, les mesures de contrôle et de lutte contre l'O. crenata reposent sur le semis tardif et l'arrachage manuel, ou en utilisant les produits chimiques (Glyphosate) ou encore l'emploi des plantes pièges et les plantes faux hôtes, ont permis une réduction des taux d'infestation par ce parasite, contre lequel aucune méthode de lutte totalement efficace n'est encore connue. En revanche l'utilisation de variétés résistantes pourrait être le moyen de lutte le plus facile et le plus économique pour lutter contre les plantes parasites.

Cependant, pour être efficace, la lutte par la sélection et l'amélioration, nécessite une connaissance préalable de la diversité génétique du phanérogame parasite, qui peut à tout moment briser la résistance ou la tolérance de la variété améliorée.

Plusieurs auteurs ont étudié la diversité génétique, dans un premier temps par l'utilisation des isoenzymes, mais cette technique a présenté beaucoup de limites : faible polymorphisme, variation des protéines dans les différents tissus de la plante sous l'influence des facteurs de l'environnement et des stades de développement de la plante.

De nos jours, une attention particulière est accordée aux marqueurs moléculaires en tant que source de polymorphisme riche, fiable et stable. Puisque la séquence d'ADN de chaque individu est unique, elle peut donc être exploitée afin d'étudier la diversité génétique et la parenté génétique entre les populations d'une même espèce.

Plusieurs raisons ont motivé l'intérêt que nous avons porté à l'étude de cette plante parasite:

1. la diversité génétique des espèces du genre *Orobanche*, offre un champ d'études génétique très grand;
2. la menace permanente de nos cultures par ce parasite, qui se dissémine facilement et dont la longévité de ses graines peut aller jusqu'à 12 ans dans le sol;
3. le manque de travaux académiques dans le domaine des plantes parasites et en particulier celui de l'orobanche en Algérie.

A cet effet, dans la présente étude, l'approche biochimique et moléculaire basée sur l'électrophorèse des protéines, la RAPD et l'AFLP a été privilégiée, pour l'étude du polymorphisme inter et intraspécifique de l'*Orobanche crenata* en Algérie.

Le présent travail a pour objectifs :

1. d'étudier la possibilité d'employer les techniques biochimiques et moléculaires, à savoir l'électrophorèse des protéines natives, la RAPD et l'AFLP pour différencier les espèces *Orobanche ramosa*, *Orobanche aegyptiaca* et *Orobanche crenata*, et de déceler le polymorphisme génétique intraspécifique existant entre les 8 écotypes d'*O.crenata* collectés dans des localités différentes au niveau de la région de la Mitidja.
2. de comparer l'efficacité des deux techniques: RAPD et AFLP, dans la détection du polymorphisme génétique intraspécifique, entre les 8 écotypes de l'orobanche de la fève.

2.

Recherche Bibliographique

1.Introduction à l'étude de l'Orobanche de la fève *Orobanche crenata* Forsk. (1775) :

Les légumineuses alimentaires sont connues pour être une source riche en protéines. En plus de leur intérêt sur le plan nutritionnel, les légumineuses alimentaires jouent un rôle important dans l'agriculture. Grâce à leur pouvoir fixateur d'azote, elles enrichissent le sol en cet élément et sont de ce fait introduites en rotation avec les céréales et d'autres cultures.

En Algérie, la fève est la plus importante culture du secteur des légumineuses alimentaires occupant près de 50% de la superficie totale allouée à ces cultures qui est de l'ordre de 60 263 ha. Elles représentent plus de 50% de la production totale, soit 21 560 T avec un rendement de 6,7 qx/ha durant la campagne 2000/2001. Cette superficie a notablement régressé au cours des 30 dernières années soit une baisse de 52% par rapport à celle de la période (1980-1984), pour se stabiliser autour de 32 110 ha (Feliachi, 2002). Cette culture est pratiquée au niveau de l'ensemble des zones agro-écologiques de l'Algérie, dont les variétés les plus cultivées sont Aguadulce, Séville et New Mamouth (Khaldoun, 2001).

Malgré les progrès enregistrés dans l'augmentation des rendements à travers les différents programmes d'amélioration des cultures par l'introduction de variétés adaptées aux conditions climatiques, le problème des maladies et des plantes parasites telle que l'*Orobanche crenata*, reste l'une des plus importantes contraintes notamment dans la région centre du pays, qui porte préjudice aux rendements, non seulement en Algérie, mais aussi dans beaucoup d'autres pays du Bassin Méditerranéen.

1.1 Présentation de l'*Orobanche*

L'*Orobanche* est une plante parasite annuelle dépourvue de chlorophylle, appartenant à l'ordre des Personales (Scrophulariales) et à la famille des orobanchacées, voisine des scrophulariacées. Elle survit par des suçoirs sur les racines des plantes autotrophes, émettant des tiges raides, écailleuses porteuses d'épis de fleurs tubuleuses, bilabiées et parfois ornementales (Grisvard & Chaudun, 1964).

1.1.1.Description botanique de l'*Orobanche crenata* :

La plante est généralement vigoureuse, atteignant une hauteur de 15 à 50 cm et parfois plus de 100 cm. La tige est robuste et solide, rarement fine ou mince, dressée, d'une couleur rouge-brun, jaune-blanchâtre, jaune-doré, rougeâtre, richement poilue ou portant de tous petits poils ou encore presque glabre et légèrement écaillée au-dessus de l'inflorescence.

Les feuilles écailleuses sont ovales et allongées à lancéolées (Fig.1), presque glabres, élançées à déployées. L'inflorescence est habituellement dense de forme cylindrique allongée et les fleurs inférieures sont moins denses, avec des bractéoles absentes, les bractées sont aussi longues que la corolle, lancéolées, de couleur brun-noir, poilues et à pointe inclinée.

Les segments du calice sont bifides ou inégalement bidentelés ou encore totalement séparés, étroits et lancéolés à filiformes, nervurés, presque glabres, d'une longueur égale à celle de la corolle ou à ses deux tiers (2/3), de couleur jaunâtre à blanchâtre, avec une marge violette ou totalement violette (Kreutz,1995).

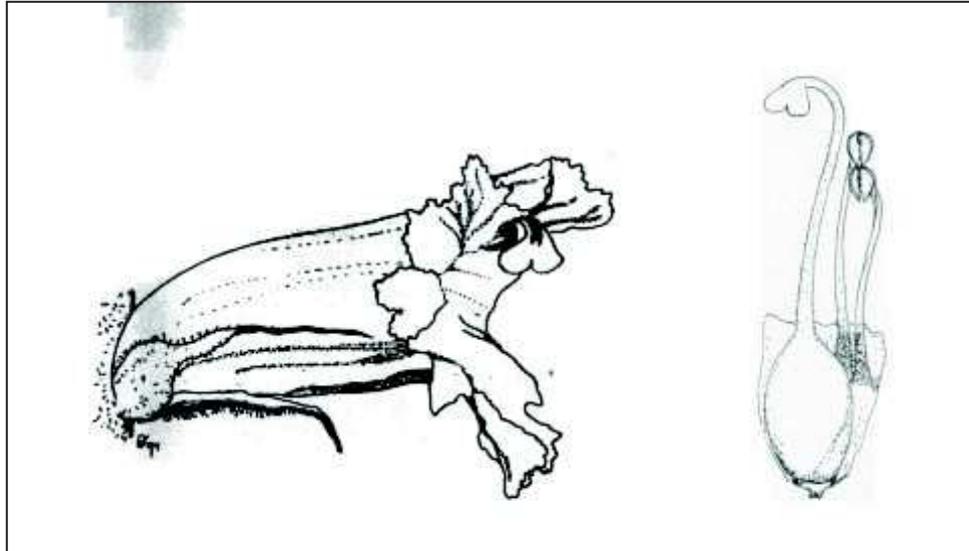
Les fleurs sont de taille moyenne ou large, dressées au sommet puis plus déployées (Fig.1). La taille de la corolle varie entre 25 et 30mm de long (10 à 20 mm chez les petits plants), tubul-campanulée renflée au-dessous de l'insertion des étamines, est légèrement poilue (poils claires ou presque glabres ou encore blanc ou jaunâtre-blanc) et tachetée de violet ou de rose spécialement près de la lèvre supérieure. La couleur de la corolle varie du blanc, jaune-blanc, mouchetée de rose ou de violet (Fig.3).

La fleur entière a des nervures noires ou violettes, la ligne dorsale est clairement courbée à la base, presque droite ou légèrement courbée au milieu, souvent dressée près de la pointe. La lèvre supérieure de la corolle est arrondie avec des lobes très larges et poreux, étalés, dont les pointes sont glabres. La lèvre inférieure de la corolle est constituée de trois lobes arrondis, pliés, avec le lobe central habituellement plus large que les deux autres. Les étamines sont insérées à 2-5 mm au-dessus de la base du tube de la corolle. Les filets sont très poilus à la base et moins poilus au-dessus des anthères ou rarement glabres (Fig.2).

Les anthères et le style sont souvent poilus, le stigmate est constitué de deux lobes sphériques et allongés de couleur blanche, orange, jaunâtre-blanc, rose ou violet-clair (Fig.2). Les fleurs dégagent une odeur d'œillets d'où l'appellation anglaise de carnation broomrape. Le nombre chromosomique est de $2n=38$ (Kreutz,1995).



Figure(1): *Orobanche crenata* (Photo par Bouznad Z. INA, 03/04/04.)



Figure(2): Structure florale chez *Orobanche crenata*
(Source: Kreutz C.A.J, 1995)



Figure(3): Variation de la couleur chez *O.crenata* (Photo par Bouznad Z. INA, 27/03/04)

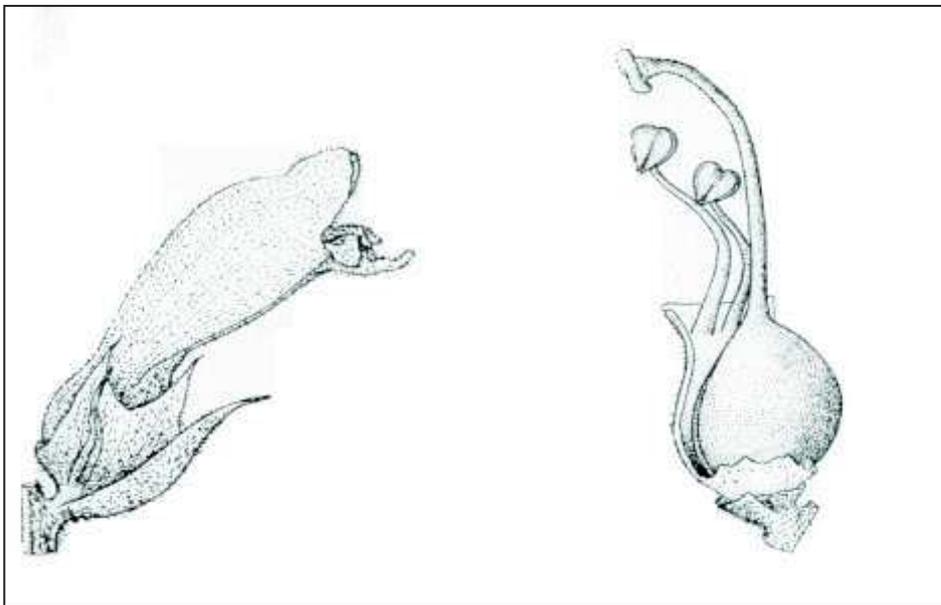
1.1.2. Description botanique de l' *Orobanche ramosa* / *Orobanche aegyptiaca*:

La plante est généralement effilée, de 8 à 45 cm de hauteur pour *O. ramosa* et 20-50 cm de hauteur pour *O. aegyptiaca*. La tige est fine, érigée et ramifiée, de couleur jaune, brun violet, bleuâtre ou violet pale, elle est fortement pubescente (Fig.4). L'inflorescence est généralement lâche comportant plusieurs fleurs ou de forme cylindrique et relativement dense avec peu de fleur. Les bractéoles sont lancéolées, de couleur violette à violet pale ou jaunâtre, et comportent des poils glandulaires blancs. Elles mesurent généralement le tiers de la longueur de la corolle. La bractée est lancéolée, aussi longue que la corolle, de couleur jaune-brun ou brune à pubescence prononcée. Le calice très pubescent, est tubul-campanulé, comporte généralement quatre dents, et mesure le tiers de la longueur de la corolle. Sa coloration varie du violet, violet pale au jaune. Les fleurs sont de petites taille, érigée au premier stade, puis se relâchent et se courbent à maturité. La corolle mesure entre 10 et 15 mm de long, elle est de forme tubulaire, légèrement étroite juste au-dessus de l'ovaire, puis s'élargit graduellement (Fig.4).

Elle est remarquablement pubescente, de couleur bleuâtre, violet à violet-bleuâtre, rarement jaune ou complètement blanche avec des nervations noires ou violettes. La ligne dorsale de la corolle est régulièrement courbe depuis sa base. La lèvre supérieure de la corolle est bilobée et pubescente, la lèvre inférieure, comporte trois lobes de forme ovale et de taille égale, et fortement pubescente. Les étamines s'insèrent à 2-4 mm au-dessus de la base du tube de la corolle (Fig.5). Les filaments sont pour leur majorité glabres ou légèrement pubescents à leur base. Les anthères sont glabres ou faiblement pubescents. Le style est légèrement pubescent. Le stigmate est constitué de plusieurs lobes sphériques de couleur blanche ou bleu clair, rarement de couleur jaune. Le nombre chromosomique est $2n=24$ (Kreutz,1995).



Figure(4): *Orobanche ramosa* (Photo par Bouznad Z. INA, 3/04/04)

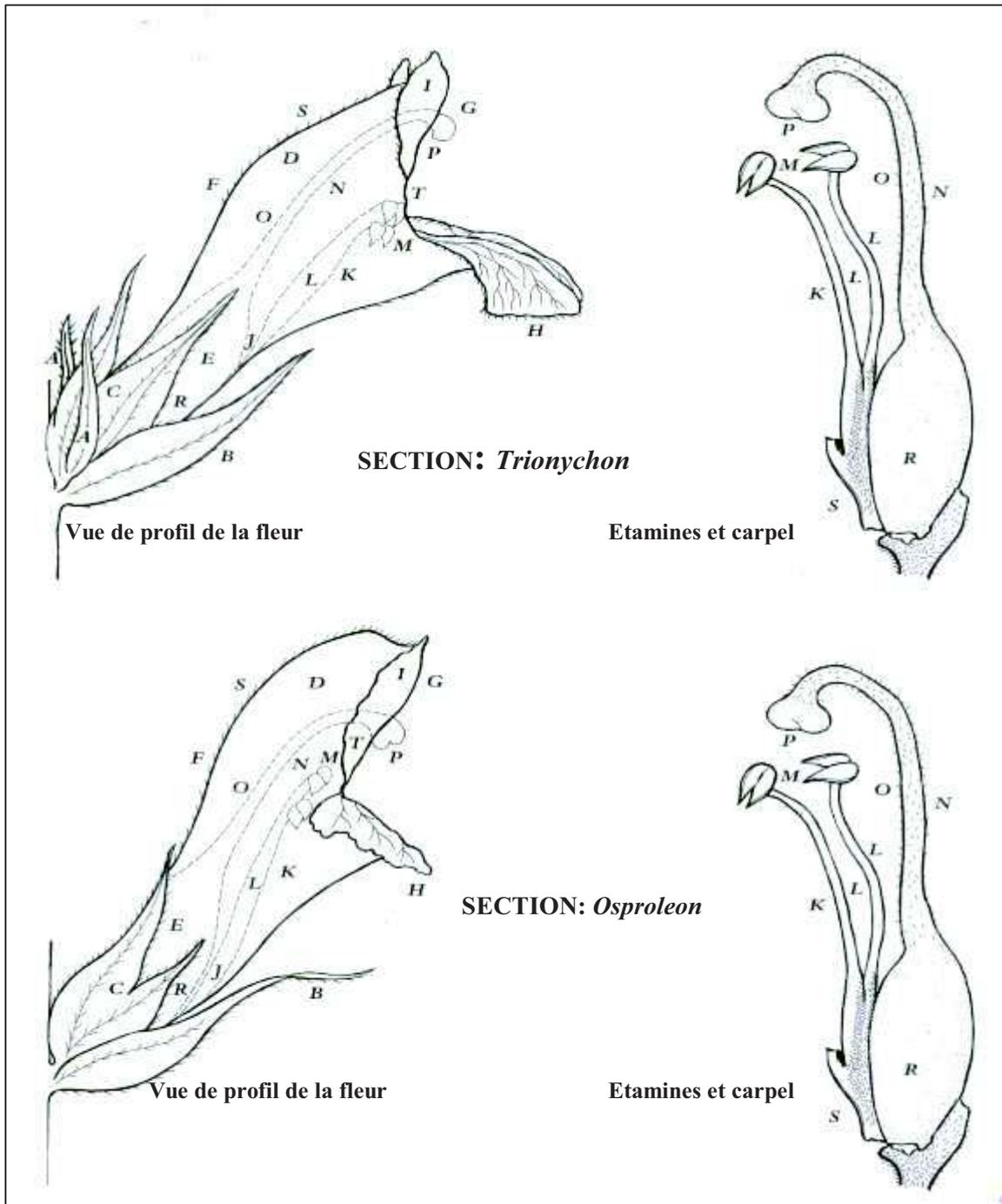


Figure(5): Structure florale chez *Orobanche ramosa*
(Source: Kreutz C.A.J, 1995)

Le tableau (1), résume les principaux caractères de différenciation des espèces *O. crenata* et *O. ramosa/O. aegyptiaca*. Ces dernières appartiennent à deux sections différentes, la section *Tryonikon* pour le complexe *O. ramosa/O. aegyptiaca* et *Osproléon* pour l'espèce *O. crenata* (Fig(6) et (7)).

Tableau (1) : Tableau comparatif de la morphologie d'*Orobanche crenata*
O. ramosa et *O. aegyptiaca*.

Caractère	<i>O. crenata</i>	<i>O. ramosa/O. aegyptiaca</i>
Hauteur de la plante (cm)	15-50 à 100	8-45 pour <i>O. ramosa</i> 20-50 pour <i>O. aegyptiaca</i>
Tige	Robuste, érigée, non ramifiée, richement pubescente, ou presque glabre	Maigre, fine, érigée et ramifiée, fortement pubescente
Couleur de la tige	rouge-brun, jaunâtre-blanc, jaune doré, rougeâtre	jaune, brun violet, bleuâtre ou violet pale
Feuilles	Ecailleuses, ovales, allongées à lancéolées, glabres, érigées à déployées	-
Inflorescence	Dense, cylindrique, allongée, fleurs inférieures distantes	généralement lâche comportant plusieurs fleurs ou cylindrique et relativement dense avec peu de fleur
Bractéoles	Absentes	Présentes
Bractées	Aussi longue que la corolle, lancéolée, pubescentes	lancéolée, aussi longue que la corolle, à pubescence prononcée
Couleur des bractées	brun-sombre	jaune-brun ou brune
Calice	segments du calice bifides, ou inégalement bidentelés ou encore totalement séparés, lancéolés, à filiformes, glabres, nervurés, mesurant les deux tiers ou aussi longs que la corolle,	tubul-campanulé, généralement comportant quatre dents, très pubescent, et mesure le tiers de la longueur de la corolle
Couleur du calice	jaune-blanc avec une marge violette ou totalement violette	varie du violet, violet pale au jaune
Fleurs	Taille moyenne à larges, érigées puis déployées	petites taille, érigée au premier stade, puis se relâchent et se courbent à maturité
Corolle	25-30 mm de long, tubul-campanulé, gonflée au-dessus de l'insertion des étamines, faiblement pubescente ou presque glabre	mesure entre 10 et 15 mm de long(<i>O. ramosa</i>) 20-30 mm de long(<i>O. aegyptiaca</i>), tubulaire, légèrement étroite juste au-dessus de l'ovaire, puis s'élargit graduellement, pubescence très prononcée
Couleur de la corolle	blanc ou jaune-blanc, mouchetée de violet ou de rose, nervures violettes ou noires	bleuâtre, violet à violet-bleuâtre, rarement jaune ou complètement blanc avec des nervations noires ou violettes
Ligne dorsale de la corolle	Courbe vers la base, presque droite ou légèrement courbe au milieu, souvent érigée au sommet	régulièrement courbe
Lèvre supérieure	Ronde, lobes très larges à marge glabre	bilobée et pubescente,
Lèvre inférieure	Comporte 3 lobes ronds, le lobe central est généralement plus large que les deux autres	comporte trois lobes de forme ovale et de taille égale, et fortement pubescente
Étamines	Insérés 2-5 mm au-dessus de la base du tube de la corolle	insérés à 2-4 mm au-dessus de la base du tube de la corolle.
Filaments	Fortement pubescentes à leur base et faiblement pubescentes au-près des anthères, rarement glabres	majorité glabres ou légèrement pubescents à leur base
Anthères	Souvent pubescents, à leur ligne de fusion	glabres ou faiblement pubescents (<i>O. ramosa</i>), pubescence prononcée (<i>O. aegyptiaca</i>)
Style	Pubescente	légèrement pubescent.
Stigmate	Comporte deux lobes sphériques allongés	plusieurs lobes sphériques
Couleur du stigmate	jaunâtre, orangée, jaune-blanchâtre, rose ou violet clair	blanc ou bleu clair, rarement de couleur jaune
Nombre chromosomique	2n = 38	2n = 24



A: bractéole (chez la section *Trionychon* seulement); B: bractée; C: segment du calyx; D: corolle; E: tube de la corolle; F: ligne dorsale de la corolle; G: lèvre supérieure de la corolle; H: lèvre inférieure de la corolle; I: marge de la lèvre supérieur; J: insertion des étamines; K: étamines; L: fil; M: anthères; N: carpel; O: style; P: stigmate; R: capsule; S: poils glandulaires.

Figure(6): Structure florale chez la section *Trionychon* et *Osproleon*.
(Source: Kreutz C.A.J, 1995)



Figure(7): *O. crenata* Forskall (à gauche) et *O. ramosa* (à droite)
(Photo par Bouznad Z. INA, 03/04/04.)

1.2. Ecologie et biologie:

L'*Orobanche crenata* pousse dans les zones à végétation herbacée, les terres arables, les pâturages rudéraux, et les terres alcalines (calcaires), dans des champs cultivés, notamment de fève et autres légumineuses. La période de floraison de cette plante parasite s'étale du mois de mai à la fin du mois de juillet dans l'Europe centrale, et de mi-avril au mois de juin dans les régions méditerranéennes.

1.3. Importance des dégâts causés par *Orobanche crenata* Forsk. dans le monde et en Algérie:

1.3.1. Importance dans le monde:

L'*Orobanche crenata* Forsk. est surtout confinée au Bassin Méditerranéen, s'étendant à quelques centaines de kilomètres seulement au sud en Afrique, et au nord en Europe (excepté quelques infestations isolées dans certains pays d'Europe comme l'Angleterre) et plus étendue à l'est, en Iran. Plusieurs cultures dont les cultures ornementales sont affectées par cette plante parasite (Parker, 1986; Jacobsohn, 1994; Parker, 1994). Selon Sauerborn (1991), plus d'un million d'hectares de culture de fève seraient infestés par l'*Orobanche crenata* dans la région de la

Méditerranée et de l'Asie de l'Ouest, soit, la superficie totale de cette culture dans ces régions (Parker, 1994). Selon ce même auteur, les estimations des superficies infestées dans certains pays sont de 113 000 ha au Maroc, 13 500 ha au Portugal, 5 600 ha en Syrie et de 50 000 ha en Espagne. Kharrat et al.(1993) estiment entre 5 et 10 000 ha la superficie des champs de fève infestés par cette plante parasite en Tunisie. D'autres estimations sont présentées dans le tableau 2.

Tableau (2): Estimations du pourcentage d'infestation et des pertes de récoltes dues à l'*Orobanche crenata* dans divers pays du monde, d'après Abu-Irmalah (1994).

Pays	Hôtes	Superficies infestées (%)	Pertes de récoltes (%)
Algérie	Fève, pois, lentilles	5 à 10	Importantes
Ile de Chypre	Fève, pois	5 à 100	Près de 100
Egypte	Fève	Près de 20	Près de 33
	Pois	Près de 50	Près de 40
Maroc	Fève	Près de 70	Près de 20
	Pois sec	Près de 100	Variables
	Pois vert	Rares	-
	Lentilles	Près de 100	Variables
Syrie	Fève, pois	Près de 80	Près de 100
Tunisie	Fève	5	80

1.3.2. Importance en Algérie:

La famille des Orobanchacées ne comprend que des plantes parasites appartenant à différents genres répandus à travers le monde (Christmann 1960 in Zermene 1998) ; le genre *Orobanche* est de loin le genre le plus important. Près de 140 espèces d' *Orobanche* ont été identifiées et seulement 7 d'entre elles sont économiquement importantes, à cause des dégâts occasionnés sur les cultures qu'elles parasitent (Garcia Torres 1993). Parmi ces espèces, nous pouvons citer: *O. crenata*; *O. ramosa* / *O. aegyptiaca*; *O. minor*, *O. cernua* / *O. cumana* et *O. foetida* (Linke et al., 1989). En Algérie, 28 espèces d'*Orobanche* ont été inventoriées par Quezel & Santa (1963) dont *O. crenata*, *O.cernua* et *O. ramosa*, ayant une distribution spatiale importante sur les cultures légumières (Ait Abdallah et al., 1999). Le tableau 3, ci-dessous, présente les principales espèces hôtes recensées.

Tableau (3): Principales plantes hôtes d'*Orobancha* spp.d'intérêt économique en Algérie d'après Roumili (1993) et Zermane (1998).

Famille	Espèces	<i>O. crenata</i>	<i>O. ramosa</i>	<i>O. cernua</i>
Apiaceae	<i>Daucus carota</i> (espèces cultivées)	+	+	
	<i>Apium graveolens</i>	+	+	
	<i>Petroselinum sativum</i>	+	+	
	<i>Foeniculum vulgare</i>	+	+	
Fabaceae	<i>Vicia faba</i>	+	+	
	<i>Pisum sativum</i>	+	+	
	<i>Lens culinaris</i>	+		
	<i>Cicer arietinum</i>	+		
	<i>Medicago sativa</i>	+		
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>		+	+
	<i>Nicotiana tabacum</i>		+	+
	<i>Solanum tuberosum</i>		+	
	<i>Solanum melongena</i>		+	+
Adventices	<i>Scorpiurus vermicularis</i>		+	
	<i>Chrysanthemum coronarium</i>		+	
	<i>Leontodon sp</i>		+	
	<i>Carduus tenuiflorus</i>	+		
	<i>Daucus carota</i>	+	+	
	<i>Galium tricorne</i>		+	
	<i>Oxalis cernua</i>		+	
	<i>Vicia sp</i> et <i>Trifolium sp</i>	+		

En Algérie, les deux espèces les plus importantes sur le plan agro-économique sont *O. crenata* et *O. ramosa*. *Orobancha crenata* est inféodée aux légumineuses à grosses graines: fève (Fig.8), lentille, pois et récemment au pois chiche d'hiver (Fig.9), où elle cause d'importants dégâts plus particulièrement en semis précoces (Fig.10).

Sa description et sa biologie ont été largement traitées par Zermane (1998), et sa distribution se limite aux régions pluvieuses à climat doux.



Figure(8): *O.crenata* sur culture de fève (Photo par Bouznad Z.)



Figure(9): *O.crenata* sur culture de pois chiche(Photo par Bouznad Z.)



Figure(10): Champs de fève complètement infesté par *O.crenata* (Photo par Bouznad Z.)

D'après les recherches bibliographiques de Zermane (1998), une forme et deux variétés de ce parasite ont été décrites par Maire : *O. crenata* Forsk. forma *alba*, décrite sur *Pisum sativum* à Alger et *O. crenata* Forsk.var. *brachysepala* Maire, signalée sur les *Pelargoium* hybrides cultivés en 1939 ainsi que la variété *Owerini* Beck signalée sur les *Dipsacus* du jardin botanique en 1938. Selon ce même auteur, cette dernière variété n'aurait pas été signalée en Afrique du Nord avant 1938.

Les données rapportées par Zermane (1998) montrent que cette plante parasite est surtout répandue dans les régions du littoral à vocation agricole et dans la Mitidja. L'enquête menée par ce dernier a révélé la présence de cette *Orobanche* à Ain Dem (à la limite des communes de Boumedfâa, et d'Ouamrie à Ain Defla au Piémont Nord de l'Atlas Tellien) dans les cultures de pois et de fève. A l'est du pays, Saghir (1987) a constaté que les champs de fève étaient exempts de ce parasite.

Ducellier (1923) in (Zermane, 1998) a constaté que la culture des fèves et des pois était rendue impossible dans certaines localités du Sahel d'Alger et du plateau d'El Harrach. Il estima dès lors que 60% des terres étaient devenues impropres à ces cultures.

Mahmoudi (1993) in (Zermane, 1998) a noté d'importants dégâts dus à ce parasite sur les mêmes cultures à Ain Dem.

D'après Zermane (1998), la région du Sahel algérois (station expérimentale de Oued Smar, INA, Baraki, Rouiba, Reghaia...etc.) sont impropres à la culture des légumineuses à cause de l'infestation des terres par l'orobanche et les agriculteurs se plaignent de cette situation. Le même auteur indique que les dégâts occasionnés par cette plante parasite sont difficiles à évaluer ; les plants de fève parasités ne produisent pas de gousses car les fleurs se dessèchent et tombent peu de temps après la floraison.

La recherche de données chiffrées exactes sur les superficies des cultures infestées ainsi que les dégâts occasionnés est restée vaine, exceptées les quelques données reportées par Abu-Irmalah en 1994 (Tab.2).

1.1.4. Symptomatologie et parasitisme

Les premiers symptômes apparaissent sur la plante hôte avant l'émergence de la plante parasite du sol. Le prélèvement de l'eau et des éléments nutritifs (sève élaborée) à partir de la plante hôte, provoque des symptômes visibles, à savoir, jaunissement, flétrissement, réduction de la taille de la plante, chute des fleurs et baisse de la qualité de la semence et du rendement.

1.1.5. Variabilité chez le genre *Orobanche* :

Si la plupart des programmes de lutte contre les plantes parasites, ont mis l'accent sur l'amélioration des variétés résistantes, la variabilité génétique de ces parasites est restée inconnue et devrait être prise en considération afin d'atteindre ce but (Verkleij & Pieterse, 1994).

Les parasites, ou au moins certains types, sont capables de surmonter la résistance ou la tolérance des cultures, surtout lorsque leur variabilité génétique est grande et que la résistance ou la tolérance de l'hôte sont déterminées par un ou peu de gènes. Ceci est illustré par les récentes infestations des cultivars résistants de tournesol améliorés au début de ce siècle en ex-URSS (Verkleij & Pieterse, 1994).

Ce phénomène de perte de la résistance qui, dans le passé a été rencontré en Europe de l'Est, (Antonova, 1994; Teryokhin, 1994), est probablement du à l'existence de diverses populations d'*Orobanche*. Ceci serait aussi la cause de l'échec de l'introduction de la résistance contre l'*Orobanche* chez plusieurs cultures telle que la fève, la lentille et la tomate (Garcia-Torres, 1994).

Verkleij & Pieterse (1994), indiquent que pour s'adapter aux nouvelles espèces hôtes, la plante parasite doit avoir une variabilité (génétique) appropriée, à partir de laquelle de nouveaux écotypes peuvent se développer. Ils ont également reporté qu'en se basant sur la caractérisation morphologique, ces plantes parasites présentaient une assez grande variabilité et qu'une part de cette variabilité pourrait être d'origine génétique. Il reste que les études sur la diversité génétique des plantes parasites sont encore très limitées et elles méritent d'être étendues (Zeid,1998). Cette étude de la variabilité des espèces d'*Orobanche* devrait se baser sur plusieurs approches :

1.1.5.1. Approche morphologique et cytologique :

L'une des conditions nécessaires pour le développement de moyens de lutte efficaces et la réussite des programmes d'amélioration des cultures, est de connaître la variabilité des populations locales d'*Orobanche* (Beilin,1968). L'*Orobanche* est probablement l'un des genres les plus controversés, d'autant plus que la caractérisation des espèces est difficile à établir. Plusieurs auteurs ont exprimé des difficultés pour caractériser morphologiquement les espèces d'*Orobanche* conservées dans les herbiers (Chater & Webb,1972).

Musselman (1994) indique qu'il existe une variabilité morphologique inhérente au sein des populations d'*Orobanche* sur le plan de la taille, la couleur de la corolle, le degré de pubescence ainsi que d'autres caractères morphologiques. Ceci est reflété dans plusieurs aspects de leur biologie (aberrations chromosomiques) (Moreno et al., 1979) et leur mode de reproduction (nombre élevé de graines, autogamie) ; l'hôte peut également influencer la morphologie de la plante parasite (Musselman & Parker, 1982). De plus, Cubero & Moreno (1979) ont noté que les populations d'*O. crenata* sont hautement polymorphiques pour plusieurs caractères : la couleur des fleurs, le stigmate et les tiges, la densité des fleurs sur la hampe et la taille du plant (hauteur et diamètre).

Par ailleurs, Parker & Riches (1993) attestent que l'*O. crenata* présente des variations morphologiques modérées dans la taille et la couleur des fleurs, caractères moins importants que chez les autres espèces d'adventices, et qu'il n'y a pas de sub-espèces reconnues jusqu'à maintenant.

Musselman et al.(1982) ont noté trois types de pollinisation chez le genre *Orobanche*, à savoir l'allogamie, l'autogamie et l'autogamie facultative.

Bharathalakshmi et al.(1990) ont constaté que la plupart des espèces de plantes parasites les plus préjudiciables ne sont pas obligatoirement autogames et présenteraient une grande variabilité morphologique interpopulation. Cependant ces caractères morphologiques semblent uniformes ou homogènes au sein de chaque population. Dans le même contexte, Verkleij et al.(1991a) suggèrent que la variation ou variabilité génétique entre les populations est moins importante que la variation génétique entre les individus au sein de chaque population.

Cubero & Moreno (1979) indiquent que les populations d'*O. crenata* sont chromosomiquement très hétérogènes et présentent un haut degré de troubles méiotiques.

Le degré de polyploïdie caractéristique du genre *Orobanche* peut contribuer dans la variabilité interspécifique (Cubero et al., 1979). Ces derniers auteurs ont observé des anomalies méiotiques et une variation dans le nombre de chromosomes chez des plants d'*O. crenata* collectés en Espagne. Musselman et al.(1991) indiquent qu'il existe des données contradictoires sur le nombre chromosomique chez les espèces du genre *Orobanche* et attribuent ce caractère à la difficulté de déterminer le nombre réel de chromosomes, à cause de leur petite taille qui les rend souvent difficiles à distinguer. Parker & Riches (1993) ont déterminé le nombre de chromosomes de différentes espèces d'*Orobanche* : *O. crenata* $2n = 38$; *O. minor* $2n = 38$; *O. ramosa* $2n = 24$; *O. aegyptiaca* $2n = 24$ et *O. cernua* $2n = 24$ ou 38 .

Wrigley et al.(1982) indiquent que l'identification classique des cultivars sur la base des caractères morphologiques, requiert l'observation des plants mûrs et dans plusieurs cas elle est insuffisante et manque d'objectivité. De plus, Yang & Quiros (1993) ont attesté que les caractères morphologiques ne peuvent pas servir de marqueurs précis et sûrs dans l'identification, car ils sont souvent soumis à l'influence des conditions de l'environnement.

1.1.5.2. Dormance et viabilité:

Pieterse & Verkleij (1994) ont constaté que les stratégies de survie des plantes, comprennent souvent des mécanismes leur permettant d'empêcher ou de stopper la germination des graines sous les conditions non favorables. Ces mécanismes sont généralement contrôlés par les facteurs de l'environnement. Cette régulation externe peut être directe et entraîne la germination des graines seulement sous des conditions environnementales bien déterminées ou indirecte, via l'induction de la dormance qui empêche les graines de germer. En plus des effets des conditions

de l'environnement, d'autres mécanismes de nature endogènes peuvent également agir sur la germination.

Généralement il existe deux types de dormance, la dormance primaire et la dormance secondaire (Murdoch & Ellis, 1992). La dormance primaire peut être reliée à un effet maternel (induit par les conditions de l'environnement dans la plante mère), l'immaturation de l'embryon, l'imperméabilité de l'enveloppe de la graine (empêchant le passage de l'eau et de l'oxygène) ou n'importe quel autre mécanisme qui pourrait bloquer ou empêcher la germination. La dormance secondaire est induite quant à elle, après la déchirure de l'enveloppe de la graine. Elle est souvent reliée aux cycles annuels des périodes de dormance induites soit par les conditions de l'environnement ou par des mécanismes endogènes ou encore par les deux en même temps (Pieterse & Verkleij, 1994)

Ces derniers auteurs, indiquent que l'existence de différences marquées dans la germination des graines d'*O. crenata* collectées en Egypte et en Espagne, révèle le rôle que peuvent jouer les différences génétiques au sein de l'espèce. La différence ou la variabilité génétique entre les diverses populations doit être prise en considération. A cet effet, ils ont conclu aussi, qu'en général peu d'informations sont disponibles sur l'écologie de la germination des graines des plantes parasites.

Aalders & Pieterse (1985) ont noté que le criblage pour la résistance sous des conditions contrôlées, semble être l'approche la plus prometteuse, mais sous ces conditions, le taux de germination ou de viabilité des graines d'*O. crenata* doit être connu. Ces auteurs ont décrit une méthode permettant de tester *in vitro* la viabilité d'*O. crenata* et ce en utilisant le 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC). En effet la viabilité des graines de cette dernière ne peut pas être testée à travers les méthodes classiques, car la germination des graines est dépendante de l'hôte.

Ils ont également conclu que si dans les expériences de criblage pour la résistance, le nombre de hampes d'*O. crenata* par plant de fève était faible, ceci n'est pas seulement dû à la résistance des cultivars de fève, mais aussi à la faible viabilité des graines de la plante parasite. Un facteur important dans la biologie de l'*O. crenata* est sa capacité de produire un grand nombre de graines. Un plant d'*O. crenata* bien développé peut produire jusqu'à plusieurs centaines de milliers de graines.

En plus du taux élevé de reproduction et de l'induction de la germination par l'hôte, une plus grande attention doit être accordée à la longévité des graines ; ces facteurs déterminent le potentiel de menace du parasite (Linke & Saxena,1991). Au cours de leur étude sur la viabilité et la longévité des graines d'*O. crenata* collectées en Syrie et en Egypte, ces mêmes auteurs ont noté que les graines originaires d'Egypte avaient montré une plus faible viabilité comparées aux collections Syriennes.

Cette diminution a été attribuée au taux élevé de l'humidité relative de l'air et à la température ambiante élevée du site de stockage. D'après ces mêmes auteurs, excepté les conditions de stockage, l'origine des graines affecte aussi la viabilité. Il a été constaté que les graines des capsules supérieures de la hampe florale, présentaient un taux de viabilité nettement plus faible (46.3%) comparées aux graines des capsules médianes et inférieures (88.5% et 89.3% respectivement).

Khalaf (1991) a étudié la relation de la viabilité des graines d'*O. crenata* d'origines géographiques différentes (Egypte, Malte et Syrie) avec leur métabolisme durant la germination. L'auteur est arrivé à la conclusion que l'activité métabolique durant la germination variait entre les graines des différentes collections.

1.1.5.3. Agressivité et virulence :

Nassib et *al.*(1978) ont conduit un test d'évaluation de cultivars de fèves tolérantes dans différentes régions (localités tests) d'Egypte et ont constaté que l'infestation des cultivars tolérants de fève (F402) par l'*O. crenata* était quatre fois plus élevée dans les localités tests que dans la localité d'origine de la (F402). Ils ont alors suggéré que la virulence du parasite varie d'une localité à une autre, ou qu'il existerait éventuellement des races physiologiques du parasite.

Cubero & Moreno (1979) ont testé cinq populations différentes d'*O.crenata* sur vingt cinq lignées de fèves sélectionnées à partir de génotypes de fève d'origines géographiques différentes. Ils ont conclu que leurs résultats étaient en accord avec l'hypothèse de l'existence de différentes races d'*O. crenata* sur le plan de la virulence.

Fischbeck et *al.*(1986) a étudié la virulence (ou l'agressivité) de huit populations d'*Orobanche* collectées dans différentes localités d'Egypte et une population collectée en Syrie, à l'égard de sept génotypes de fève obtenus en Egypte, Allemagne et ICARDA (Syrie). Les résultats ont

montré que les populations d'*Orobanche* testées étaient génétiquement différentes sur le plan « agressivité » ou « virulence ». Ces résultats devraient être pris en considération lors de l'amélioration génétique de la résistance des génotypes de fève.

En étudiant plusieurs lignées de fève et différentes populations d'*O. crenata*, Hernandez (1987) et Radwan et al.(1988) ont détecté une nette différence dans l'agressivité des populations.

Plus récemment, Abdalla & Darwish (1994) ont indiqué que la variabilité chez l'*O. crenata* n'était pas seulement morphologique, mais également associée au parasitisme. Les effets de l'interaction hôte-parasite peuvent aussi être impliqués et donner des effets quantitatifs sur la variabilité du parasite. Cependant, il n'existe pas de génotypes de fève propres pouvant servir de gamme différentielle.

Enfin, Wegmann (1994) a conclu que la spécificité parasitaire, l'agressivité des espèces d'Orobanche et la tolérance des fèves aux espèces d' Orobanche (aux sub-espèces ou biotypes) sont déterminées (ou contrôlées) génétiquement. Par conséquent, il semble essentiel d'étendre les études taxonomiques et les études de la variabilité aux méthodes chimiotaxonomiques, afin de mieux définir les populations d' Orobanche.

1.1.5.4. Polymorphisme génétique:

La position taxonomique ne peut pas être définitivement déterminée ou définie sur la seule base des caractères morphologiques. Les méthodes taxonomiques modernes peuvent apporter des informations plus précises sur le génome des plantes. Ces méthodes impliquent l'utilisation des marqueurs moléculaires tels que les acides nucléiques, les isoenzymes et les métabolites secondaires. Les produits des gènes, fournissent des informations sur des traits spécifiques du génome et permettent d'établir une caractérisation au niveau moléculaire (Georguieva & Edreva ,1994).

Parker & Riches (1993) rapportent que les plus grandes difficultés dans la distinction entre les *Orobanches* sur le plan morphologique, se rencontrent avec les espèces *O. ramosa*, *O. mutelii* et *O. aegyptiaca* .Il existe également quelques difficultés même entre les espèces *O. minor*, *O. cernua* et *O. crenata*. La taxonomie moderne a aujourd'hui à sa disposition les méthodes les plus puissantes et les plus précises lui permettant de définir avec précision la structure du génome des plantes. (Musselman,1994).

1.1.5.4.1. Etude des allozymes

Les premières études de la diversité génétique chez l'orobanche par des analyses isoenzymatiques ont été investies par Verkleij et *al.*(1991b) sur deux populations syriennes du parasite infestant la fève, l'une collectée à Tel Hadya près d'Alep et l'autre à Lattakia sur la côte ; les deux sites séparés par une chaîne de montagne, sont distants de 125 Km et différent en altitude et en précipitations moyennes annuelles. Les résultats ont révélé une très grande variabilité génétique à l'intérieur d'une même population. Par contre, aucune variation génétique entre les deux populations n'a pu être décelée. Ceci suggère qu'un échange ou un flux local de gènes s'est produit via la dissémination des graines d'orobanche.

Par ailleurs, la diversité génétique entre des populations d' *O. crenata* parasitant la fève collectées de différentes régions géographiques au sud de l'Espagne, ont été étudiées par Verkleij et *al.*(1991b). Les résultats ont indiqué que la variation inter-population était plus faible que la variation intra-population, indiquant ainsi un faible niveau de différenciation génétique entre les populations. L'estimation des distances génétiques indique que malgré les faibles distances géographiques il y avait une certaine différenciation entre les différentes populations, contrairement aux populations d' *O. crenata* étudiées en Syrie.

L'électrophorèse des isoenzymes et des protéines a été appliquée sur plusieurs cultures (Tanksley & Orton, 1983). La contrainte majeure de ces techniques est le faible taux de polymorphisme enregistré, entre des cultivars très proches. Du fait que les protéines soient le produit des gènes, elles varient d'un tissu à un autre, d'un stade de développement à un autre et d'un environnement à un autre (Beckmann & Soller, 1983).

1.1.5.4.2. Polymorphisme de l'ADN génomique.

Musselman (1994), indique que la « cluster analysis » rendait possible la construction de schémas phylogénétiques qui montrent de façon claire les relations génétiques entre les organismes. Il a aussi indiqué qu'il n'existait pas de travaux relatifs aux marqueurs d'ADN réalisés sur l'*Orobanche* et que de tels travaux devaient se pencher le plus sur le complexe *O. ramosa* /*O. aegyptiaca*. Des travaux plus récents sur les marqueurs RAPD ont été utilisés pour différencier les espèces les plus importantes du genre *Orobanche* en Israël (Katzir et *al.*,1996; Paran et *al.*,1997) et en Egypte (Zeid et *al.*,1997).

Katzir et al.(1996) ont utilisé les marqueurs RAPD pour étudier la variabilité génétique entre cinq espèces différentes d'orobanche à savoir, *O. aegyptiaca*, *O. ramosa*, *O. cernua*, *O. cumana* et *O. crenata* par l'utilisation de 31 amorces RAPD, leurs résultats ont montré l'existence d'une différence dans les profils RAPD obtenus. Ils indiquent que l'utilisation des marqueurs RAPD a permis de confirmer la séparation entre les espèces appartenant à la section *Trionichon* et les espèces appartenant à la section *Osproléon*. Ils ont conclu que l'analyse de l'ADN par l'utilisation des marqueurs RAPD, pouvait servir dans l'analyse taxonomique du genre *Orobanche*.

Portnoy et al.(1997), ont utilisé ces même marqueurs afin d'identifier les quatre espèces d'orobanche (*O.ramosa*, *O.crenata*, *O.cumana* et *O.aegyptiaca*). Ils ont conclu que ces marqueurs constituaient un instrument puissant et précis pour l'identification des espèces d'orobanche, et que cette identification pouvait être vérifiée par Southern Hybridization. Ils ont aussi noté que les profils RAPD produits à partir de l'ADN des graines viables et non viables étaient les mêmes.

Zeid et al.(1997) ont étudié la variabilité génétique au sein de quatre espèces d'orobanche et trois populations d'*O.crenata*, leurs résultats indiquent une nette variation dans les profils RAPD des quatre espèces. Par contre les trois populations d'*O.crenata* analysées ont montré un indice de similarité égal à 1, indiquant une ressemblance typique. Ces mêmes auteurs attribuent ceci au nombre d'amorces RAPD utilisées. Ils ont aussi indiqué que grâce à ces marqueurs, la confusion dans la différenciation entre l'*O.ramosa* et l'*O.aegyptiaca* n'existait plus, et que ces deux espèces sont génétiquement distinctes.

Des résultats similaires ont été obtenus par Paran et al.(1997), en étudiant la variabilité génétique inter et intraspécifique entre et au sein d'espèces d'orobanche (*O.aegyptiaca*, *O.crenata*, *O.cernua*, *O.cumana* et *O.mutellii*). Ces auteurs ont noté une faible variabilité génétique intraspécifique entre les différentes populations d'*O.aegyptiaca* et d'*O.crenata* collectées. La distance génétique moyenne enregistrée entre les populations d'*O.crenata* de Bet Degan et Bet Shean (les deux régions distantes l'une de l'autre de 150Km) était faible (0.17), ceci révèle d'après ces mêmes auteurs l'importance du flux de gènes entre les deux populations. Aussi, ils ont reporté que l'hôte n'avait aucune influence sur la variabilité génétique de l'orobanche. Ils ont aussi noté que le taux de variabilité intraspécifique était plus faible que le taux de variabilité interspécifique. Joel et al.(1998), ont étudié le polymorphisme génétique entre des populations d'*O.aegyptiaca* d'origines géographiques différentes en Israël, par des marqueurs RAPD; leurs

résultats ont montré une distance génétique importante entre les populations étudiées. Cette distance génétique était proportionnelle à la distance géographique qui séparait les populations. Ils ont alors conclu qu'il y avait un très faible flux de gènes.

Les résultats rapportés par Gagné et *al.*(1998), concernant l'étude de la variabilité génétique de cinq populations d'*O.cumana* ((01) collectée en Roumanie, (01) en Turquie et (03) en Espagne), par la RAPD, indiquent une très grande similarité génétique entre les différentes populations (indice de similarité le plus faible =0.80); les auteurs ont supposé que ces résultats relèvent de la dispersion des graines de cette espèce associée aux programmes d'amélioration.

Roman & Rubiales (1999), ont noté que le polymorphisme génétique interpopulation chez l'*O.crenata* (collectée au sud de l'Espagne), était plus faible que le polymorphisme génétique intraspécifique (noté entre les individus au sein de chaque population). Ils ont indiqué que ceci pouvait être du à la prédominance de l'allogamie chez cette espèce.

Roman et *al.*(2001a), ont étudié 347 individus de 52 populations appartenant à 20 espèces d'orobanche collectées dans plusieurs parties d'Andalousie. Leurs résultats montrent une distinction claire entre les différentes espèces. Ainsi la séparation des 20 espèces selon leur appartenance à l'une ou l'autre des sections *Trionichon* ou *Osproléon*, a été clairement établie. Le tableau(4) résume les principaux travaux relatifs à l'étude de la diversité génétique chez le genre *Orobanche* par l'utilisation des marqueurs d'ADN, durant les dix dernières années.

Tableau(4): Principales études moléculaires de la diversité génétique du genre *Orobanche*.

Technique	Auteurs	Nombre total des travaux
RAPD	Katzir & <i>al.</i> (1996)	9
	Paran & <i>al.</i> (1997)	
	Portnoy & <i>al.</i> (1997)	
	Zeid & <i>al.</i> (1997)	
	Joel & <i>al.</i> (1998)	
	Ljubenova & Minkov (1998)	
	Gagné & <i>al.</i> (1998)	
	Roman & <i>al.</i> (2001a,b)	
AFLP	Gagné & <i>al.</i> (2000)	1
RFLP	Theodet & <i>al.</i> (1996)	2
	Gagné & <i>al.</i> (2000)	
Microsatellites	Benharrat & <i>al.</i> (2001)	1
SCAR	Joel & <i>al.</i> (1998)	1
LD-PCR	Delavault & <i>al.</i> (2001)	1
Total des travaux		15

1.1.6. Résistance génétique de la fève à *O. crenata*

Les agents pathogènes varient dans leur mode et leur taux de croissance, ainsi que dans leur mode de reproduction et dissémination. Afin de limiter les dommages causés par ces derniers, les plantes emploient différents mécanismes de défense, qui peuvent être classés en trois mécanismes principaux : l'esquive, la tolérance et la résistance (Parlevliet, 1981).

L'esquive s'opère avant l'établissement du contact entre la plante hôte et le parasite. Elle réduit la fréquence de contact et de ce fait de l'infection. La tolérance s'opère après l'établissement du contact entre la plante et le parasite, mais n'interfère pas avec la croissance et le développement du pathogène.

La résistance quant à elle, s'opère après l'établissement du contact et interfère avec l'agent pathogène, et de ce fait réduit la croissance et le développement de ce dernier. Ce mécanisme est souvent de nature chimique. Les mécanismes de défense contre les agents pathogènes étudiés par les améliorateurs sont pour leur grande majorité liés à la résistance de l'hôte, et c'est à ce niveau précis que les problèmes de spécificité parasitaire et de pertes de la résistance ont lieu.

La spécificité parasitaire et la perte de la résistance résultant de l'adaptation du pathogène n'ont pas été décrits pour les mécanismes de l'esquive et de tolérance. De plus, ils ne constituent pas des critères de sélection intéressants pour les améliorateurs étant donné que l'esquive ne semble pas être un phénomène fréquent chez les plantes. La tolérance aux pathogènes est très difficile à évaluer et peut ne pas être fréquente aussi. Ainsi, il semble que les améliorateurs utilisent principalement les mécanismes de résistance pour protéger (génétiquement) les cultures (Parlevliet, 1989).

1.1.7. Sources et nature de la résistance chez la fève à l'*Orobanche crenata*

Cubero (1991) a résumé l'historique des travaux effectués par les améliorateurs sur la résistance de la fève contre l'*O. crenata*. Ce dernier mentionne que les travaux ont commencé dans les années soixante par Elia en Italie et Bryssine (travaux non publiés) au Maroc.

Elia (1964) , a étudié 15 variétés de fève italiennes, et a noté que les graines des variétés à enveloppe de couleur foncée, étaient moins sensibles à l'orobanche que celles à enveloppe de couleur claire.

En étudiant 70 variétés de fève et 50 lignées sélectionnées, Cubero en 1973, a montré une corrélation significative entre la taille des graines et le nombre de pieds d'orobanche par plant.

Ainsi, plus la taille des graines était petite, plus le degré de résistance était important. Le même auteur, a introduit une variété cataloguée appartenant au groupe *paucijuga* la (VF172) originaire de l'Inde, caractérisée par de très petites graines, un faible développement végétatif et un faible rendement. En 1979, Cubero et Moreno, ont croisé cette variété, résistante, avec la variété VF115, dont les graines sont très grandes, ainsi qu'avec d'autres variétés. Les différents descendants F2 ont montré une bonne croissance végétative, un haut rendement et une très grande sensibilité à l'orobanche. L'auteur a émis l'hypothèse que la résistance de cette variété n'était due qu'au faible développement de son système racinaire.

Toutefois, sur la base du comportement des F2, les deux auteurs ont observé des différences de résistance et ont ainsi conclu, l'existence d'une véritable résistance qui n'était pas le fait du faible développement du système racinaire.

Dans leurs travaux de sélection Nassib et *al.*(1979) ont conclu que la F402 connue pour son haut niveau de résistance à la pourriture racinaire ainsi qu'au wilt, était tolérante également à l'orobanche.

Cubero & Moreno (1979) ont tenté d'améliorer la résistance de la fève contre l'orobanche, par la sélection de plusieurs variétés. Mais le niveau de résistance défini par le nombre de hampes d'orobanche par plant de fève, était le même qu'au départ pour toutes les variétés sélectionnées, bien que la proportion du zéro hampe d'orobanche par plant de fève a augmenté de 12% à 22%.

Plus tard, Cubero (1991) explique l'échec de l'obtention d'une bonne résistance, par le fait que cette dernière est plus rare chez la fève que chez les autres espèces (pois chiche et tournesol) et par le faible niveau d'héritabilité.

Il est rapporté aussi que la lignée F402 qui a produit le cultivar Giza 402, connue pour sa résistance contre ce parasite sous de sévères conditions d'infestation (naturelles ou artificielles aussi bien sous serre que sur champ), s'est montré stable sous différentes conditions écologiques : la vallée du Nil , Lattakia (Syrie) et l'Andalousie (Sud de l'Espagne).

Le cultivar Giza 402 sélectionné en Egypte, a été extensivement utilisé comme source de résistance contre l'*O.crenata* dans plusieurs programmes d'amélioration (Kharrat et *al.*,1994).

Khalil et *al.*(1994), citent quatre lignées améliorées prometteuses, ayant des liens génétiques avec le cultivar Giza 402, à savoir :

- la lignée (402/29/84) produite directement par sélection à partir de Giza 402.
- la lignée (674/154/85) résultant du croisement de Giza 402 avec 3PL561 (germoplasme catalogué à l'ICARDA).
- la lignée (674/155/85) résultant du croisement de Giza 402 avec 3PL561 (germoplasme catalogué à l'ICARDA).
- la lignée (X-843) résultant du croisement entre deux lignées améliorées en Egypte, et dont l'une a Giza 402 comme parent.

En étudiant la nature de la résistance chez la fève, Nassib et *al.*(1979) ont indiqué que le faible nombre de hampes d'*O.crenata* par plant de fève (Giza 402), pouvait s'expliquer par une réduction de la sécrétion des stimulants de la germination. La formation de barrières mécaniques et /ou physiologiques qui empêchent l'établissement du parasite et le développement d'une masse racinaire compacte, est un autre mécanisme de résistance.

A travers leurs travaux sur 12 cultivars de fève marocains et une lignée provenant de l'ICARDA (PBL2210), Aalders & Pieterse (1986) suggèrent que la résistance s'opère probablement durant la pénétration et / ou l'établissement de la plante parasite. Ils indiquent aussi qu'une différence dans la capacité de stimulation de la germination des graines de la plante parasite, pourrait exister entre les différents cultivars.

Van Woerden et *al.*(1994) ont comparé la germination des graines d'*O.crenata* sous l'effet des exsudats racinaires de cultivars de fève sensibles et résistants (d'Espagne et d'Egypte). Ils ont noté que l'activité des exsudats racinaires des cultivars partiellement résistants Giza 402 et Baraca était similaire ou plus importante que celle des cultivars sensibles, et de ce fait ont conclu que le faible nombre de hampes d'*O.crenata* par plant de fève des cultivars Giza 402 et Baraca , n'était pas du à la faible production des exsudats racinaires .

Khalaf & El Bastawesy (1989) sont arrivés à la conclusion que la faible biomasse racinaire est la principale raison de la résistance partielle du cultivar Giza 402. Ils ont aussi noté qu'au stade floraison, l'épiderme, le cortex et le xylème des racines du Giza 402 étaient plus épais que chez les cultivars sensibles tels que Aquadulce.

Zaitoun (1990), reporte que les racines du cultivar résistant Giza 402, étaient plus longues au stade de croissance végétative et qu'elles avaient un nombre de racines secondaires plus élevé

durant tous les stades de croissance. De même, la biomasse racinaire du Giza 402 était significativement différente de celle du cultivar sensible Giza 3.

ter Borg & Van Ast (1991) n'ont noté aucune différence dans la biomasse racinaire entre le Giza 2 et le Giza 402, et ont de ce fait conclu que la biomasse racinaire ne jouait pas un rôle déterminant dans la résistance contre l'*O. crenata*.

Zaitoun et al. (1991) indiquent que la germination des graines d'*O. crenata* et la pénétration des racines de l'hôte se font simultanément, aussi bien chez les cultivars sensibles que chez les cultivars résistants, mais que cette installation du parasite au niveau de l'hôte, était tardif chez les cultivars résistants.

Ils ont noté que ce retard était dû au développement d'un tissu liégeux au niveau du site de pénétration du parasite et à quelques cavités (aires nécrotiques) sur le xylème jouant le rôle de barrière pour un éventuel établissement.

Zaitoun & ter Borg (1994), ont étudié et comparé la résistance et la sensibilité de quelques variétés de fèves égyptiennes et espagnoles, et ont conclu que la résistance était principalement due à une réaction d'hypersensibilité au niveau du site de pénétration du parasite. Il s'ensuit la formation d'une nécrose au site de contact, et ce à un stade précoce de la croissance et en plus de la barrière établit contre le tubercule à un stade de développement ultérieur.

1.1.8.Stratégies de lutte contre l'*Orobanche crenata*

Vu l'importance des dégâts engendrés par cette plante parasite à travers le monde, plusieurs travaux relatifs à la lutte contre ce parasite ont été réalisés.

Les méthodes de lutte sont d'ordre préventif, par l'utilisation de semence propre, l'application de mesures de quarantaine, l'alimentation des animaux à partir des champs non infestés, l'utilisation de matériel agricole propre, le nettoyage des canaux d'irrigation, la sensibilisation et la vulgarisation auprès des agriculteurs. La rotation culturale avec les plantes non-hôtes, les plantes pièges et les faux hôtes pendant plusieurs années afin de réduire le stock semencier du parasite dans le sol, est aussi une stratégie de lutte efficace (Chabrolin, 1934; Zaki, 1974; Saxena, 1986; Khalaf, 1992; Al-Manoufi et al., 1994; Garcia-Torres, 1994; Zermane, 1998). Aussi, le semis tardif qui réduit considérablement les taux d'infestations (Mesa Garcia & Garcia-Torres, 1986; Garcia-Torres et al., 1991; Ait- Abdallah & Hamadache, 1996; Khalil & Erskine, 1999), l'utilisation des variétés résistantes (Cubero, 1973; Cubero & Moreno, 1979; Cubero &

Hernandez, 1991; Al-Manoufi, 1994; Cubero & Rodriguez, 1999;), la fertilisation azotée la solarisation et l'inondation des parcelles, constituent des moyens de lutte, et sont souvent combinés dans une lutte intégrée (Sauerborne, 1991; Krishna Murty, 1994; Krishna Murty & Raja, 1994).

Les moyens de lutte d'ordre curatif, par l'arrachage manuel et le brûlage des plants du parasite (Pal & Gopalachari, 1957; Vyas, 1966; Kharrat et al., 1997), servent souvent à réduire les infestations par la plante parasite. Par ailleurs, les traitements herbicides tels que le Glyphosate, l'Imazaquin, l'Imazetapyr (Zaitoun et al., 1989; Nassib et al., 1992, 1993; Saber et al., 1994; Ait-Abdallah & Hamadache, 1996), ont donné de très bons résultats. L'utilisation d'agents biologiques tels que la mouche *Phytomyza orobanchia*, et *Chyliza ariseta* et le charançon *Smicronyx cyaneus* (Hammad et al., 1967; Klein, 1995, Zermane, 1998), les agents fongiques tels que l'*Alternaria*, le *Fusarium*, le *Sclerotinia* et l'*Ulocladium* (Linke, 1992; Zermane, 1998) ainsi que l'application de la lutte intégrée (Nassib et al., 1989; Nassib et al., 1990; Parker, 1994; Zermane, 1998), ont aussi donné de bons résultats.

1.2. Les marqueurs moléculaires

L'information qualitative et quantitative sur la diversité génétique est un aspect essentiel dans plusieurs domaines de la biologie fondamentale et appliquée : écologie, taxonomie, biologie évolutionnaire, agronomie, amélioration et conservation des ressources génétiques...etc. Cette diversité ou variation peut être considérée à différents niveaux, du phénotype simple et héréditaire pour la détection d'une variation au niveau d'un nucléotide (El-Khishine, 1998).

En biologie végétale, le terme marqueur s'applique à plusieurs concepts, parfois très différents. Il est, par exemple, possible de définir des marqueurs physiologiques et des marqueurs génétiques. Les premiers correspondent à tout type de molécules, facilement repérables, dont la présence renseigne sur un stade de développement ou un état physiologique, situations complexes faisant intervenir de nombreux paramètres en interaction. Les marqueurs génétiques sont, quant à eux, toujours synonymes de locus marqueurs.

Un locus marqueur est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte et/ou sur les génotypes des locus voisins. Les marqueurs génétiques sont par définition des caractères héréditaires.

Deux types de marqueurs génétiques sont généralement utilisés dans la détermination de la diversité génétique : les marqueurs morphologiques, et les marqueurs moléculaires dont les marqueurs protéiques (biochimiques) et les marqueurs d'ADN.

L'observation morphologique est la base de la description du matériel végétal ; elle est simple et facile à pratiquer. Cependant, elle manque de précision, à cause de la variation importante d'expression des caractères observés, due :

- à l'interaction génotype-environnement ;
- au manque ou faible présence de caractères discriminants ;
- au nombre croissant des nouvelles variétés ;
- à l'impossibilité d'appliquer cette méthode quand il s'agit d'étudier des plantes ou spécimens d'herbiers ;
- au mode d'héritabilité dominant des marqueurs morphologiques.

C'est la raison pour laquelle les marqueurs moléculaires ont été utilisés afin de pallier à ces problèmes (Zhang, 2002).

1.2.1. Définition et propriétés des marqueurs moléculaires :

Un marqueur moléculaire, est un marqueur biochimique (protéines, isoenzymes) ou d'ADN. C'est un gène ou locus au sein du génome, utilisé comme caractère de référence, responsable de la production d'une protéine particulière et représentant un phénotype particulier. Les marqueurs moléculaires représentent les différences hérissables dans les séquences d'ADN de différents individus appartenant ou pas à la même espèce (Sylvain et *al.*, 2000).

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 dispersé le long du génome ;
- ne pas être liés entre eux ;
- être insensibles au milieu ;
- 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 sans ambiguïté.

Les marqueurs morphologiques répondent peu à ces critères. Peu polymorphes et en général dominant, ils interfèrent souvent avec d'autres caractères et peuvent être influencés par le milieu. Au contraire les marqueurs moléculaires en ce qui concerne l'ADN sont en nombre quasiment illimité et sont indépendants du stade de développement de l'organe analysé puisque l'ADN est le même dans tous les tissus. (De Vienne, 1998).

1.2.2.Applications des marqueurs moléculaires :

Les applications des marqueurs moléculaires ont été appliquées diversement, dans la génétique des populations, l'écologie et la systématique, la caractérisation des espèces, la cartographie des gènes, et la sélection et ont été largement décrits dans la littérature (Weising et *al.*, 1995). Mais les deux principales applications des marqueurs moléculaires sont : la cartographie des gènes et le marquage de caractères d'intérêt agronomique ou autres, ainsi que l'étude de la diversité génétique (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998).

Parmi toutes les approches développées jusqu'à aujourd'hui pour l'estimation de la diversité génétique, au sein des populations des plantes, les méthodes moléculaires apparaissent extrêmement prometteuses, comme démontré par plusieurs travaux de recherches sur différentes espèces végétales (Weising et *al.*, 1995)

1.2.3.Description des différents marqueurs moléculaires :

1.2.3.1. Les marqueurs protéiques :

Pour les marqueurs moléculaires basés sur le polymorphisme protéique, la technique la plus utilisée est la séparation des protéines par électrophorèse. La majorité des marqueurs protéiques est représentée par les isoenzymes, bien que certains travaux se soient basés sur les protéines solubles. L'électrophorèse des isoenzymes a été appliquée à plusieurs organismes : bactéries, animaux ainsi que les plantes, et ce depuis les années soixante (May, 1992). Les travaux relatifs à ce genre de marqueurs ont concerné différents domaines de la physiologie, la biochimie, la génétique, et l'amélioration ainsi que d'autres aspects comme la structure des populations, la systématique...etc.(Harris, 1969 ; Lewontin & Hubby , 1966 ; Murphy et *al.*, 1990).

L'analyse isoenzymatique est relativement simple et facile à réaliser. Un extrait de tissu de la plante est préparé puis soumis à une électrophorèse sur un gel d'amidon ou de

polyacrylamide..Les protéines de cet extrait vont migrer sur le gel selon leur poids moléculaire, sous l'effet du courant électrique, puis chaque isoenzyme est révélée par une coloration spécifique.

Les marqueurs protéiques peuvent être analysés à un stade très jeune de la plante et leur majorité présente un mode d'héritabilité codominant. Cependant ils sont parfois affectés par les facteurs de l'environnement et leur nombre est limité.

1.2.3.2. Les marqueurs d'ADN :

Selon la technique de mise en évidence utilisée, les marqueurs d'ADN peuvent être classés en deux catégories :

- Marqueurs d'ADN basés sur l'hybridation moléculaire : RFLP (Helentjaris et *al.*, 1986 ; Osborn et *al.*, 1987)
- Marqueurs d'ADN basés sur l'amplification génique *in vitro* par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) comme la RAPD, l'AFLP, les SCAR, l'ISSR, les SSR, la SNP, etc

D'après la chronologie de leur apparition, on peut considérer les RFLP et les RAPD, comme des marqueurs de première génération, les AFLP et les SSR de deuxième génération, et les SNP de troisième génération. Les autres marqueurs tels que les SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), STS (Sequence-Tagged-Site), etc., peuvent être considérés comme des marqueurs d'appoint.

Par rapport aux marqueurs morphologiques et protéiques les avantages des marqueurs d'ADN sont nombreux : grand nombre, haut niveau de polymorphisme, neutres, bonne répétitivité ou reproductibilité, possibilité de génotypage à grande échelle, l'automatisation, non affectés par les facteurs de l'environnement, stables, établissement de bases de données interchangeables, etc....(Zhang, 2002). Parmi les marqueurs d'ADN les plus utilisés par les généticiens et les améliorateurs : la RFLP (Botstein et *al.*, 1980) la RAPD (Williams et *al.*, 1990), l'AFLP (Vos et *al.*, 1995) et l'STS (Olson et *al.*, 1989).

1.2.3.2.1. Marqueurs d'ADN basés sur l'hybridation moléculaire (Exemple : RFLP) :

La RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction développée par Botstein et *al* en 1980 ou encore, polymorphisme de la longueur de fragments d'ADN générés par hydrolyse d'une enzyme de restriction. Celle-ci

est révélée après hybridation avec une sonde marquée sur les fragments séparés par électrophorèse sur gel et transférés sur membrane de nitrocellulose.

Les enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites spécifiques comprenant, en général, un nombre pair de bases (4, 6 ou 8). Une enzyme ayant un site de reconnaissance à 6 bases coupe l'ADN toutes les 4 096 bases en moyenne (46). La spécificité est telle que le remplacement d'une seule base dans un site, suffit à empêcher la coupure de l'ADN par l'enzyme utilisée. C'est cette spécificité qui est exploitée pour la mise en évidence du polymorphisme : une présence/absence de site de restriction entraîne un polymorphisme de longueur des fragments. Le polymorphisme révélé, résulte d'événements de mutation au niveau des sites de restriction de l'enzyme utilisée ou d'insertion/délétion dans la séquence ciblée par la sonde ou à proximité de celle-ci. Une multitude de travaux, en amélioration des plantes ou analyse de la diversité génétique, utilise les marqueurs RFLP. La grande diversité des enzymes de restriction disponibles permet de trouver très souvent du polymorphisme. Des plantes aussi peu polymorphes que le blé tendre ou la pomme de terre disposent désormais d'une carte génétique réalisée, dans des croisements intraspécifiques, grâce à des marqueurs RFLP (Nelson et *al.*, 1995). Les marqueurs RFLP présentent toutes les qualités d'un très bon marqueur génétique. Ils peuvent être mono-locus ou multi-locus, codominants, bi ou multialléliques. Ils permettent de marquer toutes les régions du génome, nucléaire ou cytoplasmique, les régions codantes ou non codantes.

1.2.3.2.1. Marqueurs d'ADN basés sur l'amplification génique in vitro par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) :

Par rapport à la technique décrite précédemment qui vise à révéler le polymorphisme dans ou au voisinage d'une séquence particulière (technique spécifique de locus), les techniques décrites ici, regroupées sous l'appellation MAAP (*Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*), toutes fondées sur la PCR, ne « ciblent » pas une région particulière du génome fixée à l'avance. Presque toujours, elles révèlent simultanément plusieurs locus (jusqu'à plus d'une centaine), ce qui permet souvent, en peu d'expériences, de caractériser sans ambiguïté un génotype. Elles sont naturellement utilisées pour réaliser du génotypage rapide (ou *fingerprinting* / empreintes génétiques) mais servent également pour la cartographie génétique et chaque fois qu'il faut saturer en marqueurs, une région particulière du génome.(Sylvian et *al.*, 2000).

1.2.3.2.1.1. Technique RAPD :

La RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) ou ADN polymorphe amplifié au hasard, développée par Williams et *al.* en 1990. Amplification PCR de séquences inconnues utilisant une seule amorce de 10 bases définie arbitrairement. Les profils électrophorétiques des fragments d'ADN amplifiés contiennent une dizaine de bandes.

Le principe de la RAPD consiste à réaliser une réaction PCR sur l'ADN de l'individu étudié, en utilisant une amorce qui va s'hybrider chaque fois que se trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire. Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (à moins de 3 000 pb) et en direction opposée, c'est-à-dire dans une configuration permettant la PCR, l'amplification aura lieu. Si un de ces deux sites est absent dans un autre individu, il n'y aura pas d'amplification et un polymorphisme de présence/absence sera observé. Les produits d'amplification obtenus en RAPD, dont le nombre dépasse rarement la dizaine, sont en général séparés par électrophorèse en gel d'agarose.

Dans la majorité des cas, le polymorphisme révélé par la technique RAPD est de type présence/absence. Dans ces conditions, les homozygotes pour l'allèle « absence de bande » sont repérés sans ambiguïté, tandis que la présence de bande ne permet pas de trancher entre l'hétérozygote et l'homozygote pour l'allèle « présence de bande ». Ces marqueurs sont donc qualifiés de « dominants ». Les marqueurs sont caractérisés par une taille de fragment, ce qui n'implique en aucun cas l'homologie de séquence des fragments amplifiés de même taille qui sont observés chez des individus différents. Les études de diversité qui reposent sur ces marqueurs devraient comporter une étape de vérification pour éviter la confusion d'allèles appartenant à des locus différents.

1.2.3.2.1.2. L'AFLP :

L'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polymorphisme de longueur des fragments d'amplification, développée par Vos, Hogers, Bleeker, et *al.* en 1995. Amplification PCR d'ADN génomique après digestion avec 2 enzymes de restriction et ligation d'adaptateurs d'environ 20 paires de bases. Les amorces PCR correspondent aux adaptateurs plus 2 ou 3 bases aléatoires en 3'. La technique AFLP est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires, aboutissant à des

profils multi-bandes. Elle a été mise au point par la société néerlandaise Keygene pour une utilisation initiale en amélioration des plantes, et elle est couverte par un brevet.

L'ADN génomique purifié est d'abord coupé par deux enzymes de restriction (généralement *EcoRI* et *MseI*) ayant des sites de reconnaissance respectivement de 6 et 4 bases. Des adaptateurs de séquence connue de 10 à 15 bases, adaptés aux extrémités cohésives des sites de restriction, sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN par une réaction de ligation avec l'enzyme *Ligase*. Une première amplification, dite présélective, amplifie les fragments d'ADN à l'aide d'amorces correspondant à la séquence des adaptateurs et du site de restriction additionné en 3' d'une base définie arbitrairement. Un mésappariement de cette base 3' terminale de l'amorce, empêche totalement l'amplification (Sylvian et al., 2000).

La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières additionnées de 1, 2 ou 3 bases supplémentaires à leur extrémité 3'. Un sous-ensemble de fragments est alors amplifié. Les produits de l'amplification finale sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant (gel de séquence). Ils peuvent être ensuite visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent, réalisé lors de la seconde amplification. Les profils sont en général complexes (50 à 100 bandes).

La technique AFLP permet de révéler un polymorphisme important chez toutes les plantes, essentiellement de type présence/absence, et peut produire des marqueurs issus de toutes les régions du génome. Elle constitue une technique de choix pour marquer rapidement un grand nombre de locus dans un génome. Cette technique permet donc de réaliser des empreintes génétiques hautement informatives, afin de comparer des génotypes génétiquement très proches, de réaliser facilement des cartes génétiques ou de saturer une région particulière d'un génome.

Comme pour la technique RAPD, les marqueurs AFLP sont essentiellement dominants. Cependant, la technique AFLP nécessite plus de technicité que la RAPD, mais génère plus de marqueurs, plus polymorphes et avec plus de crédibilité. De nombreuses études de diversité ou de cartographie utilisent désormais le procédé AFLP (Sylvian et al., 2000).

3.

Matériel & Méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal:

L'étude du polymorphisme protéique et de l'ADN, a porté sur huit populations d'*O. crenata*, une population d'*O. ramosa* et une population d'*O. aegyptiaca*. Les plants ont été récoltés à l'état mature; Les capsules sèches ont été vidées et les graines tamisées, afin de les séparer des impuretés (enveloppes capsulaires). Les écotypes collectés ont été conservés dans des boîtes métalliques à l'abri de l'humidité et de la chaleur. L'ensemble du matériel végétal utilisé est résumé dans le tableau 5.

Tableau 5: *Origine des populations d'Orobanche étudiées.*

Espèce	Localité	Hôte	Année de collecte	Code	Technique appliquée
<i>O.crenata</i>	El Harrach(INA)	<i>Vicia faba</i>	1996	OCIF	EP ¹ /RAPD/AFLP
<i>O.crenata</i>	Oued smar	<i>Vicia faba</i>	2000	OCOF	EP/RAPD
<i>O.crenata</i>	El Arbaatache	<i>Vicia faba</i>	1996	OCEF	EP/RAPD/AFLP
<i>O.crenata</i>	Oued Smar	<i>Pisum sativum</i>	1996	OCOP	EP
<i>O.crenata</i>	Oued Smar	<i>Cicer arietinum</i>	2000	OCOC	EP
<i>O.crenata</i>	Khemis Elkhechna	<i>Daucus carota</i>	1996	OCKD	EP/RAPD/AFLP
<i>O.crenata</i>	Staouéli	<i>Vicia faba</i>	2000	OCSF	EP/RAPD/AFLP
<i>O.crenata</i>	Tipaza	<i>Vicia faba</i>	2000	OCTF	EP/RAPD/AFLP
<i>O.ramosa</i>	El Harrach(INA)	<i>Oxalis cernua</i>	2000	ORA	EP
<i>O.aegyptiaca</i>	Khemis Elkhechna	----	1996	OA	RAPD

¹ *Electrophorèse des protéines.*

2.2. Analyse électrophorétique des protéines par (SDS PAGE):

Les protéines des graines d'orobanche ont été analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel de polyacrylamide à 10%, comme décrit par Laemeli (1970).

2.2.1. Préparation du gel d'électrophorèse:

Deux gels de porosité différente ont été préparés (gel de concentration et gel de séparation) dont la préparation est indiquée dans l'Annexe I et II. La séparation des protéines selon leur poids moléculaire est réalisée sur un gel de séparation à 10%.

Le gel de séparation est préparé à partir d'une solution monomère composée d'acrylamide à 30% et de bisacrylamide à 2,7%, additionnée d'un tampon Tris-HCl 1,5M (pH=8,8). La solution SDS est ajoutée afin de charger négativement *les* protéines, le persulfate d'ammonium pour la polymérisation et le TEMED pour initier la migration des protéines.

Le gel de concentration est préparé à partir d'une solution monomère additionnée d'un tampon Tris-HCl 1M (pH=6,8) ; ce gel est déposé au dessus du gel de séparation.

Après avoir préparé les gels, ces derniers ont été coulés dans une cuve de type SE 250 Mighty Small II(Hoefer) de dimension (14cm x 18 cm x 0,75 mm), puis laissés pour polymérisation pendant 20 minutes.

2.2.2. Préparation des échantillons :

- 0,2g de graines d'orobanche sont broyées dans un tube Eppendorf avec 1,5 ml d'eau distillée stérile. La suspension est laissée pour infuser pendant 24 h, puis elle est soumise à une centrifugation à 1000 rpm pendant 10min.
- L'extrait protéique est mélangé avec un volume égal de tampon Tris-HCl (pH=6.8) (Annexe I) puis dénaturé par chaleur à 80°C pendant 2 à 3 minutes dans un bain marie. Les extraits ainsi dénaturés, sont immédiatement mis dans de la glace. 20 µl de chaque extrait sont injectés dans le gel à l'aide d'une seringue Hamilton.

2.2.3. Electrophorèse:

L'électrophorèse a été réalisée à 100V pendant 3 heures. La migration a été arrêtée une fois que l'indicateur coloré(tampon de charge) arrive à 1cm du bas du gel. Afin de pouvoir calculer les poids moléculaire des bandes protéiques générées, un marqueur protéique (Sigma-Wide Molecular Weight Standard), dont la gamme de poids varie de 6,5 KD à 180 KD, a été injecter dans le dernier puit du gel d'électrophorèse.

2.2.4. Coloration du gel et révélation des bandes protéiques:

Le gel a été coloré dans 200 ml de solution de Bleu de Coomassie brillant R-250, pendant toute la nuit, ensuite rincé dans de l'eau distillée, puis décoloré dans 200 ml de solution de décoloration pendant 2 h. La décoloration est ainsi répétée jusqu'à apparition des bandes protéiques. La composition des différentes solutions de coloration est indiquée dans l'Annexe I.

2.3. Extraction et purification de l'ADN génomique:

L'ADN génomique a été isolé et purifié à partir des graines d'orobanche , selon deux méthodes.

2.3.1. Méthode (1) : Extraction par la procédure du Kit Dneasy Plant for DNA isolation from plant tissue :

Le matériel végétal constitué par 20 mg de matière végétale sèche, est d'abord broyé mécaniquement dans un mortier, avec de l'azote liquide, lysé par l'addition d'un tampon de lyse, puis incubé à 65°C. L'ARNase présente dans le tampon de lyse digère l'ARN.

Les protéines et les polysaccharides sont précipités par des sels, tandis que les débris cellulaires et les précipités sont éliminés en une seule étape, par une brève centrifugation à travers une unité de filtration et d'homogénéisation : le système QIAshredder™.

Le surnageant clair est transféré dans un nouveau tube, auquel un tampon de fixation et de l'éthanol sont ajoutés afin de favoriser l'adsorption de l'ADN à la membrane du Dneasy. L'extrait est ensuite introduit dans la microcolonne de centrifugation (Dneasy spin column), puis soumis à une brève centrifugation dans un microcentritube. L'ADN se fixe sur la membrane, alors que les contaminants tels que les protéines et les polysaccharides sont efficacement éliminés par deux étapes de rinçage. Après cette étape, l'ADN pure est élué dans un faible volume de tampon (schéma Fig.11)

2.3.2. Méthode (2) : Extraction par la méthode de DOYLE & DOYLE (1990) modifiée:

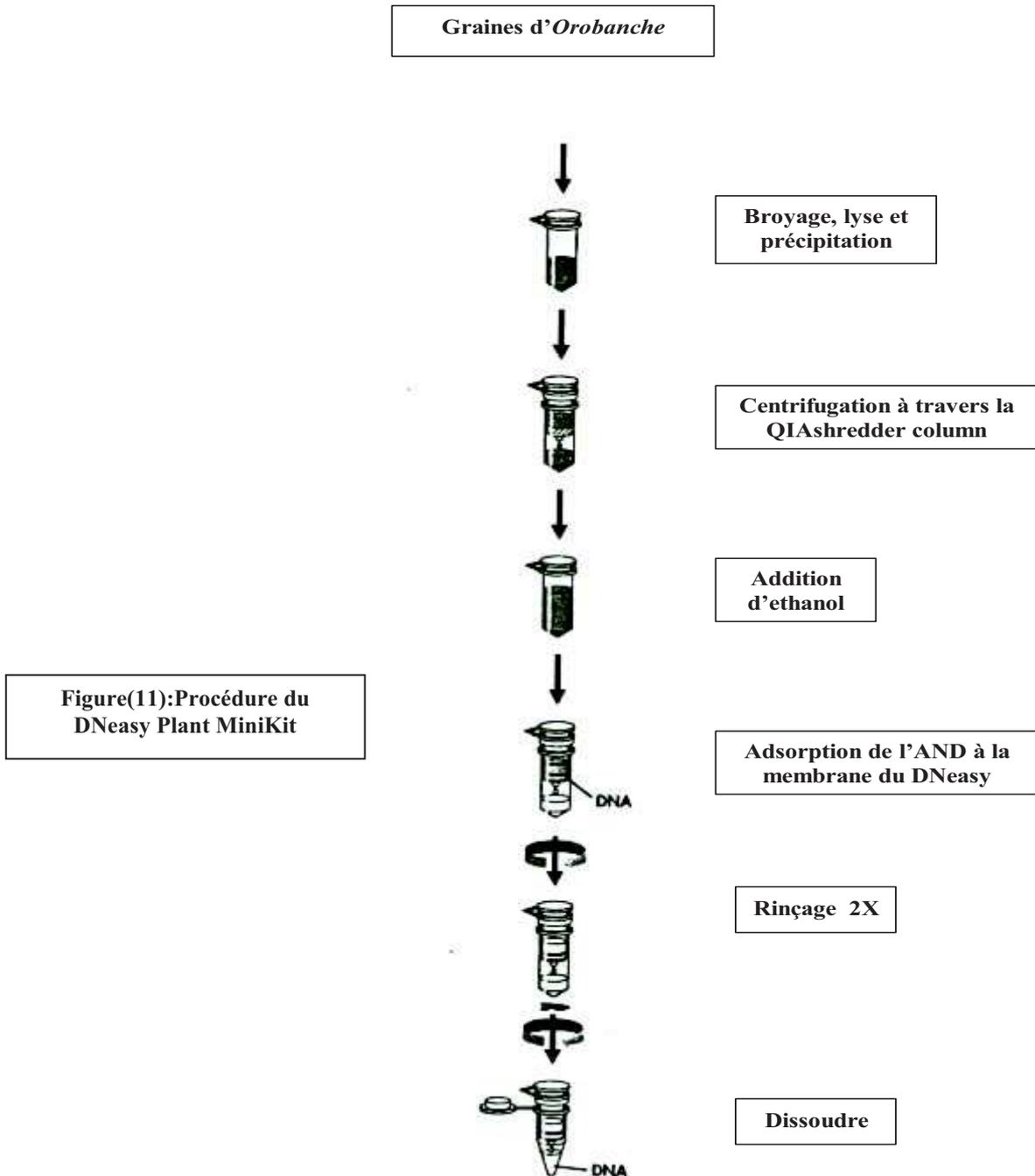
L'ADN génomique total a été isolé à partir de 0,05g de graines d'*Orobanche* en procédant de la manière suivante :

2.3.2.1. Extraction :

- Broyer dans un mortier, 0,05g de graines d'orobanche dans de l'azote liquide, jusqu'à obtention d'une poudre fine.
- Transférer immédiatement le broyat dans un tube Eppendorf (1,5 ml) puis ajouter 600 µl de tampon CTAB, préalablement chauffé à 70°C .
- 600 µl de mercapthoéthanol sont ajoutés en dernier.
- Soumettre au vortex pendant 20 secondes à vitesse maximale.
- Incuber au bain-marie à 70°C pendant 20 minutes.
- Ajouter un volume de chloroforme :isoamyl-alcool (24 :1).invertir doucement les tubes pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 10.000 rpm pendant 5 minutes.
- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube Eppendorf.
- Ajouter l'ARNase A [100µg/ml]. Mélanger doucement, puis incuber à température ambiante pendant 30 à 60 minutes.
- Ajouter 0,7 volume d'isopropanol froid. Mélanger doucement, puis incuber pendant 30 minutes à 4°C.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 minutes.
- Eliminer la phase aqueuse et laisser le précipité se dessécher.

- Ajouter 100µl du tampon TE et laisser dissoudre (sans aucune agitation), puis conserver les extraits d'ADN à 4C°.

La composition du tampon d'extraction est indiquée dans l'Annexe III.



Figure(11):Procédure du DNeasy Plant MiniKit

2.3.2.2. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN extrait, par comparaison au marqueur, sur gel d'agarose :

La concentration de l'ADN obtenu a été déterminée après dilution de moitié de celui-ci. Les échantillons d'extraits d'ADN ainsi dilués ont été injectés dans un gel d'agarose à 1% (Sambrook et *al.*,1989), et soumis à une électrophorèse. La concentration a été estimée par comparaison à l'ADN marqueur $\lambda\phi$ (Lambda DNA digéré par *Hind* III and *Phi* X 174 DNA digéré par *Hae* III) (cf. Annexe IV). Ce marqueur comprend des fragments d'ADN, qui couvrent une gamme de taille entre 23130 bp et 310 bp, et une gamme de concentration allant de 95 ng à 11 ng comme indiqué en Annexe IV. L'estimation de la concentration de l'ADN au niveau d'un échantillon donné est faite par la comparaison du degré de fluorescence de la bande de l'ADN échantillon avec les différentes bandes de l'ADN marqueur correspondant à une concentration connue.

2.4. Analyse du polymorphisme de l'ADN par la technique de la Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD

Les marqueurs RAPD sont obtenus par amplification par la Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne. Il s'agit de l'amplification au hasard, de séquences d'ADN au niveau du génome végétal. Dans cette technique, une amorce (oligonucléotide) est utilisée pour initier l'amplification de l'ADN génomique. Le nombre de produits d'amplification est directement lié au nombre et à l'orientation des séquences qui sont complémentaires à l'amorce, au sein du génome (El-Khishine, 1998) .

2.4.1. Amorces utilisées dans l'analyse RAPD :

Vingt deux (22) amorces décamères arbitraires, de type OPERON ont été choisies au hasard parmi un jeu de 1000 amorces arbitraires représentant toutes les combinaisons possibles de 10 nucléotides (le ratio GC dans les 22 amorces est supérieure ou égal à 60%). Ces amorces ont été synthétisées au niveau de l'AGERI (Egypte) dans un ABI 392 DNA/RNA Synthétiseur (Applied Biosystems). Dix (10) amorces seulement, ayant donné de bons profils RAPD ont été retenues pour déterminer le polymorphisme inter et intraspécifique (Annexe V).

2.4.2. Préparation des mélanges réactionnels de la PCR :

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume total de mélange réactionnel de 25 μ l. La préparation des réactions s'est fait comme suite :

1. une « Master Mix » est préparée dans un microtube de 1,5 ml, selon le nombre de réactions PCR à réaliser, plus une « extra-réaction », afin de compenser les pertes de solution ,dues au pipetage répété.

Chaque réaction contient :

Composant	Concentration initiale	Concentration finale	Volume
Tampon de la réaction	10X	1X	2,5µl
DMSO	10%	2%	0,5 µl
dNTPs	2mM	200µM	2,5 µl
MgCl ₂	50mM	2,5mM	1,25 µl
Taq polymerase	5U/ µl	2 U/ µl	0,4 µl
H ₂ O D.S	-	-	6,85 µl
Volume total			25 µl

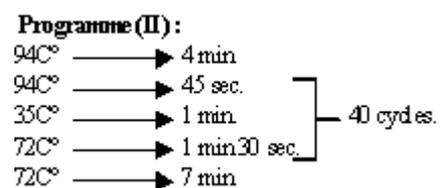
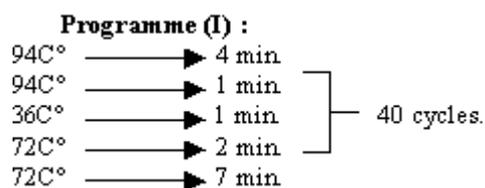
2. un aliquote de 22 µl de la « Master Mix » est dispensé dans chaque tube-PCR (0,5 ou 0,2 µl).
3. à chaque tube on ajoute 8 µl d’amorce , et 50 ng d’ADN.
4. les tubes sont ensuite soumis à une légère centrifugation.

2.4.3. Programme PCR et profils de températures :

L’amplification de l’ADN a été réalisée en plaçant les tubes contenant les mélanges réactionnels dans un Thermocycleur du type : « Perkin Elmer Cetus Thermal cycler 9700 », programmé pour accomplir 42 cycles. Deux programmes PCR différents ont été testés pour optimiser l’amplification, sur la base des expériences menées par Zeid (1998).

Chaque programme comprend :

- 1 cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 4 minutes
- 40 cycles composés chacun :
 - (a) d’une étape de séparation des deux chaînes d’ADN.
 - (b) d’une étape d’anneau de l’amorce à l’ADN matrice ou cible
 - (c) et une étape d’élongation ou d’extension par la Taq polymérase.
- Un cycle final de polymérisation ou de reconstitution , pour assurer le dédoublement total des fragments amplifiés.



2.4.4. Séparation par électrophorèse des produits de la PCR :

Une fois les 40 cycles achevés, les produits d'amplification sont analysés par une séparation électrophorétique sur gel d'agarose à 1,4%, à 80V pendant 2 à 3 heures. La taille des fragments spécifiques a été calculée sur la base d'un ADN marqueur le 1 Kb Plus DNA Ladder™. la préparation du gel d'agarose est indiquée dans l'annexe VI .

2.4.5. Visualisation, dénombrement des bandes et photographie des gels :

Après électrophorèse des produits-PCR, les profils RAPD sont visualisés au transilluminateur UV. Les marqueurs RAPD sont notés à partir du gel, d'après leur présence/ absence au niveau de toutes les lignes (ou bandes). Les gels sont photographiés à l'aide d'une caméra polaroid (MP4 Land Camera) à l'aide de films polaroids type 57 (ASA 3000).

2.5. Analyse du polymorphisme de l'ADN par la technique AFLP

Le système I –AFLP Starter Primer Kit, (Life Technologies -GIBCO BRL) a été conçu pour les plantes ayant un génome de taille variant entre 5×10^8 et 6×10^9 bp, incluant la tomate, le concombre, la laitue, l'orge, le Cotton, la pomme de terre, le tournesol...etc. La technique AFLP comprend 3 étapes majeures:

1. digestion de l'ADN par les endonucleases de restriction et la ligation des adaptateurs.
2. L'amplification des fragments de restriction
3. Electrophorèse des fragments d'amplification.

Typiquement, 50 à 100 fragments de restriction sont co-amplifiés dans chaque réaction et détectés par électrophorèse en conditions dénaturantes. Cette technique bien que coûteuse, est toutefois extrêmement puissante pour l'identification du polymorphisme de l'ADN.

2.5.1. Description des différentes étapes de la méthode:

2.5.1.1. Restriction et digestion de l'ADN:

1-250 ng d'ADN génomique ont été digéré avec deux enzymes de restriction, l'*EcoRI* (hexa-cutter) et le *MseI* (tetra-cutter), pendant 2h à 37 °C.

- préparation de la solution de restriction/digestion: (A préparer dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.)

Composant	Volume
Tampon de réaction 5X	5 µl
ADN (250 ng dans ≤ 18 µl)	250 ng
<i>EcoRI/MseI</i>	2 µl
Eau distillée	Qsp.25 µl
Volume total	25 µl

2- une légère agitation suivie d'une brève centrifugation permet d'homogénéiser la réaction, puis incuber le mélange à 37°C pendant 2H.

3-ce même mélange est incubé ensuite pendant 15 mn à 70°C pour inactiver les endonucléases de restriction. Les tubes sont placés ensuite dans de la glace, puis soumis à une brève centrifugation.

2.5.1.2. Ligation des adaptateurs:

Après avoir digéré l'ADN par les enzymes de restriction, les produits de la digestion sont soumis à la ligation spécifique des adaptateurs. Pour cela nous avons procédé de la manière suivante:

1-ajouter aux échantillons d'ADN digéré, les composants suivants:

Composant	Volume
Solution d'adaptateur	24 µl
T4 DNA ligase	1 µl

2-les réactions de ligation sont agitées légèrement à température ambiante, puis soumises à une brève centrifugation, pour homogénéiser la réaction.

3-ces réactions sont incubés à 20°C ± 2°C pendant 2 heures.

4-après incubation, les produits de la réaction sont dilués à 1:10 comme suit::

a-prendre 10 µl de la réaction et la transférer dans un eppendorf de 1,5 ml

b-ajouter 90 µl du tampon T.E

NB: la portion inutilisée peut être conservée à (-20°C).

2.5.1.3. Réaction de pré-amplification: (ou réaction d'amplification pré-sélective)

Les réactions de préamplification sont réalisées dans des micro tubes de 0.2 ou 0.5 ml, comme

suit: 1-Préparation des réactions :

Composant	Volume
ADN matrice dilué (de l'étape 5.1.2)	5 µl
Amorce preamp. Mix.	40 µl
Tampon PCR plus Mg 10X	5 µl
Taq DNA polymérase	1 µl
Total	51 µl

2-agiter légèrement et soumettre à une brève centrifugation.

3-réaliser une PCR à 20 cycles avec le programme de température suivant:

94°C/ 30s.

56°C/ 60s.

72°C/ 60s.

NB: température de conservation : 4°C.

4-les produits de l'amplification préselective sont dilués à 1:50 de la manière suivante:

- a-transférer 3 µl de la pré-amplification dans un tube de 1,5 ml
- b-ajouter 147 µl de tampon TE

NB: les portions diluées et non diluées sont conservées à (- 20°C).

2.5.1.4. Amplification sélective:

Après avoir effectué les dilutions, celles-ci sont soumises à l'amplification sélective.

1-préparation des amorces pour l'amplification sélective: pour chaque paire d'amorce, additionner les composants suivants, dans un microcentritube de 1.5 ml et le marquer (Mix I):

Composant	Volume
<i>Eco</i> RI marqué	0,5 µl
<i>Mse</i> I	4,5 µl
Volume total	5 µl

2-préparation du mélange réactionnel pour l'amplification sélective: additionner les composants suivants, dans un autre microcentritube de 0,5 ml et le marquer (Mix II):

Composant	Volume
Eau distillée	7,9 µl
Tampon PCR 10X + Mg	2 µl
<i>Taq</i> polymérase (5V/µl)	0,1 µl
Volume total	10 µl

3-préparation de la réaction d'amplification sélective: dans un microcentritube de 0,5 ml, additionner :

Composant	Volume
ADN dilué	5 µl
Mix I(amorces/ dNTPs)	5 µl
MixII(<i>Taq</i> DNA polymérase/tampon)	10 µl
Volume total	20 µl

4-les réactions ainsi préparées, sont remuées légèrement puis soumises à une brève centrifugation.

5-réaliser une PCR, selon le programme de température suivant :

a-un premier cycle avec le programme suivant:

94°C /30s.	} 1 cycle
65°C /30s.	
72°C /60s.	

b-à partir du deuxième cycle, faire baisser la température de 0,7°C à chaque cycle, durant 12 cycles, ceci donne une touch down de 13 cycles.

c-une fois la touch down terminée, réaliser le profil suivant:

94°C /30s.	} 23 cycles
56°C /30s.	
72°C /60s.	

2.5.1.5. Electrophorèse des produits d'amplification:

Une fois l'amplification sélective terminée, les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La préparation des plaques, du gel et des échantillons pour l'électrophorèse, est indiquée dans l'AnnexeVII.

Faire une pré-électrophorèse du gel ($\approx 55W$) pendant 20 min (pour chauffer le gel), puis injecter 8 μ l de chaque mélange dans le gel. L'électrophorèse est réalisée à une énergie constante jusqu'à ce que le Xylène cyanol (à migration lente) migre à une distance égale aux 2/3 de la longueur du gel.

2.5.1.6. Fixation, coloration et développement des bandes électrophorétiques:

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est soumis à la coloration au nitrate d'argent (silver staining revelation). La préparation des solutions de fixation, de coloration et de développement, est indiquée dans l'AnnexeVIII. Afin de révéler les profils générés, on procède à la fixation du gel dans la solution A, avec une légère agitation, pendant 30 mn. Puis on réalise 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile (2 mn chaque rinçage). Après cela on effectue la coloration du gel dans la solution B, pendant 30 mn, avec une légère agitation, on rince rapidement le gel (10 à 12 secondes maximum). Le développement des bandes électrophorétiques est réalisé dans la solution C, jusqu'à apparition des premières bandes. Après la révélation des bandes, on procède à la fixation du gel avec la solution A, ensuite on réalise 2 rinçages à l'eau distillée stérile. Le gel est séché à température ambiante, puis visualisé sur un transilluminateur UV, puis scanné dans un GelDoc de type Biorad GelDoc 2000.

2.2.5. Analyse statistique des résultats:

La mobilité électrophorétique relative (Rf) des différentes bandes protéiques a été déterminée selon la formule suivante:

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par la bande}}{\text{Distance parcourue par le front de migration}}$$

Le poids moléculaire des bandes protéiques communes et uniques a été calculé par extrapolation par rapport aux bandes référentielles du marqueur protéique utilisé.

Les matrices de présence/absence, des trois systèmes marqueurs (protéines, RAPD et AFLP) ainsi qu'une matrice globale (regroupant la totalité des marqueurs générés par la RAPD et l'AFLP), ont été analysés par le Logiciel Diversity Database Fingerprinting Software. Version 2. pour Windows et Macintosh. Les profils électrophorétiques générés, ont été

comparés afin de déterminer la variabilité des différents écotypes étudiés. Les bandes de mobilité similaire ont été marquées identiques ou communes.

Le coefficient de similarité (sim) entre les différents génomes étudiés est défini par la formule Dice :

$$\text{sim} = 200 \times \sum_{i=1}^B \text{Min}(s_i, t_i) / \sum_{i=1}^B (s_i + t_i)$$

où :

s_i et t_i représentent le nombre de fragments des populations s et t respectivement .

Le coefficient de dissimilarité (dist) est obtenu par la formule :

$$\text{dist} = 100 - \text{sim}$$

Les matrices de similarité et de dissimilarité ont été soumises à une classification algorithmique le « WPGAMA » ou : Weighted pair group method using arithmetic averages, appelé aussi « Average Linkage ». Ce mode de classification a été utilisé afin de générer un Dendrogramme. Le WPGAMA est un cas spécial du « UPGAMA » (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) .Il permet une distinction très précise, entre les groupes (clusters) les plus proches, et ce par la formation de sous-groupes (Diversity Database user guide, 1998).

Le contenu en information polymorphique de chaque marqueur AFLP détecté, a été manuellement calculé selon la formule suivante:

$$\text{PIC} = 2 f_i (1 - f_i)$$

Où:

PIC_i est le contenu en information polymorphique du marqueur (i)

f_i , est la fréquence de l'allèle amplifié (bande présente)

$1-f_i$ est la fréquence de l'allèle nul.

La corrélation des marqueurs des cinq écotypes étudiés, a été calculée selon la méthode de Pearson (par le logiciel SPSS 8.0 PC-version). Ce coefficient renvoie le coefficient de corrélation d'échantillonnage de Pearson r , un indice dont la valeur varie entre -1,0 et 1,0 inclus qui reflète le degré de linéarité entre deux séries de données.

La corrélation des matrices de similarités générées par les trois amorces AFLP utilisées a été calculée par la méthode de Spearman (par le logiciel SPSS 8.0 PC-version), afin d'estimer la présence de redondance dans l'information fournie individuellement par chaque amorce. Les

valeurs PIC et les taux de polymorphisme, ont été soumises à l'analyse de corrélation de Pearson, afin de comparer leur linéarité.

Afin d'obtenir une mesure de l'efficacité de chaque système marqueur, l'index de diversité (DI), le ratio multiplex effectif (E) et l'index marqueur (MI) ont été calculé d'après Powell et *al.*(1996).

Pour chaque locus, DI est calculé par la formule suivante:

$$DI = 1 - \sum P_i^2$$

Où :

P_i , est la fréquence de l'allèle (i); pour cet effet, chaque allèle est considéré comme un locus singulier.

(E), est défini comme étant le produit de la fraction des loci polymorphiques et le nombre de loci total détecter par chaque amorce individuellement.

(MI), est défini comme étant le produit de l'index de diversité et le ratio multiplex effectif.

Les matrices de similarité de la RAPD et de l'AFLP ont été soumises à un test de corrélation, afin de faire ressortir la linéarité des données des matrices de similarité des deux techniques. Les distances génétiques entre les écotypes étudiés et les distances géographiques entre les localités de collecte, ont fait aussi l'objet d'une corrélation afin d'estimer la relation existante entre ces deux derniers. Le coefficient de corrélation r , a été calculé par l'Excel (2000). Cet outil d'analyse et ses formules mesurent la relation existant entre deux séries de données mises à l'échelle pour être indépendantes de l'unité de mesure. Le calcul de la corrélation d'une population renvoie la covariance de deux séries de données divisée par le produit de leur écart type. L'équation du coefficient de corrélation est la suivante:

$$r = Cov(X,Y) / \sigma_X \cdot \sigma_Y$$

où:

Cov : est la covariance des données des deux matrices

$\sigma_X \cdot \sigma_Y$. est leur écart type .

Les distances géographiques entre les localités de collecte ont été calculées par le logiciel ArcView 2000.

4.

Résultats et Discussion

3.1. Analyse du polymorphisme protéique:

Le nombre de bandes révélées chez les différents écotypes d'*O. crenata* étudiés varie de 5 à 17 bandes et il est de 6 seulement chez *O. ramosa*. La bande (4) de valeur R_f 0.206 et de poids moléculaire 106,31 KD et commune aux deux espèces, *O. ramosa* et *O. crenata*, mais toute fois montrant une nette différence dans leur intensité (Fig.12). Les bandes (1), (5), (6) et (12) de valeur R_f égale à 0,062, 0,220, 0,234 et 0,330 et de poids moléculaire égale à 154,4 KD, 100,92 KD, 94,47 KD et 89,08 KD respectivement, sont spécifiques à *O. crenata* et peuvent être donc utilisées dans la discrimination des deux espèces *O. crenata* et *O. ramosa*.

La zone de migration des différentes protéines comprises entre les valeurs R_f 0,062 et R_f 0,400 regroupe les bandes avec les intensités les plus fortes. Les bandes (2), (3) et (8) de valeur R_f égale à 0,082, 0,103 et 0,248 et de poids moléculaire égale à 141,6 KD, 110,61 KD et 89,77 KD respectivement, sont spécifiques à *O. ramosa*, et représentent donc des marqueurs spécifiques de différenciation entre les deux espèces.

Cette analyse fait ressortir un polymorphisme protéique interspécifique évident, entre les deux espèces *O. ramosa* et *O. crenata*, ainsi qu'un polymorphisme protéique intraspécifique au sein des huit (08) populations d'*O. crenata*, différant entre elles par l'origine géographique et l'hôte sur lequel elles ont été prélevées. Cette variabilité est mise en évidence par les profils électrophorétiques, le poids moléculaire des bandes et les valeurs R_f relatives représentées dans le tableau 6.

L'indice Dice de similarité a été calculé selon la présence / absence des bandes (Tab.7), pour la comparaison des différentes populations. Le dendrogramme construit sur la base de la matrice de similarité Dice, a permis la mise en évidence d'un polymorphisme protéique interspécifique et intraspécifique (Fig.13).

Cette étude sur les protéines natives totales des graines d'orobanche analysées par SDS-PAGE, a montré une variabilité interspécifique pour le profil protéique obtenu, alors qu'une faible variabilité intraspécifique est observée.

En effet, l'indice de similarité interspécifique varie de 12,50 % à 28,60%, tandis que l'indice de similarité intraspécifique varie de 45,50% à 100% (Tab.7).

Bandes	Ecotypes									Poids moléculaire (KD)	Valeurs Rf
	OCIF	OCOF	OCOP	OCOC	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF	OR		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	154,400	0,062
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	141,600	0,082
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	110,617	0,103
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	106,311	0,206
5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	100,929	0,220
6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	94,470	0,234
7	1	1	1	1	1	1	1	0	0		0,241
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	98,776	0,248
9	1	1	1	1	1	1	1	0	0		0,255
10	1	1	1	1	1	1	1	0	0		0,262
11	1	1	1	1	1	1	1	0	0		0,268
12	1	1	1	1	1	1	1	1	0	89,088	0,331
13	1	1	1	1	1	1	1	0	0		0,400
14	1	1	0	0	1	1	1	0	0		0,434
15	1	1	0	0	1	1	1	0	1		0,448
16	1	1	0	0	1	1	0	0	1		0,510
17	1	1	1	0	0	1	1	0	0		0,537
18	1	1	0	0	1	1	1	0	0		0,600
19	1	1	0	0	1	1	1	0	0		0,641
20	1	1	0	0	0	1	1	0	0		0,690

Tableau(6): Profils électrophorétiques des protéines, leur poids moléculaire et leur valeurs Rf.

Les résultats sur la variabilité interspécifique des deux espèces, montrent une différence dans le profil protéique. Les bandes désignées (2), (3), (8) caractérisent l'espèce *O. ramosa*, alors que les bandes désignées (1), (5), (6) et (12) sont spécifiques à *O. crenata* (Fig.12).

La différence assez sensible dans l'intensité des différentes bandes protéiques produites pourrait s'expliquer par l'influence des conditions de l'environnement ou de l'hôte, étant donné que la plante parasite puise tous ses éléments nutritifs à partir de ce dernier.

En comparant les indices de similarité des huit (08) écotypes d'*O. crenata*, nous remarquons qu'ils sont très proches. Les indices de similarité les plus faibles enregistrées avec l'écotype OCTF (Tab.8), seraient le résultat de l'influence des conditions édapho-climatiques de la région, étant donné que les marqueurs protéiques sont sensibles aux conditions de l'environnement.

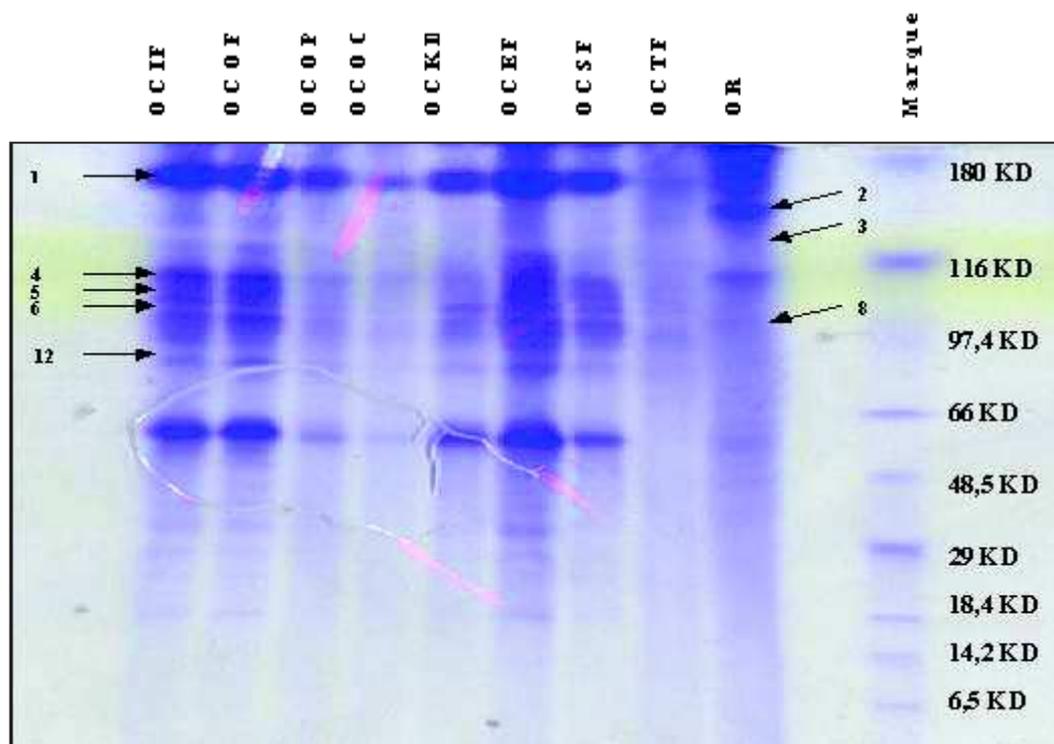


Figure (12): Profils électrophorétiques des protéines natives des différents écotypes d'*Orobanche crenata* et de l'espèce *Orobanche ramosa*, analysés.

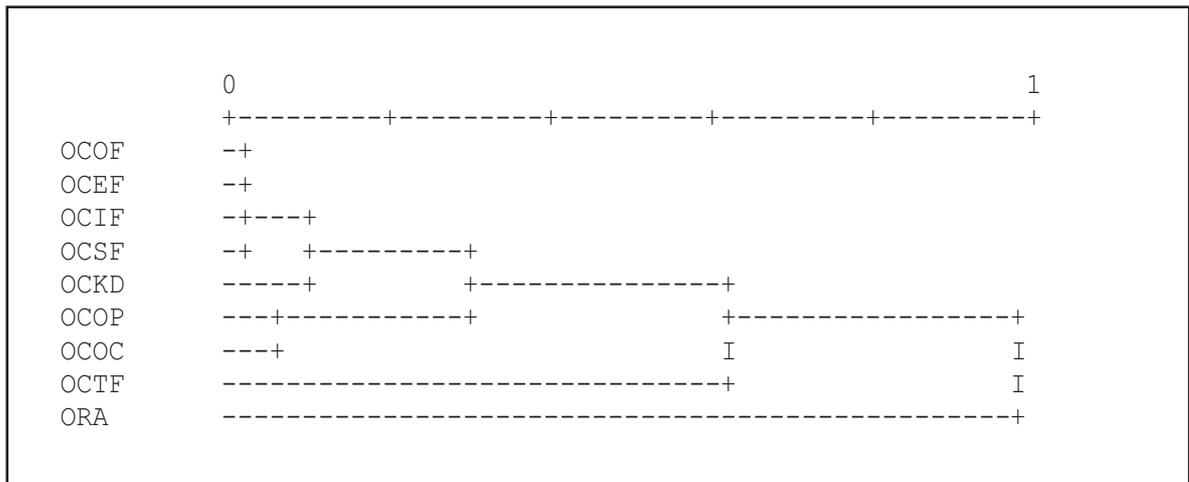
Il en est de même pour les faibles distances génétiques enregistrées avec les autres écotypes, influencées par le même facteur, mais avec un degré de fluctuation climatique moindre. Notons aussi que l'âge de la semence analysée des différents écotypes ainsi que l'hôte ne semblent pas avoir une influence sur la nature des protéines de la semence, ceci est clairement illustré par les distances génétiques enregistrées entre les écotypes :

DG(OCOF/OCIF)=0, DG(OCOP/OCIF)=0,21, DG(OCOC/OCOP)=0,048,
 DG(OCKD/OCIF)=0,07, DG(OCKD/OCOP)=0,23, DG(OCEF/OCIF)=0,
 DG(OCEF/OCOC)=0,25, DG(OCSF/OCIF)=0,03, DG(OCSF/OCOC)=0,23,
 DG(OCTF/OCIF)=0,54, DG(OCTF/OCOC)=0,33, où ces dernières varient indépendamment de l'hôte et de l'âge de la semence.

Zeid et *al.*(1997) n'ont noté aucune différence entre les profils protéiques de trois (03) populations d'*O. crenata* collectées en Egypte, à travers trois régions géographiques différentes. Gardiner & Forde (1992) rapportaient que les protéines natives des graines, mises en évidence par SDS-PAGE, est une technique efficace pour distinguer les cultivars des légumineuses. Le présent travail suggère l'utilisation de cette méthode pour l'identification des espèces d'orobanche.

Tableau(7): Indice de similarité Dice, des bandes électrophorétiques

Ecotype	Indices de similarité								
	OCIF	OCOF	OCOP	OCOC	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF	ORA
OCIF	100								
OCOF	100	100							
OCOP	78,6	78,6	100						
OCOC	74,1	74,1	95,2	100					
OCKD	93,8	93,8	76,9	80	100				
OCEF	100	100	78,6	74,1	,938	100			
OCSF	97,0	97,0	81,5	76,9	90,3	97	100		
OCTF	45,5	45,5	62,5	66,7	50	45,5	47,6	100	
ORA	26,1	26,1	11,8	12,5	28,6	26,1	18,2	18,2	100



Figure(13): Dendrogramme : classement hiérarchique de l'*Orobanche* spp, Par le WPGAMA à partir des comparaisons par paires, des profils protéiques électrophorétiques

3.2. Analyse du polymorphisme de l'ADN :

3.2.1. Optimisation des conditions de la RAPD

Afin d'obtenir des profils d'amplification bien marqués et reproductibles, différentes expériences ont été réalisées en faisant varier certains facteurs de la réaction PCR. Ces facteurs comprennent, la qualité de l'ADN et le programme-PCR.

3.2.1.1. Qualité de l'ADN :

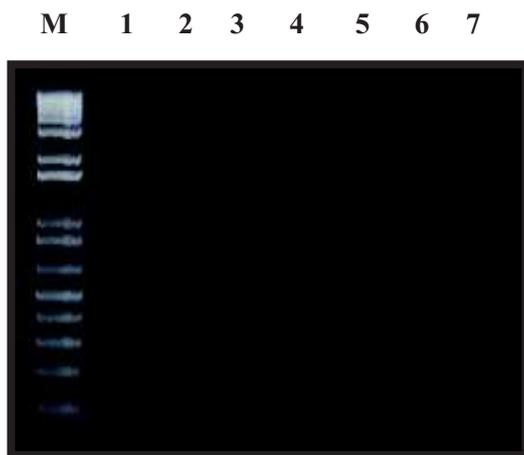
L'application d'une méthode d'extraction d'ADN appropriée est une condition requise pour étudier les marqueurs d'ADN. C'est pourquoi, deux méthodes ou procédures d'extraction d'ADN ont été testées.

L'extraction de l'ADN initialement réalisée par l'utilisation de la méthode du Dneasy Plant MiniHand Book (1999), a produit un ADN pure mais de très faible qualité (ADN dénaturé, non intact) et concentration (Fig.14). La deuxième méthode « CTAB » selon le protocole modifié de Doyle & Doyle (1990), a produit un ADN brut intact, mais de pureté moindre (Fig.15). La réalisation des réactions RAPD avec l'ADN extrait par chacune des deux méthodes, a produit de meilleurs profils avec l'ADN extrait avec la méthode « CTAB ».

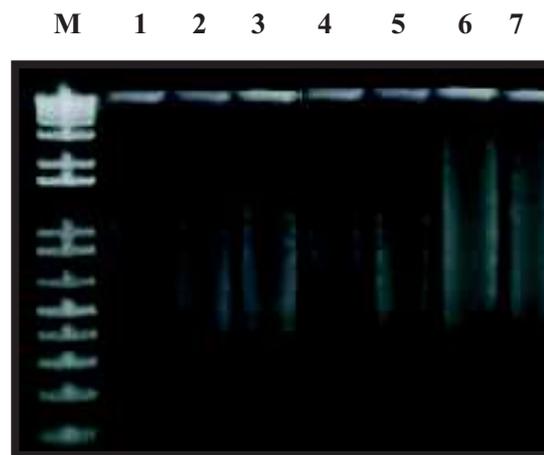
La forte dénaturation de l'ADN notée avec la méthode du mini hand book, est sûrement due à la teneur élevée en polyphénols des graines de la plante parasite. De plus, la viscosité du lysat ainsi que le taux élevé en précipités, ont provoqué la formation d'une couche compacte sur le QIA Shredder spin column, qui a failli à la conservation de l'intégrité de l'ADN lors de la centrifugation. D'autre part l'état déshydraté des graines a peut être diminué l'efficacité du tampon de lyse, ce qui expliquerait la faible concentration de l'ADN extrait.

3.2.1.2. Programme-PCR :

La PCR a été réalisée selon deux programmes de température (cf. Matériel et Méthodes) . A 35°C, nos résultats se sont montrés comparables à ceux obtenus à 36°C. Cependant quelques bandes ont déteint ou disparu avec l'élévation de la température d'annelage de 35°C à 36°C. Dans la littérature, plusieurs études utilisant les marqueurs RAPD ont été réalisées à une température d'annelage variant de 35°C à 36°C (Ljubenova & Minkov, 1998 ; Adawy, 1998 ; Zeid et al., 1997). Williams et al. (1993) indiquent que la qualité de l'amplification de l'ADN, dépend de la température d'annelage (annealing) .



Figure(14): ADN extrait selon la méthode du Dneasy Plant MiniHand Book



Figure(15): ADN extrait selon la méthode Doyle & Doyle (1990)

3.2.2. Identification des marqueurs RAPD et analyse des profils électrophorétiques:

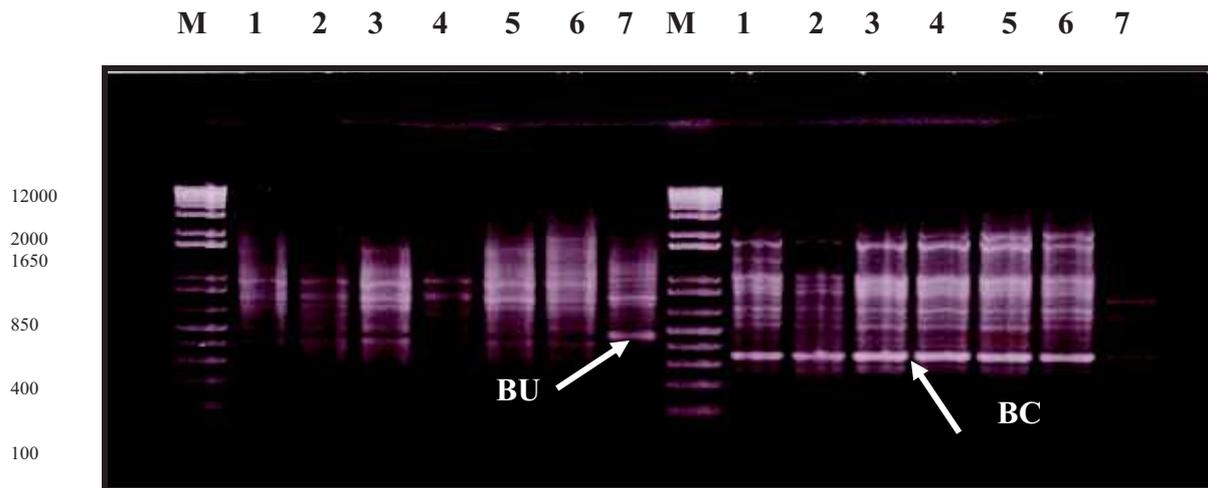
Six populations d'*O. crenata* et une population d'*O. aegyptiaca* ont été comparées en utilisant 10 amorces arbitraires, qui ont généré un total de 144 fragments reproductibles, dont 24 fragments sont monomorphiques (non polymorphiques) et 39 fragments spécifiques. Ceci représente un niveau de polymorphisme de 83.33% et une moyenne de 12 marqueurs par amorce (Fig.(16), (17), (18), (19) et (20)).

Le nombre et la taille des fragments amplifiés varient selon les amorces. Un maximum de 23 fragments amplifiés a été enregistré avec l'amorce OP-B13 et un minimum de 10 fragments amplifiés avec les amorces OP-G15 et OP-C7 (Tab.8).

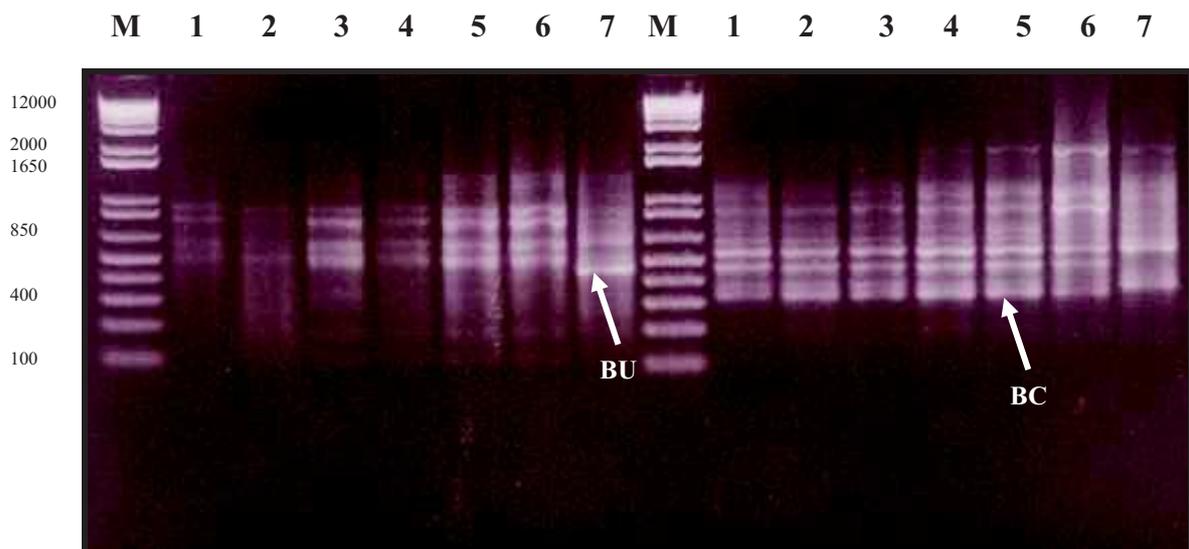
Pour chacune des amorces utilisées, nous avons relevé au moins une bande commune entre les différents génomes étudiés, alors que pour l'amorce OP-B5 nous n'en avons relevé aucune (Tab.8).

Tableau (8): bandes polymorphiques et communes amplifiées avec les 10 amorces RAPD.

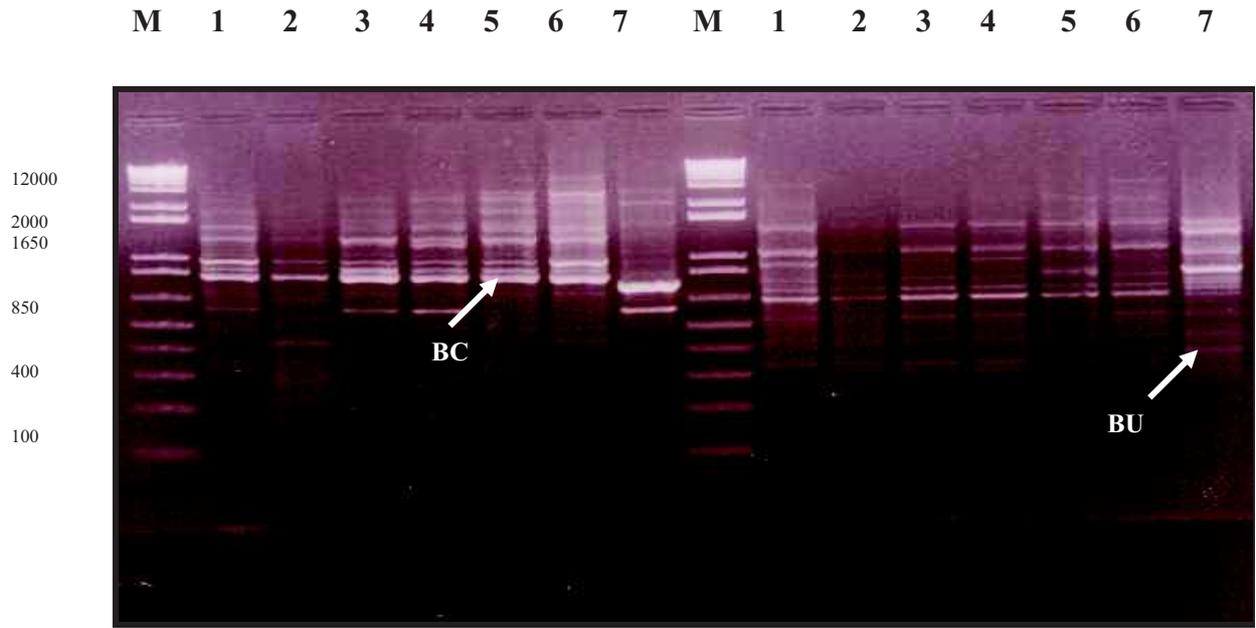
Code amorce	Nombre de fragments amplifiés		
	Polymorphiques	Communs	Total
OP-B1	13	2	15
OP-B5	13	0	13
OP-B12	7	5	12
OP-B13	22	1	23
OP-B18	11	2	13
OP-B20	10	3	13
OP-C7	7	3	10
OP-C9	16	3	19
OP-G15	7	3	10
OP-G19	14	2	16
Grand total			144



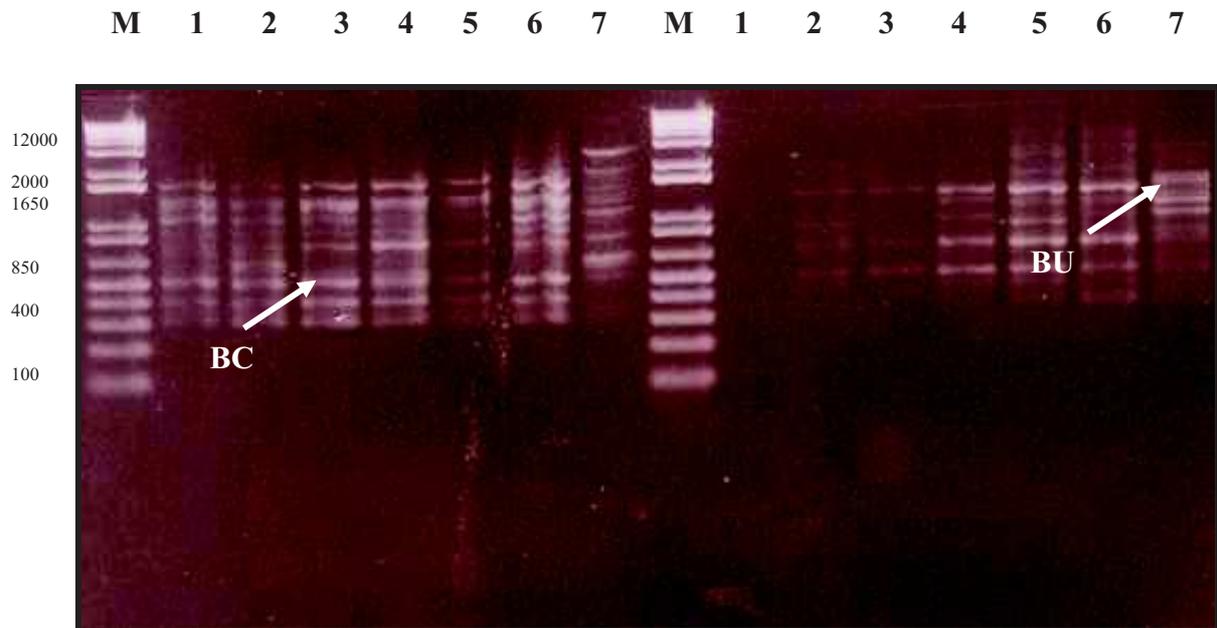
Figure(16): Polymorphisme de l'ADN, généré par deux amorces décimères différentes (amorce B18 et amorce B1), entre les six écotypes d'*O.crenata* (lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6) et *O.aegyptiaca*.



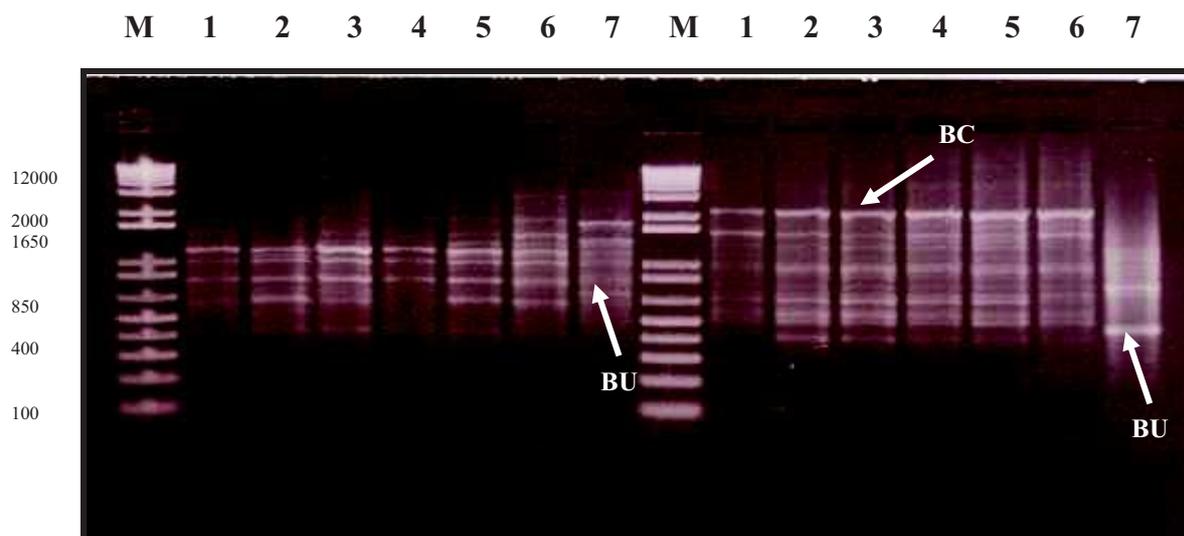
Figure(17): Polymorphisme de l'ADN, généré par deux amorces décimères différentes (amorce C7 et amorce B12), entre les six écotypes d'*O.crenata* (lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6) et *O.aegyptiaca*.



Figure(18): Polymorphisme de l'ADN, généré par deux amorces décimères différentes (amorce B13 et amorce C9), entre les six écotypes d'*O.crenata* (lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6) et *O.aegyptiaca*.



Figure(19): Polymorphisme de l'ADN, généré par deux amorces décimères différentes (amorce B20 et amorce B5), entre les six écotypes d'*O.crenata* (lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6) et *O.aegyptiaca*.



Figure(20): Polymorphisme de l'ADN, généré par deux amorces décimères différentes (amorce G15 et amorce G19), entre les six écotypes d'*O.crenata* (lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6) et *O.aegyptiaca*.

La taille des fragments amplifiés varie de 4099,25 bp à 100 bp, et sur les 120 fragments polymorphiques amplifiés, nous avons noté 39 fragments ou bandes spécifiques bien marquées dont 26 sont spécifiques à *O. crenata* et 13 spécifiques à *O. aegyptiaca*.

Pour chacun des écotypes d'*O. crenata*, nous avons relevé au moins un fragment spécifique (bande unique) dont la taille de ces fragments varie de 300bp à 2960 bp (Tab.9).

3.2.2.1. Variations génétiques intra et interspécifiques révélées par l'analyse RAPD :

Les indices de similarité (Tab.10) montrent la similarité par paire, des génomes d'orobanche testés. Ces derniers varient de 44,1 à 51,4 entre les deux espèces *O. crenata* et *O. aegyptiaca*, et de 73,1 à 89,7 entre les différents écotypes au sein de l'espèce *O. crenata*. Les associations ou « linkage distances » entre les différents génomes, révélées par le WPGAMA cluster analysis, sont représentés par le dendrogramme de la figure (21).

3.2.2.1.1. Variation interspécifique :

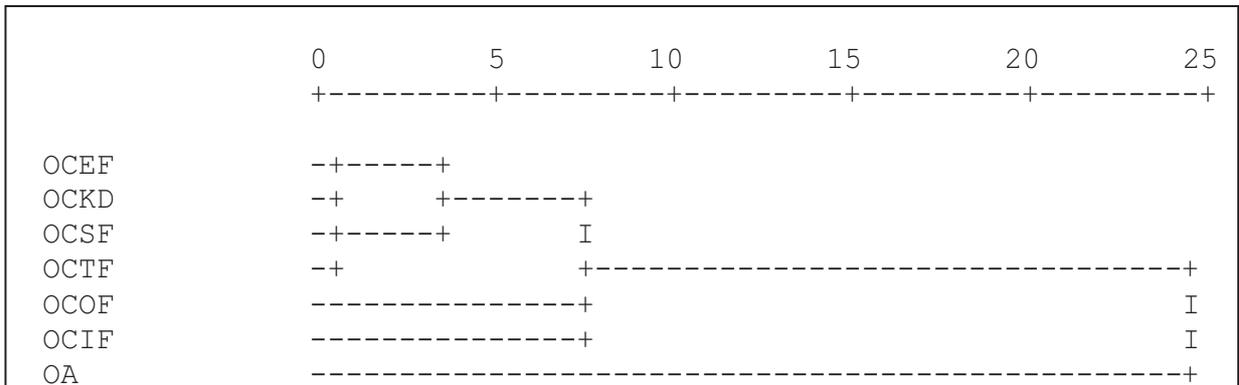
Le polymorphisme génétique interspécifique a été mis en évidence avec les 10 amorces, et sur un total de 144 bandes amplifiées, 83,33% sont polymorphiques. Nous avons relevé 13 bandes (09,08%) spécifiques à *O. aegyptiaca*, 26 bandes (18,05%) spécifiques à *O. crenata* et 24 bandes (16,66%) monomorphiques ou communes aux deux espèces (Tab.11).

Tableau(9):Taille en (bp) des fragments spécifiques amplifiés par les dix amorces utilisées, pour chaque génome étudié, par l'analyse RAPD

Code amorce	Taille des fragments spécifiques amplifiés (bp)						
	OCIF	OCOF	OCEF	OCKD	OCSF	OCTF	OA
OP-B1	-	2000	-	-	-	-	750
	-	-	-	-	-	-	1600
OP-B5	-	-	-	-	-	-	1000
	-	-	-	-	-	-	850
OP-B12	-	-	-	-	650	-	-
	-	-	1072,22	-	-	2960	2900
OP-B13	-	-	-	-	-	-	716,66
	-	-	-	-	-	-	516,66
OP-B18	-	-	-	-	-	1650	500
OP-B20	-	-	-	-	-	2864	2960
OP-C7	-	-	-	300	-	-	400
OP-C9	2000	-	-	-	1600	1650	1144,44
	-	-	-	-	-	-	366,66
OP-G15	-	-	-	-	-	-	-
OP-G19	-	-	-	-	-	-	450

Tableau(10): Matrice des similarités, basée sur les données de la RAPD (WPGAMA, average linkages ,Dice coefficient)

	OCIF	OCOF	OCEF	OCKD	OCSF	OCTF	OA
OCIF	100						
OCOF	77,1	100					
OCEF	79,3	80,2	100				
OCKD	83,1	82,8	89,7	100			
OCSF	73,1	74,2	83,5	85,9	100		
OCTF	73,9	73,8	80,8	84,0	89,0	100	
OA	44,1	47,3	48,8	44,7	50,6	51,4	100



Figure(21): Dendrogramme de la RAPD

Tableau(11): Nombre de fragments communs et spécifiques par espèce et par amorce

Amorce	Nombre de fragments spécifiques		Nombre de fragments communs
	<i>O. crenata</i>	<i>O. aegyptiaca</i>	
	B1	8	
B5	0	3	0
B12	4	0	5
B13	3	3	1
B18	1	1	2
B20	2	1	3
C7	0	1	3
C9	2	2	3
G15	1	0	3
G19	5	1	2
Total	26	13	24

Le dendrogramme généré, indique une distance génétique moyenne importante de l'ordre de (0,521) entre *O. crenata* et *O. aegyptiaca*, ce qui traduit un haut degré de polymorphisme (52,16 %) entre ces deux espèces.

Nous notons trente neuf (39) produits d'amplification polymorphiques qui ont donné des bandes claires, ayant permis d'identifier les deux sections du genre *Orobancha*, la section *Trionychon* Wallr. et la section *Osproléon* Wallr. (Tab.12). La présence ou l'absence de ces produits d'amplification chez l'une ou l'autre des deux espèces, nous a permis entre autre de définir deux grands groupes ou clusters : un premier cluster regroupant les (06) écotypes d'*Orobancha crenata* Forsk. et un second cluster représentant l'espèce ramifiée *O. aegyptiaca* Pers.

En fait, nos résultats corroborent les classifications taxonomiques de Beck Mannagetta (1930); Musselman (1986) sur la base des marqueurs morphologiques ; Abû Sbah et *al.* (1994) sur la morphologie du grain de pollen et Andary (1994) sur la micromorphologie des graines et du pollen du genre *Orobancha*. Selon ces travaux ces deux espèces appartiendraient également aux deux sections différentes, la section *Trionychon* pour l'espèce *O. aegyptiaca* et la section *Osproléon* pour l'espèce *O. crenata*.

Tableau(12): Quelques marqueurs polymorphiques ayant donné des fragments spécifiques utilisés dans la discrimination les deux sections du genre *Orobanche* (Basé sur l'analyse RAPD)

Espèce	OP-B1 750	OP-B5 1600	OP-B12 850	OP-B13 2900	OP-B13 1325	OP-B18 500	OP-B18 400	OP-B20 2960	OP-B20 1000	OP-C7 400	OP-C9 366	OP-C9 1000	OP-G15 850	OP-G19 1650
Section : <i>Trionychon</i>														
<i>O. aegyptiaca</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Section : <i>Osproléon</i>														
<i>O. crenata</i>														
OCIF	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
OCOF	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
OCEF	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
OCKD	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
OCSF	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
OCTF	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+

Par ailleurs, les résultats rapportés par Zeid et al. (1997) sur la variabilité génétique du genre *Orobanche*, indiquent un polymorphisme interspécifique élevé aussi bien entre les espèces *O. crenata* et *O. aegyptiaca* de l'ordre de 77,3%(DG= 0,773) qu'avec les autres espèces étudiées *O. ramosa* et *O. oxyloba*, avec DG=0,763 et DG=0,811 respectivement.

Des résultats similaires ont été obtenus par Paran et al. (1997) sur la variation génétique inter et intraspécifique au sein du genre *Orobanche*, par l'utilisation des marqueurs RAPD. Ces auteurs ont constaté notamment un polymorphisme génétique élevé entre les différentes espèces étudiées.

D'après Zeid et al. (1997), ces résultats peuvent être appuyés par les conclusions de Parker et Riches (1993), concernant le nombre chromosomique des différentes espèces d'*Orobanche*. Il est indiqué que le nombre chromosomique chez l'*O. crenata* est de ($2n=38$) alors qu'il est de $2n=24$ chez l'*O. aegyptiaca*.

3.2.2.1.2. Variation intraspécifique :

Le polymorphisme génétique intraspécifique (ou interpopulation) a été détecté avec les 10 amorces utilisées. Sur un total de 144 bandes amplifiées, 81,94% sont polymorphiques, dont 26 bandes (18,05%) sont spécifiques aux (6) écotypes d'*O. crenata*, et avec au moins une bande spécifique pour chacun des écotypes. Les résultats de l'analyse génétique intraspécifique des (6) populations d'*O. crenata* montrent un niveau de polymorphisme génétique moyen de l'ordre de 19,30%, soit un polymorphisme nettement inférieur au polymorphisme génétique interspécifique (52,16%).

Les indices de similarité varient de 0,731 à 0,897, indiquant un degré élevé de parenté génétique entre les six génomes analysés ; notons que l'hôte n'a aucun effet sur la variabilité génétique de l'espèce parasite dont la distance génétique entre les différents écotypes varie de 0,103 à 0,269.

Zeid et al. (1997), n'ont relevé aucun polymorphisme génétique au sein de 3 écotypes d'*O. crenata* (DG= 0), collectées à travers trois régions d'Egypte. Cet état peut être expliqué par le faible nombre d'écotypes analysé lors de leur étude (3 écotypes seulement). Egalement la faible distance géographique entre chaque écotype, ayant peut être favorisé un grand flux de gènes entre les populations étudiées, ou encore les amorces utilisées dont la séquence n'aurait pas été homologue à celle des sites cibles d'attachement.

Paran et al. (1997) ont rapporté un faible degré de polymorphisme génétique entre 3 populations d'*O. crenata* collectées en Israël (DGM= 0,17). Roman & Rubiales (1999) indiquent aussi une faible distance génétique entre six populations d'*O. crenata* collectées en Espagne, avec une DG maximum = 0,44.

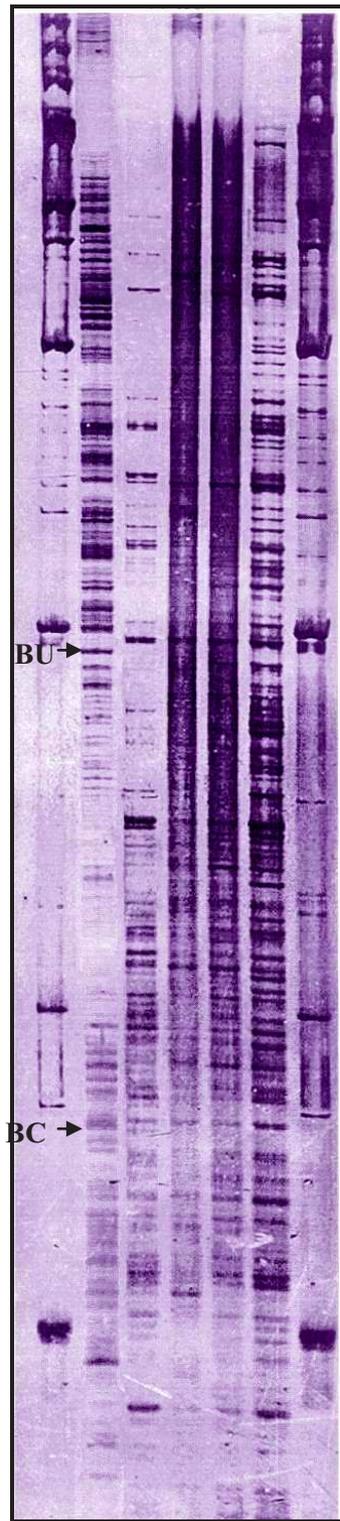
Dans une étude plus récente, Roman et al. (2001) ont révélé aussi l'existence d'un faible polymorphisme génétique au sein des populations d'*O. crenata*. La distance génétique maximale (DG Max.= 0,23) entre les cinq génomes étudiés, a été enregistrée avec une population prélevée sur la vesce sauvage (*Vicia sp.*), où 38,1% des 202 fragments amplifiés étaient présents chez la population attaquant la vesce sauvage et absents chez les quatre autres populations.

Lors de notre étude, nous avons détecté une faible variabilité génétique au sein des différentes populations d'*O. crenata*. Elle peut s'expliquer par l'importance du flux de gènes entre les différentes populations, aidée par une dissémination efficace des graines de la plante parasite par l'homme, les animaux et le vent. Nos résultats sont différents de ceux obtenus par Gagne et al.(1998) avec *O. cumana*, où il a été noté une grande variabilité génétique des différentes populations étudiées, probablement par le fait que l'*O. cumana*, est une espèce autogame alors que l'espèce *O. crenata* est une espèce essentiellement allogame.

Il ne semble pas que l'hôte ait un effet sur la variabilité génétique de l'espèce parasite étudiée. En examinant la matrice de similarité, nous remarquons des indices de similarité élevés (maximum de similarité : 89,7%), qui sont enregistrés avec l'écotype prélevé sur l'hôte *Daucus carota*. En particulier la comparaison des distances génétiques de chacun des écotypes par rapport à l'espèce ramifiée *O. aegyptiaca*, fait ressortir nettement une variabilité génétique effective au sein des différentes populations d'*O. crenata* (DG.Min.= 0,486 ;DG.Max.= 0,558).

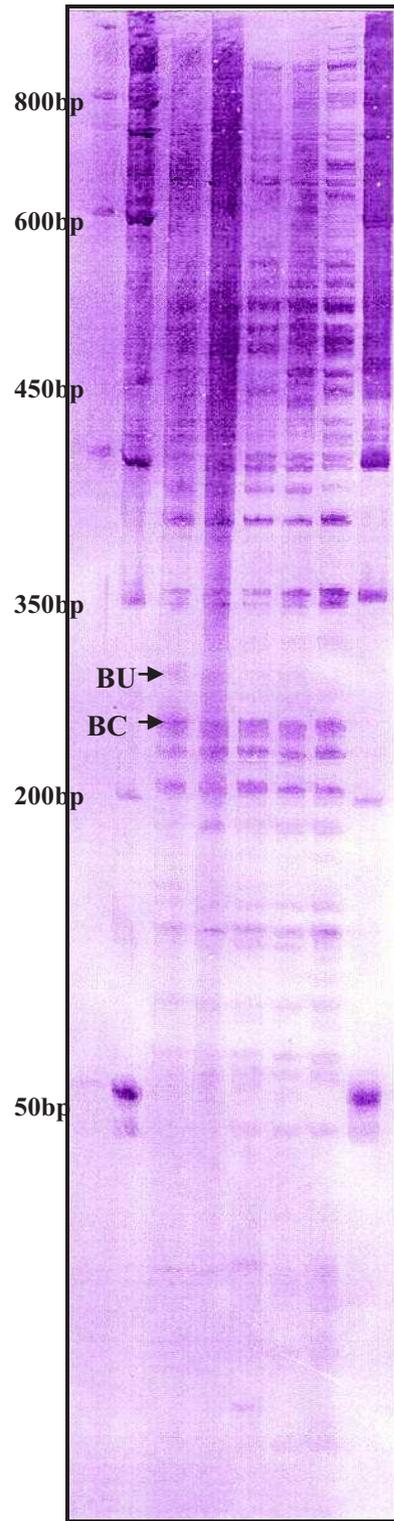
3.2.3. Identification des marqueurs AFLP et analyse des profils électrophorétiques:

Nous précisons que les trois amorces combinées utilisées dans l'analyse, ont généré un total de 429 marqueurs, soit une moyenne de 143 marqueurs par amorce. Nous estimons que le nombre de marqueurs produit est très appréciable vu le faible nombre d'amorces utilisées (03). Ainsi les profils AFLP obtenus sont représentés par les figures (22), (23) et (24), nous



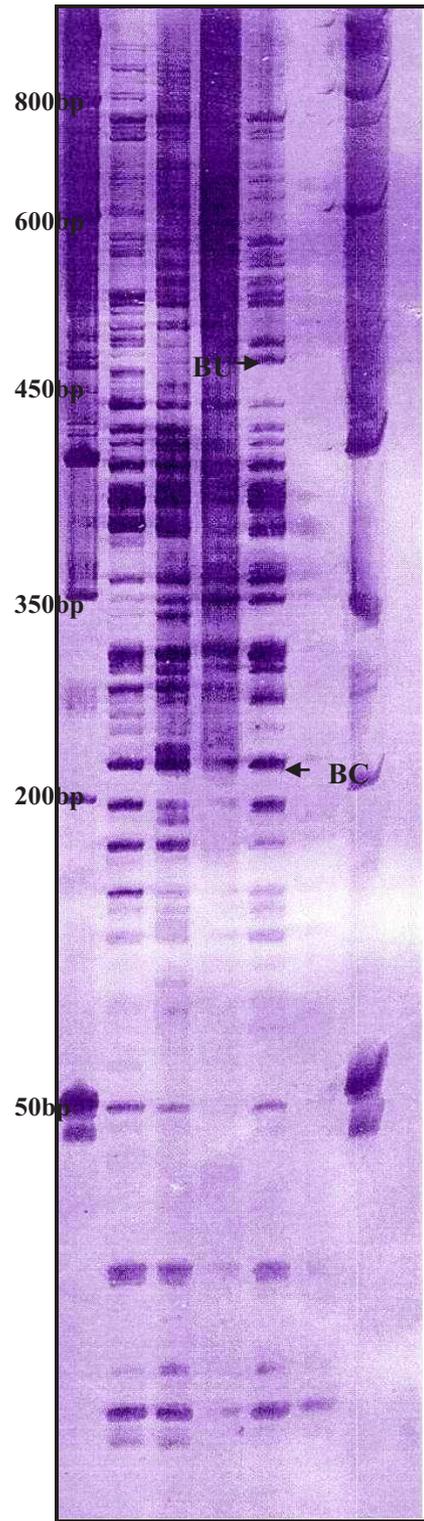
M
OCIF
OCEF
OCKD
OCSF
OCTF
M

Figure (22): Profils générés avec l'amorce *EcoR1-AAC/MseI-CAA*



M
OCIF
OCEF
OCKD
OCSF
OCTF
M

Figure (23): Profils générés avec l'amorce *EcoRI-ACT/MseI-CTC*



M
OCIF
OCEF
OCKD
OCSF
OCTF
M

Figure (24): Profils générés avec l'amorce *EcoRI-AGC/MseI-CTG*

permettent de constater que la taille des fragments amplifiés varie de 27,893 bp avec l'écotype (OCTF)-Amorce combinée (*EcoRI*-AAC/*MseI*-CAA) à 821,250 bp avec l'écotype (OCTF)-Amorce combinée (*EcoRI*-ACT/*MseI*-CTC).

De même, sur les 429 produits d'amplification inventoriés, nous avons relevés 383 fragments polymorphes, ce qui représente un taux de polymorphisme très élevé de l'ordre de 89,27% (Tab.13) et (Fig.25). Egalement, comme le montre le tableau (13), le nombre de fragments varie de (111) fragments amplifiés avec l'amorce combinée *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTC à (192) fragments avec l'amorce combinée *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAA, avec le taux de polymorphisme le plus élevé, de l'ordre de 92,18%.

Tableau(13) :Tableau récapitulatif des marqueurs AFLP

Amorce	Nombre de bandes amplifiées	Nombre de bandes polymorphes	% de polymorphisme
<i>EcoRI</i> -AAC/ <i>MseI</i> -CAA	192	177	92,18
<i>EcoRI</i> -ACT/ <i>MseI</i> -CTC	111	90	83,33
<i>EcoRI</i> -AGC/ <i>MseI</i> -CTG	126	116	92,06
Total	429	383	89,27

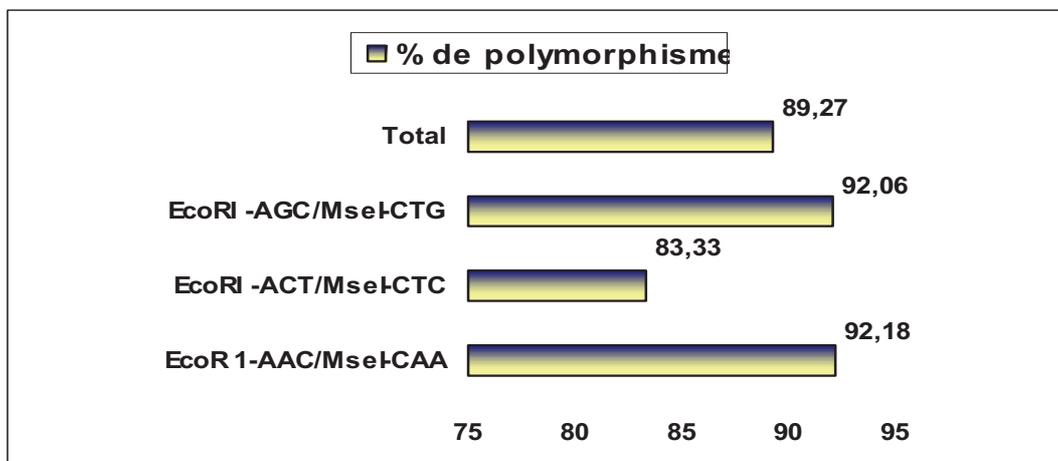


Figure (25): Taux de polymorphisme générés par chaque amorce AFLP

En analysant le nombre de fragments spécifiques et communs amplifiés par amorce (Tab.14), nous relevons un total de 96 fragments spécifiques, soit 22,37% du total des fragments amplifiés. Le nombre de fragments spécifiques le plus élevé de l'ordre de (15), a été enregistré avec l'écotype (OCTF) -Amorce combinée *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTC, alors que le nombre le plus faible (1 fragment) a été enregistré avec l'écotype (OCSF) – Amorce combinée *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTC (Tab.15).

Tableau(14) : Tableau récapitulatif des amplifications spécifiques et communes par amorce

Amorce	Nombre de fragments amplifiés			
	Spécifiques	%	Communs	%
<i>EcoRI</i> -AAC/ <i>MseI</i> -CAA	33	16,14	15	7,81
<i>EcoRI</i> -ACT/ <i>MseI</i> -CTC	20	16,,21	21	18,91
<i>EcoRI</i> -AGC/ <i>MseI</i> -CTG	43	33,,33	10	7,93
Total	96	21,,21	46	10,72

Tableau(15) : Tableau récapitulatif des marqueurs spécifiques par amorce et par écotypes

	<i>EcoRI</i> -AAC/ <i>MseI</i> -CAA	<i>EcoRI</i> -ACT/ <i>MseI</i> -CTC	<i>EcoRI</i> -AGC/ <i>MseI</i> -CTC	<i>Total/écotype</i>
OCIF	11	4	12	27
OCKD	5	4	3	12
OCEF	2	3	5	10
OCSF	3	1	7	11
OCTF	10	6	15	31
Total/amorce	33	20	43	96

Quant aux fragments communs, les cinq écotypes analysés, ont produit 46 fragments communs, soit 10,72% de la totalité des produits d'amplification.

L'indice de similarité varie de 27 à 64,8, indiquant une grande distance génétique entre les écotypes étudiés. Les indices de similarité les plus faibles ont été enregistrés avec l'amorce *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTG, variant de 27 à 57,7, tableaux (16), (17) et (18).

Le dendrogramme correspondant à l'amorce *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAA (Fig.26), classe les cinq (05) écotypes en trois (03) groupes. Un groupe rassemblant les écotypes OCKD et OCEF, un groupe comprenant les écotypes OCTF et OCIF ; l'écotype OCSF est classé dans un groupe à part. L'analyse WPGMA pour l'amorce *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTC, classe également les écotypes étudiés en trois (03) groupes (Fig.27). Un groupe renfermant l'écotype OCSF et OCIF, un autre groupe rassemblant l'écotype OCTF et OCEF, alors que l'écotype OCKD est représenté dans un groupe à part.

La représentation graphique de la matrice de similarité relative à l'amorce EcoRI-AGC/MseI-CTG (Fig.28), classe les cinq (05) populations d'*O. crenata* en quatre (04) groupes. Un groupe associant les écotypes OCKD et OCEF, et trois (03) autres groupes représentant chacun des autres écotypes : OCSF, OCIF et OCTF respectivement.

Tableau(16) : Matrice des similarités de l'amorce *EcoRI-AAC/MseI-CAA*

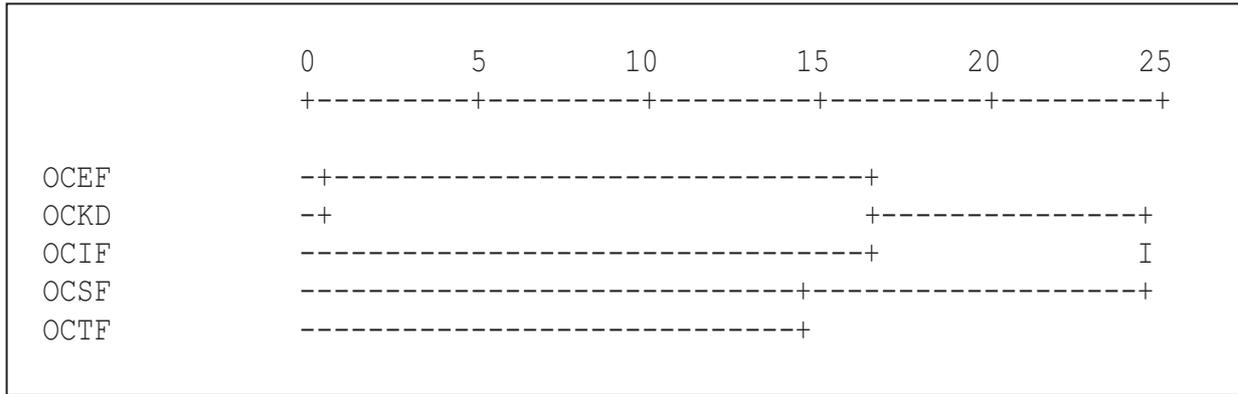
<i>EcoRI-AAC/MseI-CAA</i>					
Ecotype	OCIF	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF
OCIF	100				
OCKD	45,2	100			
OCEF	42,1	50,5	100		
OCSF	37,8	32,2	37,9	100	
OCTF	29,8	43,2	38,1	37,4	100

Tableau(17) : Matrice des similarités de l'amorce *EcoRI-ACT/MseI-CTC*

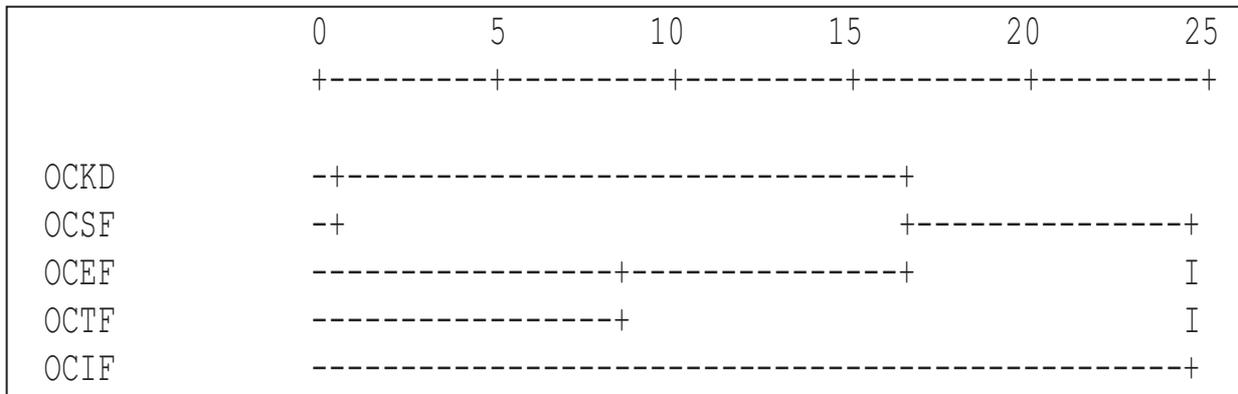
<i>EcoRI-ACT/MseI-CTC</i>					
Ecotype	OCIF	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF
OCIF	100				
OCKD	61,6	100			
OCEF	57,8	55,6	100		
OCSF	62,1	64,8	52	100	
OCTF	54,2	61,4	58,1	54,4	100

Tableau(18) : Matrice des similarités de l'amorce *EcoRI-AGC/MseI-CTG*

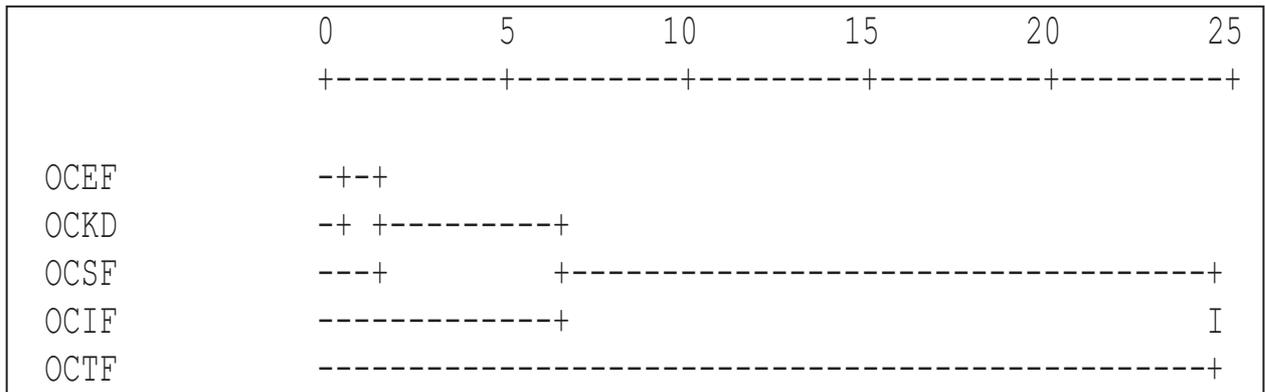
<i>EcoRI-AGC/MseI-CTG</i>					
Ecotype	OCIF	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF
OCIF	100				
OCKD	33,8	100			
OCEF	33,7	54,9	100		
OCSF	27	57,7	52	100	
OCTF	30	56,6	51,3	43,2	100



Figure(26): Dendrogramme généré par l'amorce *EcoRI-AAC/MseI-CAA*



Figure(27): Dendrogramme généré avec l'amorce *EcoRI-ACT/MseI-CTC*



Figure(28): Dendrogramme généré par l'amorce *EcoRI-AGC/MseI-CTC*

Nous remarquons donc que les dendrogrammes des trois amorces, classent les cinq populations de manière différente, ceci révèle une complémentarité des marqueurs générés. Ce résultat est renforcé par l'analyse de la corrélation de Pearson (Tab.19), dont les valeurs sont très faibles (variant de $-0,26$ à $0,38$), indiquant que les informations génétiques apportées par

l'ensemble des marqueurs sont complémentaires au même titre que les résultats de Roldan-Ruiz et al.(2000).

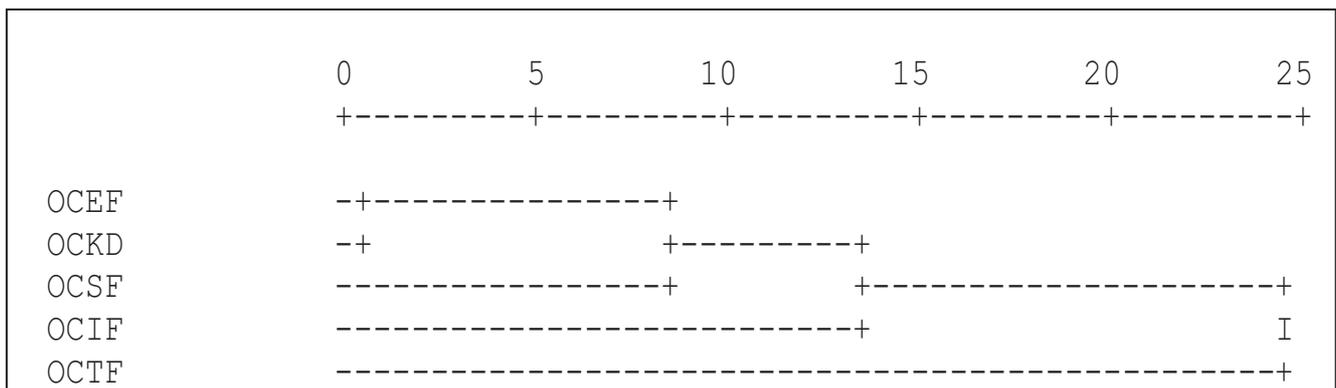
Tableau(19): Coefficient de corrélation de Pearson de la totalité des marqueurs générés par les cinq écotypes.

	OCIF	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF
OCIF	1,000				
OCKD	0,308	1,000			
OCEF	-0,167	-0,025	1,000		
OCSF	0,299	0,387	-0,109	1,000	
OCTF	-0,263	-0,252	0,089	-0,090	1,000

Le Tableau (20), représente les indices de similarités produits à partir des trois matrices des données présence/absence de la totalité des marqueurs générés.

Tableau(20) : Matrice des similarités des marqueurs AFLP combinés

Ecotype	Toutes les combinaisons				
	OCIF	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF
OCIF					
OCKD	60,3				
OCEF	58,6	67,8			
OCSF	56,9	63,1	61,4		
OCTF	50,1	52,7	45,9	55,9	0

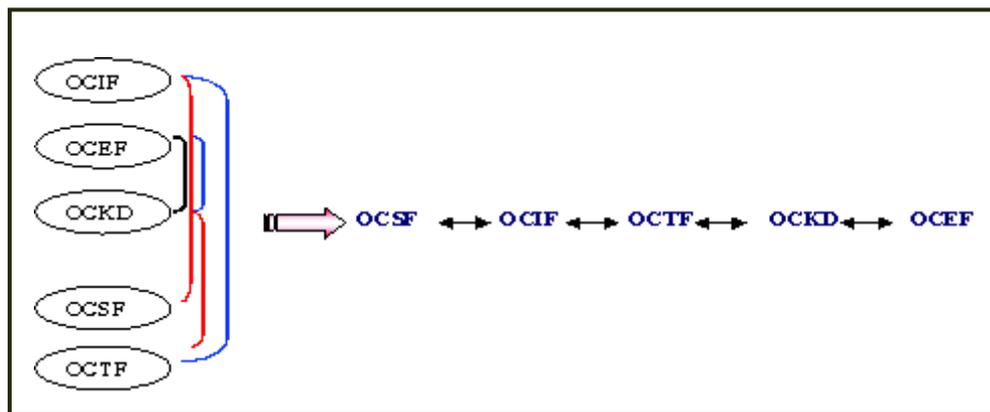


Figure(29): Dendrogramme des trois amorces AFLP combinées.

Le dendrogramme global (Fig.29) de l'ensemble des données AFLP combinées, sépare les cinq (05) génomes d'*O. crenata* en quatre (04) groupes distincts avec un groupe regroupant les deux (02) écotypes de El Arbataache et Khemis El khechna (OCKD et OCEF, respectivement) et

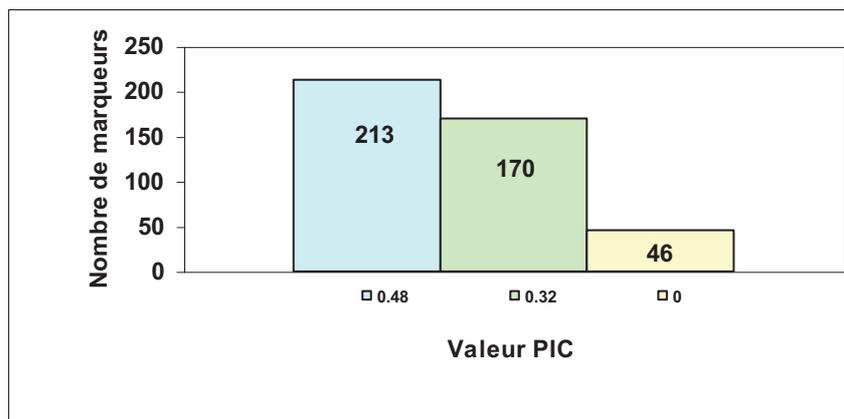
trois (03) autres groupes représentant les écotypes :INA, Staouéli et Tipaza (OCIF, OCSF et OCTF respectivement).

Sur la base de l'analyse WPGMA, la représentation schématique globale des différentes associations pour les cinq populations d'*O. crenata* (Fig.30), montre que chaque écotpe se retrouve associé à l'un ou l'autre des autres écotypes, ce qui suppose l'existence d'une parenté génétique entre les différentes populations. Cette parenté génétique est représentée par des marqueurs communs générés par les trois amorces utilisées. L'utilisation d'un nombre plus élevé d'amorces nous aurait permis très probablement de faire ressortir d'autres associations.



Figure(30): Schéma global des différentes associations AFLP .

Les valeurs du contenu en information polymorphique ou « Polymorphic Information Content 'PIC' » des 429 marqueurs sont représentées dans la figure (31). La valeur PIC de chaque marqueur représente la probabilité de retrouver ce même marqueur dans deux états différents (présent / absent) au niveau des 5 populations analysées.



Figure(31): Représentation graphique des valeurs PIC

Ces valeurs PIC varient de (0) pour les marqueurs monomorphiques (communs) à (0,48) pour les marqueurs présents dans approximativement 50% des populations étudiées, et absents dans le reste (Tab.21).

Tableau (21) : Tableau récapitulatif des valeurs PIC

Valeur PIC	Nombre de marqueurs
0,48	213
0,32	170
0,00	46

En comparant les moyennes des valeurs PIC des 3 amorces, nous remarquons clairement qu'elles sont toutes très élevées, et que l'amorce EcoRI-AAC/MseI-CAA est la plus riche en marqueurs polymorphes. Ceci s'accorde de manière logique avec les taux de polymorphisme enregistrés. Notons que le taux de polymorphisme le plus élevé a été enregistré avec l'amorce EcoRI-AAC/MseI-CAA, où 92,18% des marqueurs sont polymorphes, suivi de l'amorce EcoRI-AGC/MseI-CTC et l'amorce EcoRI-ACT/MseI-CTC.

Les moyennes des valeurs PIC des trois amorces utilisées sont comparables, ce qui nous mène à dire que les profils générés par ces amorces ont apporté approximativement le même taux d'information polymorphique (Tab.22). La moyenne générale de l'ordre de (0,36), obtenue pour les valeurs PIC des 429 marqueurs, démontre une grande richesse en marqueurs polymorphes, comme déjà montré par le taux de polymorphisme (89,27%) (Tab.22, Fig.32). Les résultats de l'analyse de la corrélation de Pearson, indiquent une forte corrélation (0,81) (Tab.23) entre les valeurs PIC et les taux de polymorphisme, ceci confirme les résultats obtenus, sur le grand polymorphisme des profils générés par les trois amorces AFLP.

Tableau(22) : Présentation des valeurs PIC avec les taux de polymorphisme

Amorce	Valeur PIC Moyenne	% Polymorphisme
<i>EcoRI-AAC/MseI-CAA</i>	0,41	92,18
<i>EcoRI-ACT/MseI-CTC</i>	0,36	83,33
<i>EcoRI-AGC/MseI-CTC</i>	0,38	92,06
Moyenne / Total	0,38	89,27

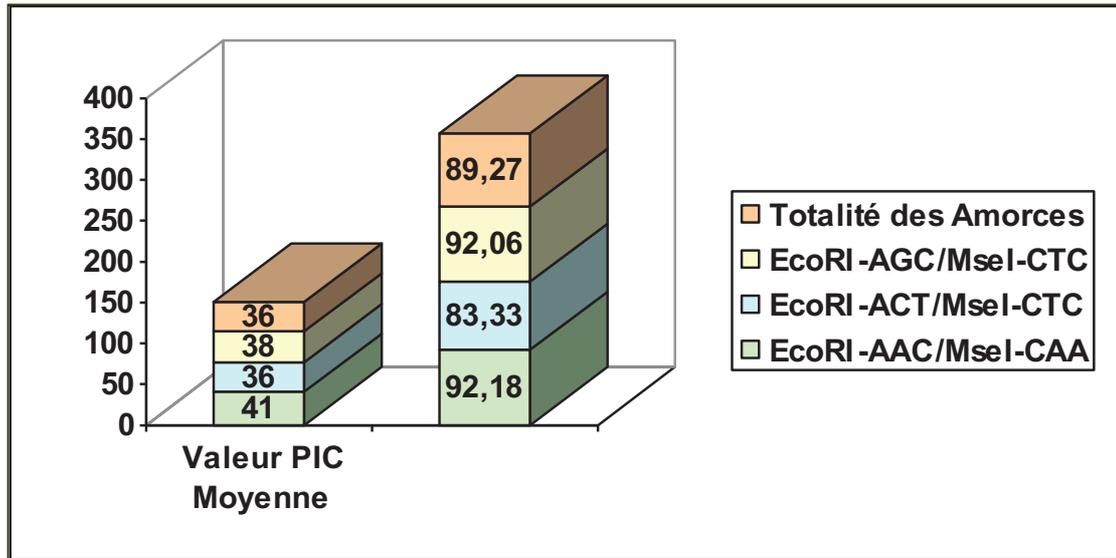


Figure (32): Comparaison des valeurs PIC avec les taux de polymorphisme

Tableau(23) : Coefficient de corrélation de Pearson, entre le taux de polymorphisme et les valeurs PIC des marqueurs AFLP.

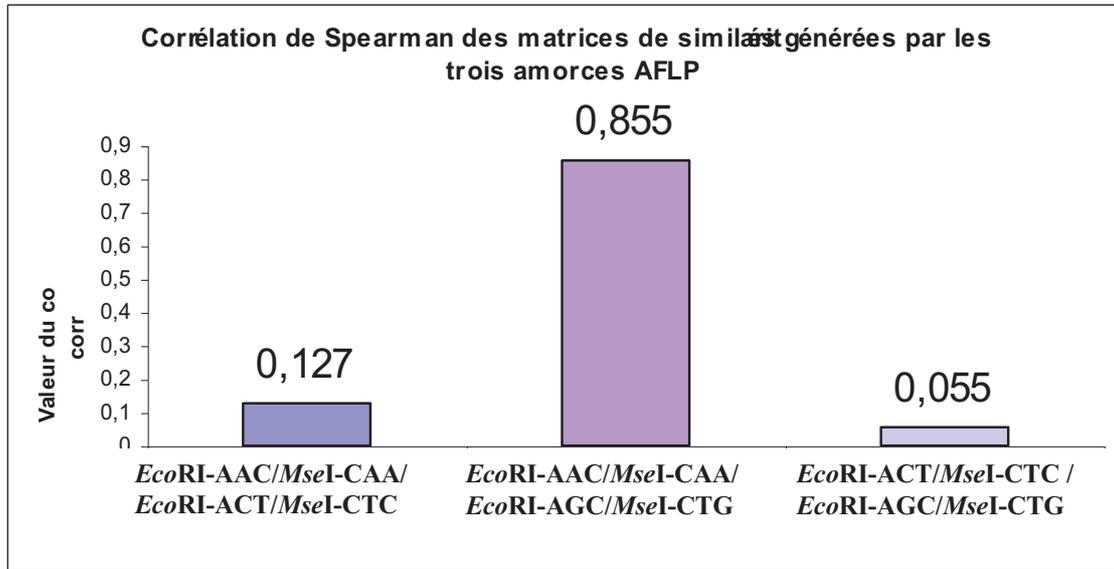
	% Polymorphisme	Valeurs PIC
% Polymorphisme	1,000	
Valeurs PIC	0,810	1,000

Les résultats de la corrélation matrices de similarité des trois amorces par le test de Spearman, (Tab. (24) et Fig. (33)) indiquent que les valeurs de corrélation r , sont relativement faibles. Une très faible corrélation (0,127) entre les résultats de l'amorce EcoRI-AAC/MseI-CAA et l'amorce EcoRI-ACT/MseI-CTC ; la faible corrélation entre l'amorce EcoRI-ACT/MseI-CTC et l'amorce EcoRI-AGC/MseI-CTG (0,055) est également remarquée.

Tableau(24): Coefficient de corrélation de Spearman des matrices de similarité des trois amorces AFLP

Amorce	<i>EcoRI-AAC/MseI-CAA</i>	<i>EcoRI-ACT/MseI-CTC</i>	<i>EcoRI-AGC/MseI-CTG</i>
<i>EcoRI-AAC/MseI-CAA</i>	1,000		
<i>EcoRI-ACT/MseI-CTC</i>	0,127	1,000	
<i>EcoRI-AGC/MseI-CTG</i>	0,855	0,055	1,000

Une forte corrélation est notée entre l'amorce EcoRI-AAC/MseI-CAA et l'amorce EcoRI-AGC/MseI-CTG de l'ordre de (0,85). Il est à rappeler que l'amorce EcoRI-ACT/MseI-CTC a produit le taux de polymorphisme le plus faible (83,33) par rapport aux deux autres amorces et a aussi produit le nombre de bandes le plus faible de l'ordre de (111 bandes) comparée à l'amorce EcoRI-AAC/MseI-CAA (192) et l'amorce EcoRI-AGC/MseI-CTG (126).



Figure(33): Représentation des valeurs du coefficient de corrélation de Spearman r des trois amorces AFLP

Aussi en comparant nos résultats avec ceux d'autres travaux, tel que Gagné et al. (2000), il a été enregistré seulement 259 marqueurs en utilisant le même nombre d'amorces combinées, dans l'étude du polymorphisme génétique chez l'*O. cumana*.

3.2.4. Analyse comparative des deux types de marqueurs :

La RAPD et l'AFLP se sont avérées des techniques efficaces pour la révélation du polymorphisme inter et intraspécifique chez le genre *Orobancha*, mais le degré de résolution dépend de la technique utilisée.

Les valeurs de l'indice moyen de diversité (DI), du ratio de multiplexage effectif (E) et de l'indice marqueur (MI) des deux systèmes marqueurs RAPD et AFLP utilisés dans cette étude, sont très différentes. Nous constatons que les valeurs DI, E et MI avec des valeurs (0,42), (131,66) et (55,3) respectivement concernant l'AFLP, sont supérieures à celles de la RAPD avec des valeurs respectives de (0,19), (12,4) et (2,37) (Tab.25).

Tableau(25): Indice de diversité(DI), ratio multiplex effectif(E) et Indice marqueur (MI) des deux marqueurs RAPD et AFLP

	DI	E ^a	MI ^a
RAPD	0,19	12,4	2,37
AFLP	0,42	131,66	55,3
Ecart	0,23	119,26	52,93

^a les valeurs sont les moyennes des amorces

Ainsi l'AFLP a permis de détecter un degré de polymorphisme plus élevé que la RAPD, clairement indiqué par les valeurs MI (MI-AFLP = 55,3 et MI-RAPD=2,37). Ces résultats sont représentés par les valeurs E, qui tiennent compte de la proportion des loci polymorphes et le nombre total de loci détecté. L'AFLP a donc permis de révéler un nombre de loci plus élevé que la RAPD (Tab.26).

Tableau(26): Analyse des profils générés par la RAD et l'AFLP

Système marqueur	Nombre d'amorces	Nombre Total de bandes	Nombre de bandes(loci) /amorce	Nombre de bandes polymorphes	Nombre de bandes polymorphes /amorce	% de polymorphisme
RAPD	10	144	12,4	120	12	83,33
AFLP	3	429	143	383	127,66	89,27
Ecart	7	285	130,6	263	115,66	5,94

Sur la base des valeurs MI, l'AFLP s'est montré plus efficace que la RAPD dans la révélation de la diversité génétique; ce résultat confirme parfaitement les études antérieures chez d'autres espèces de plantes (Powell et al.,1996; Milbourne et al.,1997 ; Russel et al.,1997 ; Yee et al., 1999 ; Tosti & Negri, 2002).

Les deux techniques ont permis de mettre en évidence un polymorphisme génétique et de différencier les écotypes d'*O. crenata*. En plus l'AFLP a donné une meilleure résolution des profils des génomes étudiés que la RAPD. Ce résultat est lié à l'origine des fragments polymorphiques et à la différence substantielle de la distribution du polymorphisme détecté par l'AFLP contrairement à la RAPD.

Les fragments polymorphiques de la RAPD, sont générés par des oligomères arbitraires qui se sont attachés de manière aléatoire aux sites homologues cibles; le polymorphisme obtenu est

donc basé sur la perturbation ou le déplacement de ces sites et/ou sur la délétion-insertion entre deux sites d'attachement. Le non attachement d'une amorce RAPD, peut se produire et entraîner la non détection d'un point de mutation au niveau du site cible (Neale & Harry, 1994).

Dans le cas de l'AFLP, le polymorphisme génère des mutations des sites de restriction. En d'autres termes, l'AFLP, dont le polymorphisme est généré principalement par les déplacements ou modifications des sites de restriction, est plus sensible que la RAPD. De cette façon, l'AFLP détecte plus de fragments polymorphes que la RAPD. Ainsi, la capacité d'une technique à détecter une variation génétique parmi les populations d'une même espèce, dépend plus de la distribution du polymorphisme que du nombre total de bandes polymorphiques (Yee et al., 1999). Il reste que la grande sensibilité de la RAPD n'a permis de révéler que les grandes ou larges différences entre les écotypes analysés (évidemment distribuées de manière homogène entre génotypes proches), ce qui a conduit à un faible nombre de branchement.

Par ailleurs nous avons noté que le dendrogramme de l'AFLP classe les écotypes de manière différente du dendrogramme de la RAPD, figures (21) et (29). Ce résultat comparable, a été obtenu par Gagné et al (2000) dans l'étude de la diversité génétique chez deux populations d'*O.cumana*, par des marqueurs AFLP et RAPD, dont l'une est originaire de Bulgarie et l'autre originaire d'Espagne. Toutes fois les dendrogrammes générés par les deux techniques étaient différents.

Sur le plan comparatif, le test de corrélation de Spearman a révélé un niveau de corrélation significative de l'ordre de 0.51 entre les résultats de la RAPD et les résultats de l'AFLP, ce indique une concordance du classement hiérarchique des écotypes analysés par RAPD et l'AFLP (Tab.27).

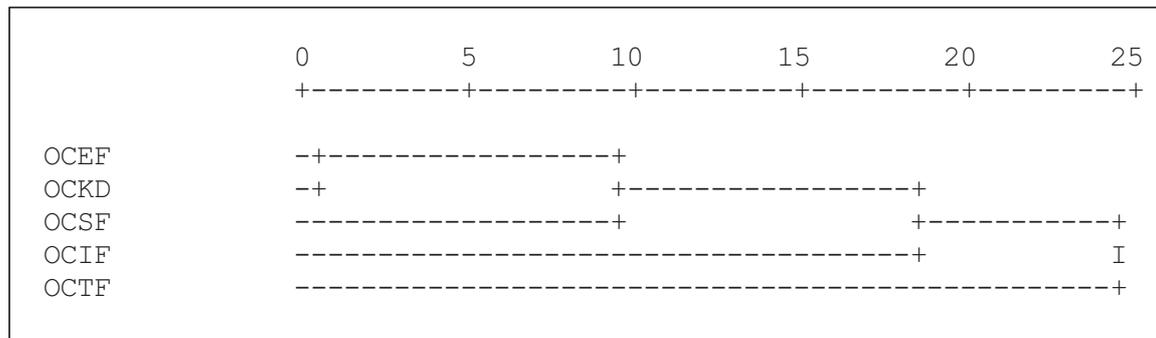
Tableau(27): Coefficient de corrélation de Spearman entre les matrices de similarité de la RAPD et l'AFLP

	RAPD	AFLP
RAPD	1,000	0,510
AFLP	0,510	1,000

De même, les résultats de l'analyse génétique globale (RAPD+AFLP) montrent l'existence d'un polymorphisme génétique (Tab.28, Fig.31). Les distances génétiques varient de 0,38 entre l'écotype de l'INA et celui de Staouéli, à 0,25 entre l'écotype de Khemis El Khechna et celui de El Arbaatache, qui se retrouvent groupés dans un même cluster.

Tableau (28) : Matrice de similarité des données globales RAPD et AFLP

Écotype	OCIF	OCKD	OCEF	OCSF	OCTF
OCIF	0				
OCKD	66,1	0			
OCEF	64,1	74,1	0		
OCSF	61,7	69,4	67,5	0	
OCTF	56,3	62,4	57,4	66,6	0

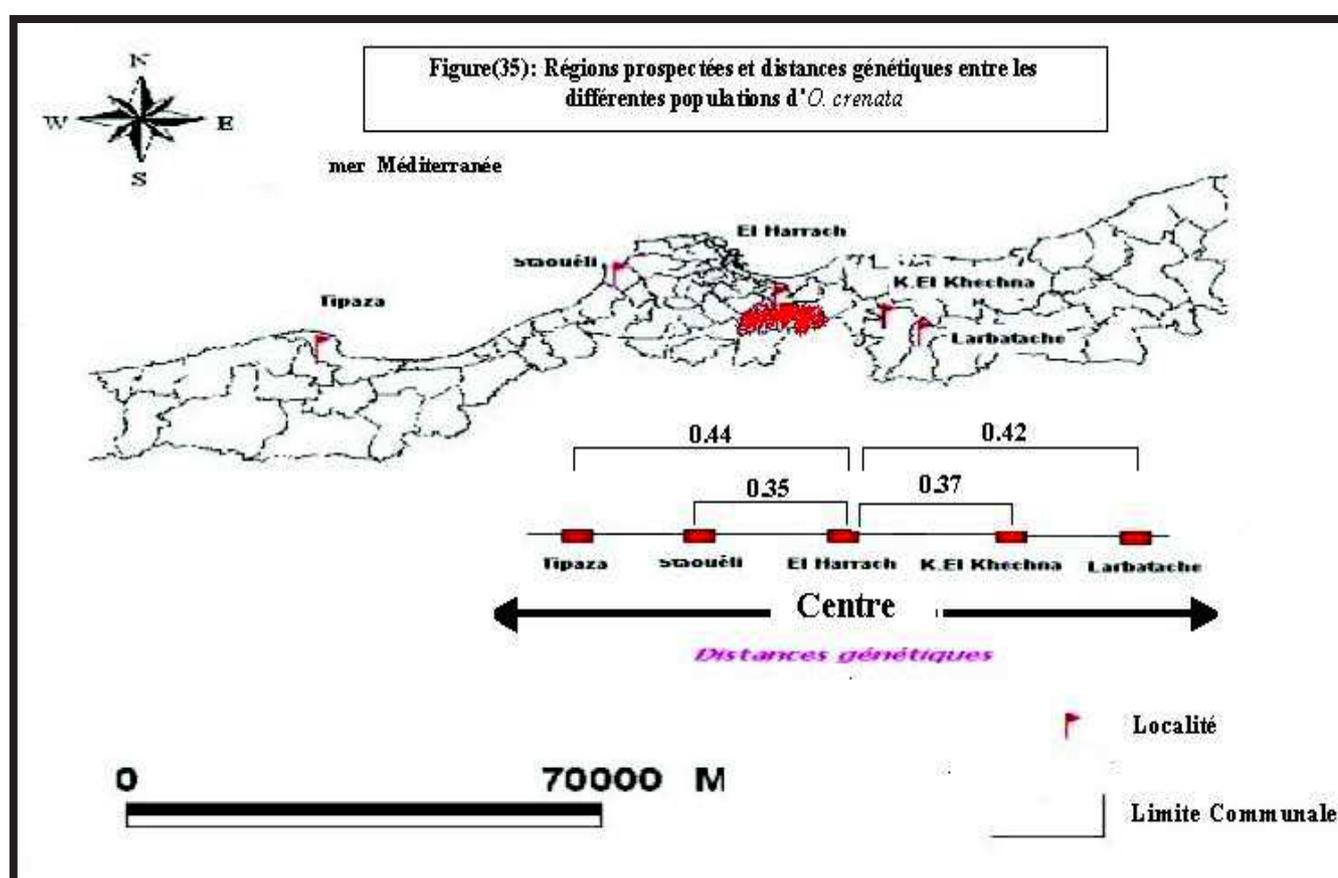


Figure(34): Dendrogramme combiné des profils générés par RAPD et AFLP

Le résultat sur la corrélation des distances génétiques et des distances géographiques est significatif ($r = 0.638$). En effet l'augmentation de la distance génétique est proportionnelle à l'augmentation de la distance géographique, en allant du centre vers le centre Ouest et le centre Est. Les écotypes Est et Ouest sont génétiquement proches, ce qui laisse supposer que le centre de dissémination de cette plante parasite soit fort probablement le centre de la Mitidja. Cette dissémination aurait été favorisée par les échanges de semence de fève, le parcours du bétail et le vent, permettant ainsi un flux de gènes important entre ces différentes localités (Fig.35).

Tableau(29): Distances géographiques (Km) entre les différentes localités de collecte

Localité	Staouéli	Tipaza	Khémis el khechna	Al Erbataache
El Harrach	25	48	18	26



5.

Conclusion Générale

A travers cette étude nous avons pour objectifs:

1.d'identifier le polymorphisme protéique interspécifique, entre les deux espèces *O.crenata* et *O.ramosa*, et le polymorphisme intraspécifique entre huit écotypes d'*O.crenata*, collectés dans quelques localités de l'Est , du centre et de l'ouest de la région de la Mitidja, et ce par l'utilisation de l'électrophorèse des protéines natives des graines de ces deux espèces.

2.d'identifier ou de déceler le polymorphisme interspécifique de l'ADN génomique entre l'espèce *O.crenata* et *O.aegyptiaca* , et le polymorphisme intraspécifique de l'ADN génomique au sein des six écotypes d'*O.crenata*, par l'utilisation de deux techniques de marquage moléculaire de l'ADN à savoir la RAPD et l'AFLP.

3.de détecter quelques marqueurs moléculaires d'ADN chez le genre Orobanche.

4. et de comparer l'efficacité et la performance des deux techniques RAPD et AFLP, dans la détection du polymorphisme intraspécifique de l'ADN génomique des différents écotypes d'*O.crenata* étudiés.

Ainsi, l'électrophorèse des protéines natives des graines d'orobanche en SDS-PAGE, a généré des profils protéiques électrophorétiques relativement similaires entre les différents écotypes d'*O.crenata* analysés. La faible variabilité enregistrée dans ces profils, pourrait être expliquée par l'influence des conditions de l'environnement (conditions climatiques, conditions édaphiques) qui ont conduit à la très faible intensité ou l'absence de certaines bandes chez certains écotypes. Rappelons que Zeid (1997) dans une étude comparable, n'a enregistré aucune variabilité dans les profils protéiques de 3 écotypes d'*O.crenata* collectés dans des localités différentes en Egypte.

Dans notre cas, la comparaison des profils protéiques des huit écotypes d'*O.crenata* avec ceux d'*O.ramosa*, a révélé une différence significative. L'électrophorèse des protéines natives des graines d'orobanche par SDS-PAGE, paraît être une technique efficace pour la distinction interspécifique des espèces d'orobanche.

Le polymorphisme interspécifique et intraspécifique de l'ADN génomique, a été mis en évidence par les deux techniques de marquage moléculaire de l'ADN, la RAPD et l'AFLP.

Au total, 144 marqueurs moléculaires ont été identifiés parmi les six écotypes d'*O.crenata* et l'*O.aegyptiaca*, avec les 10 amorces arbitraires utilisées dans l'analyse RAPD, et à travers lesquelles nous avons pu distinguer les deux sections auxquelles appartiennent les deux espèces, à savoir la section Tryonikon pour l'espèce *O.aegyptiaca* et la section Osproléon pour l'espèce *O.crenata*.

L'analyse RAPD, a révélé notamment une variabilité génétique évidente et notable au niveau inter-espèce, c à d entre l'*O.crenata* et l'*O.aegyptiaca*. Cette analyse a révélé une distance génétique moyenne de l'ordre de 0.17, confirmant les résultats des études antérieures menées par d'autres auteurs. Les collections d'*O.crenata* analysées, ont aussi montré une variabilité génétique assez appréciable et dont les distances génétiques entre les différents écotypes ont varié de 0.103 à 0.269, ce qui est aussi comparable aux résultats d'autres auteurs.

L'analyse de l'ADN génomique par l'emploi de l'AFLP a aussi révélé un polymorphisme notable entre les différents écotypes testés. Au total, 429 marqueurs AFLP ont été générés par 3 amorces combinées, soit une moyenne de 143 marqueurs par amorce, et une meilleure résolution des profils génomiques a été obtenue. Cette technique s'est avérée plus précise et plus sensible que la RAPD dans la détection du polymorphisme entre des génotypes très proches. Elle a permis entre autres de différencier génétiquement les deux écotypes de Staouéli et de Tipaza, regroupés ensemble lors de l'analyse RAPD, mais répartis dans deux clusters différents (mais proches) par l'analyse AFLP.

Nous remarquons aussi que l'utilisation de chacune des trois amorces combinées, classe les écotypes de manière différente par rapport au classement obtenu avec chacune de ces amorces. Ceci est dû au fait que chaque amorce apporte des informations génétiques différentes et précises, selon la nature du polymorphisme détecté par l'AFLP (polymorphisme de sites de restriction). Aussi, l'analyse du dendrogramme de l'amorce combinée ***EcoRI-ACT/MseI-CTC***, montre la séparation des deux écotypes du centre Est, où l'écotype de El Arbaatache se retrouve parmi l'écotype de Staouéli et l'écotype de Khémis el khechna se classe seul dans un cluster à part. Ainsi de nouvelles associations ont pu être notées entre les différents écotypes analysés, par chacune des trois amorces combinées.

Ce regroupement révèle la complémentarité des marqueurs produits par les trois amorces combinées employées dans notre analyse. Des analyses comparables avec différents types de marqueurs ont permis d'obtenir des dendrogrammes différents (Pejic & al.,1998; Bohn & al., 1999).

En effet l'AFLP classe les écotypes différemment de la RAPD ceci a été déjà reporté par d'autres auteurs, notamment Gagné & al. (2000) lors de l'étude de l'*O.cumana*, récoltée en Espagne, et analysée par l'utilisation de la RAPD et l'AFLP, où les dendrogrammes produits par chacune des deux techniques classaient les collections analysées de manière différente, et ceci est principalement du à la nature des marqueurs détectés par chaque technique.

Quant aux valeurs PIC calculées, elles ont montré une grande richesse en information polymorphique chez les différents écotypes analysés. Ce polymorphisme des marqueurs a été aussi, démontré par chacune des amorces combinées, et la corrélation des deux données n'a fait que renforcer ce résultat.

La comparaison des deux approches moléculaires employées dans cette étude, a clairement montré la sensibilité de la technique AFLP par rapport à la RAPD, et a permis de distinguer séparément les écotypes analysés, (excepté pour les écotypes centre-Est, de Khemis El Khechna et de El Arbaatache où ces derniers se retrouvent classés ou rassemblés dans un même cluster). En effet chaque écotype a été classé individuellement dans un cluster à part, contrairement aux résultats de la RAPD où les écotypes du centre-Ouest, de Staouéli et Tipaza ont été classés ensemble sous un même cluster ou groupe.

En conclusion, la détection de la variabilité génétique au niveau génomique, par l'utilisation de ces techniques moléculaires, offre plusieurs avantages. Cette variabilité peut être quantifiée et n'est pas soumise à l'influence des conditions de l'environnement (Kazan & al.,1993). Nos résultats indiquent que ces techniques moléculaires sont efficaces pour l'identification des espèces d'orobanche, même au niveau population, et ce même sous leur forme déshydratée (graines sèches).

Dans le cas où l'objectif principal d'une étude génétique est la discrimination inter-espèces, la RAPD apparaît la meilleure alternative, car elle offre une bonne discrimination en un temps court et à un coût moindre. Par contre, si l'objectif de l'étude est de différencier des génomes

proches, qui probablement partagent un pool génétique similaire, l'AFLP apparaît plus efficace et plus puissante, mais elle reste plus coûteuse et plus laborieuse que la RAPD.

Néanmoins, la technique RAPD semble avoir des limites, puisqu'elle produit des marqueurs dont l'identification est basée sur la variabilité du poids moléculaire plutôt que sur la variabilité dans la séquence de l'ADN matrice. La meilleure façon pour mettre en évidence le polymorphisme de séquence, serait de soumettre ces marqueurs à un Southern blotting. Il serait alors intéressant d'employer ces techniques afin de détecter des marqueurs moléculaires liés aux gènes d'agressivité, et d'identifier aussi des marqueurs liés aux gènes de résistance au niveau de la fève, afin de produire des variétés de fève résistantes à ce parasite.

L'analyse globale de la totalité des marqueurs, a montré une augmentation de la distance génétique proportionnelle à la distance géographique, en allant du centre vers le centre Est et le centre Ouest, il est donc fort probable que le centre de dissémination de cette plante parasite serait le centre de la Mitidja. Des études plus approfondies sur un nombre d'écotypes plus étendu, pourraient confirmer ou infirmer l'origine du centre de dissémination de cette plante parasite.

6.

Références Bibliographiques

Aalders, A.J.G., and Pieterse, R. 1985. *In vitro* testing with 2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) of *Orobanche crenata* seed metabolism. *FABIS Newsletter*, 13:35-37.

Aalders, A.J.G., and Pieterse, R. 1986. Plant vigor as a misleading factor in the search for resistance in broad bean to *Orobanche crenata*. In S.J. Ter Borg(ed.). Proc. Workshop on Biology and control of *Orobanche*. Wageningen, The Netherlands. pp.140-149.

Abdalla, M.M.F., and Darwish, D.S. 1994. Breeding faba bean for *Orobanche* tolerance at Cairo University. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. Ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.450-454.

Abû Sbaih, H., Keith-Lucas, D. M., Jury, S.L., Harborne, J.B., and Tubaileh, A.S. 1994. Pollen morphology of the genus *Orobanche* (Orobanchaceae). In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.112-118.

Abu-Irmalah, B.E. 1994. Overview of the *Orobanche* problem in the Near East . In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. Ter Borg (eds.). Biology and Management of orobanche. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.677-683

Adawy, M.S. 1998. Identification of molecular markers for assessment of genetic variation and genome mapping in *Brassica napus* L. PhD Thesis.Fac.Agr. Cairo University. Egypt. 173p.

Ait- Abdallah, F., et Hamadache, A. 1996. Effet de la date de semis, de la variété et de l'utilisation du glyphosate sur le contrôle de l'*Orobanche* chez la fève (*Vicia faba* L.) dans une zone sub-humide. *Céréaliculture*. N 29-Décembre 1996. pp.21-26.

Ait Abdallah, F., Hammadache A., Kheddami M., et Maatougui M.E. 1999. Le problème de l'*Orobanche* en Algérie. pp.17-25. In J. Kroschel, M. Abderahibi, H. Betz (eds.), Advances in Parasitic Weed Control at On Farm Level. Vol. II. Joint Action to control *Orobanche* in the WANA Region. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany.

Al-Manoufi, O.A. 1994. The *Orobanche* problem and management in Egypt. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. Ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd

Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.663-671.

Andary, C. 1994. Chemotaxonomical study of the genus *Orobanche*. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.121-130.

Antonova, T.S. 1994. Biochemical aspects of the development of new virulent forms in the Moldavian population (race C) of *Orobanche cumana* Wallr. Against the background of resistant sunflower cultivars. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. Ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.290-294.

Beck Von Mannagetta, G. 1930. *Orobanchaceae*. In A. Engler (ed). *das Pflanzenreich* 96 (IV.261). Germany, Wilhem Engelmann . p.1-348.

Beckmann, J.S., Soller, M. 1983. Restriction Fragment Length Polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and cost. *Theor. Appl. Genet.*, 67:33-43.

Beilin, I.G. 1968. Flowering hemiparasites and parasites. Nauka, Moskva, p.120. Ann.Bibl.23.

Benharrat, H., Delavault, P., Théodet, C., Figureau, C., and Thalouarn, P. 2000. RbcL plastid pseudogene as a tool for *Orobanche* (subsection *minores*) identification. *Plant Biol.*2:34-39.

Benharrat, H., Théodet, C., Véronési, C., and Thalouarn, P. 2001. broomrape identification using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). Application to *Trionychon* Wallrs and *Osproleon* section species. In : A. Fer, P. Thalouarn, D.M. Joel, L.J. Musselman, C.Parker and J.A.C. Verkleij (eds.). Proc. Of the 7th International Parasitic Weed Symposium, Nantes, France, June. pp79.

Bharathalakshmi, C.R. Werth, and Musselman, L.J. 1990. A study of genetic diversity among host-specific populations of the witchweed (*Striga hermonthica*) (Del) Benth (Scophulariaceae) in Africa. *Plant Systematics and Evolution*, 17:1-12.

Bohn, M., Utz, H.F. and Melchinger, A.E. 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars, determined on the basis of RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.* 39: 228-237.

- Bostein, D., White, R.L., Skolnic, M., Davis, R.W. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet.* 32 : 314-31.
- Bouznad, Z., Porta-Puglia, A., Tivoli, B., Kharrat, M., Di Vito, M., Rubiales, D., Larbi, M., & Meskine, M. 2001** Contraintes biotiques des légumineuses alimentaires dans le bassin méditerranéen : état des problèmes, principaux parasites et pertes de rendements. In : Faba bean and other grain legumes in today's agriculture : biotic constraints and integrated regional strategy. Proceedings of the Legumes workshop « Grain Legumes in the Mediterranean Agriculture ». 25-27 October, Rabat, Morocco. pp. 27-36
- Bretting, P.K., Widrechner, M.P. 1995.** Genetic markers and plant genetic resource management. In : Janick J, ed. *Plant Breeding Reviews*, Vol. 13. New York : John Wiley & Sons Inc, 1995 : 11-86.
- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. 1997.** DNA markers. New York : Wiley-VCH Inc.364 p.
- Chabroilin, C. 1934.** La germination des graines d'*Orobanche*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences (France), 198: 2275-2277.
- Chater, A.O., and Webb, D.A. 1972.** *Orobanche*. 3:286-293. In T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burgess, S.M. Walters and DA Webb(eds.). *Flora Europea*. Cambridge Univ. Press.
- Christmann, 1960.** Plantes parasites. Paris, France.
- Cubero, J.I. 1973.** Resistance to *Orobanche crenata* Forsk. In *Vicia faba* L. pp.205-217. In Proc. EWRC Symp. on parasitic weeds, Malta. Wageningen, The Netherlands-European Weed Research Council.
- Cubero, J.I. 1991.**Breeding for resistance to *Orobanche* species: A review. p.257-277. In K.Wegmann and L.J.Musselman (eds.). Progress in *Orobanche* Research. Ederhard-Karls-Universitat, Tubingen, FRG.
- Cubero, J.L. 1994.** Breeding work in Spain for *Orobanche* resistance in faba bean and sunflower. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.465-476.
- Cubero, J.I., and Hernandez, L. 1991.** Breeding faba bean (*Vicia faba* L) for resistance to *Orobanche crenata* Forsk. pp.51-57. In J.I. Cubero and M.C. Saxena (eds.). Present status and future prospects of Faba Bean production and improvement in the Mediterranean countries. Zaragoza, Spain.

- Cubero, J.I., and Moreno, M.T. 1979.** Agronomic control and sources of resistance in *Vicia faba* to *Orobanche crenata*. p.41-80. In D.A.Bond, G.T. Scarascia-Mugnozza and M.H. Poulsen (eds.)
- Cubero, J.I., Moreno, M.T., et Martin, A. 1979.** Meiotic behavior in *Orobanche crenata* Forsk. p. 73-78. In L.J. Musselman, A.D. Worsham and R.E. Eplee (eds.) Proc.2nd Symp. On Parasitic weeds. Raleigh, USA, North California State University.
- Cubero, J.I., Pieterse, A.H., Khalil, S.A., et Sauerborn, J. 1994.** Screening techniques and sources of resistance to parasitic angiosperms. *Euphytica*, 73: 51-58.
- Cubero, J.I., and Rodriguez, M.F. 1999.** Resistance to *Orobanche* : Genetics and breeding. pp.17-24. In J.I. Cubero, Moren, M.T., Rubiales, D. and Sillero, J.(eds.). Resistance to *Orobanche*: The status of the art. Congresos Y Jornadas 51/99.
- De Vienne, D. 1998.** Marquage des gènes majeurs. In : De Vienne D, ed. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Paris : INRA Editions, 1998 : 81-7.
- De Vienne, D., et Santoni, S. 1998.** Les principales sources de marqueurs moléculaires. In : De Vienne D, ed. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Paris : INRA Éditions1998 : 15-47.
- Delavault, P., Sakanyan, V., and Thalouarn, P. 1995.** Divergent evolution of two plastid genes, *rbcL* and *atpB*, in a non-photosynthetic parasitic plant. *Plant Molecular Biology* 29: 1071-1079.632
- Dhanapal, G.N., Struik, P.C., Udayakumar, M., & Timmermans, P.C.J.M. 1996.** Management of broomrape (*Orobanche* spp.) – A review. *J. Agronomy & Crop Science* 175 : 335-359
- Donini, P., Elias, M.L., Bougourd, S.M., Koebner, R.M.D. 1997.** AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome*.40 : 521-6.
- Doyle, F.J., and Doyle, J.L. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 :13-15.
- Duc, G. 1997.** Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*, 53 : 99-109
- Ducellier, L., et Maire, R. 1923.** Végétaux adventices observés dans l'Afrique du Nord. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord.* 14,304-325.
- Elia, M. 1964.** Indagini preliminari sulla resistana varietale della Faba all' orobanche. *Phytopathologica Mediterranea*, 3:31-32.

- El-Khishine, D. 1998.** Genetic studies in some higher plants using molecular markers. PhD. Thesis. Fac. Agr. Ain Shams University. Cairo. Egypt.110p.
- Feliachi, K. 2002 .** Proceedings du 2ème Séminaire du Réseau REMAFEVE / REMALA, "Le Devenir des Légumineuses Alimentaires dans le Maghreb", Hammamet, Tunisie. pp.32-39.
- Fischbeck, G., Abdalla, M.M.F., Metwally, A.A., and Darwish, D.S. 1986.** Variation of *Vicia faba* L. genotypes and populations of *Orobanche crenata* Forsk. pp.449-514. In Proc.2nd Agron. Conf. Vol. 2, Alex., Egypt.
- Gagne, G., Roeckel-drevet, P., Grezes-besset, G., Shindrova, P., Ivanov, P., Crand-ravel, C., Vear,F., Tourvieille de labrouhe, D., Charmet, G., and Nicolasi,, P. 1998.** Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries.Theor.Appl.Genet.96:1216-1222.
- Gagne, G., Roeckel-drevet, P., Grezes-besset, G., Shindrova, P., Ivanov, P., Crand-ravel, C., Vear, F., Charmet, G., and Nicolasi, P. 2000.** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) as suitable markers to study *Orobanche cumana* genetic diversity. *Journal of Phytopathology*.148,457-459.
- Garcia Torres, L. 1993.** Atelier plantes parasites, FAO, Aman, Jordanie.
- Garcia-Torres, L. 1994.** Progress in *Orobanche* control, an overview. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.390-399
- Gardiner, S.E., and Forde, M.B. 1992.** Identification of cultivars of grasses and forage legumes by SDC-PAGE of seed proteins. pp.43-61. In H.F. Linskens and J.F. Jackson (eds.). *Seed analysis, Modern methods of plant analysis Vol.14*. Springer-Verlag Publishers, Berlin.
- Georguieva, I., et Edreva, A. 1994.** Chemotaxonomical study of the variability of *Orobanche* on tobacco in Bulgaria . In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.127-131
- Hammad, S., Elarosi, H., and Al-Manoufi, O. 1967.** *Phytomiza orobanchia* Kalt. Feeding on *Orobanche crenata* Forsk. In Egypt (Diptera;Agromyzidae). *Bulletin de la société Entomologique d'Egypte* 51: 141-144.

- Harris, H. 1969.** Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. Edinburgh. Sect.B.164*: 298-310.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., and Nienhuis, J. 1986.** Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 72: 761-769.
- Hernandez, L. 1987.** Genetica de la resistencia de *Vicia faba* L. à *Orobanche crenata* Forsk. PhD. thesis, Universidad de Cordoba, Spain.
- Jacobsohn, R. 1994.** The broomrape problem in Israel and an integrated approach to its solution. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on Orobanche and related Striga research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.652-658.
- Joel, D.M., Portnoy, V., and Katzir, N. 1998.** Use of DNA fingerprinting for soil-borne seed identification. *Aspects of Applied Biology* 51:23-27.
- Katzir, N., Portnoy, V., Tzuri, G., Castejon-Munoz M., Joel D.M. 1996.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the study of the parasitic weed *Orobanche*. *Theor. Appl. Genet* 93: 367-372.
- Kazan, K., Manners, J.M., and Cameron, D.F. 1993.** Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determines using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 85:882-888.
- Khalaf, K.A. 1991.** Determination of the viability of different *Orobanche crenata* seed origins, in relation to their metabolic germination activity. In K.Wegmann and L.J. Musselman (eds.) *Progress in Orobanche Research*. Eberhard-Karls-Universitat, Tübingen, FRG,1991. pp.102-109.
- Khalaf, K.A. 1992.** Evaluation of the biological activity of flax as a trap crop against *Orobanche* parasitism of *Vicia faba*. *Trop. Agric. Trinidada*, 69:35-38.
- Khalaf, K.A., and F.I. El Bastawesy, F.I. 1989.** Some studies on the basis of resistance of *Vicia faba* cultivar "GIZA 402" to *Orobanche crenata* parasitism. *FABIS News Letter*, 25:5-9.
- Khaldoun, S. 2001.** La production de semences de légumineuses alimentaires; contraintes et mise en œuvre d'un programme de relance. Atelier National sur les Légumineuses Alimentaires, Alger du 23 au 25 Avril 2001.

- Khalil, S., and Erskine, W. 1999.** Breeding for resistance in faba bean and lentil. pp.63-76. In J.I. Cubero, Moren, M.T., Rubiales, D. and Sillero, J.(eds.). Resistance to *Orobanche*: The status of the art. Congresos Y Jornadas 51/99.
- Khalil, S.A., Saber, H.A., El-Sherbeeney, M.H., El-Hady, M.M., and Saleeb, S.R. 1994.** Present state of *Orobanche* resistance breeding in faba bean in Egypt. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J.ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.455-464.
- Kharrat, M., Dahmane, A.B.K., Bouhgalleb, N., halila, M.H., and Khadrui, Y. 1993.** (paper presented at the International Workshop on Management of parasitic weeds, Amman,1993).
- Kharrat, M., Halila, M. H. 1997.** Control of *Orobanche foetida* on *Vicia faba*: comparaision between different control measures. In Advances in parasitic plants research. (M.T. Moreno and J.I. Cubero eds). Junta de Andalucia. Proceedings of the Sixth International Parasitic Weed Symposium. Cordoba (Spain), 16-18 April 1996. pp.733-738.
- Kharrat, M., Halila, M.H., and Beniwal, S.P.S. 1994.** Parasitism of two faba bean varieties as affected by different seed inoculum levels of *Orobanche crenata* and *O.foetida*. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.342-348.
- Klein, O. 1995.** Untersuchungen zur Populations dynamik und Verwendung von *Phytomyza orobanchia* in der biologischen Bekämpfung von *Orobanche* spp. In Marokko, Diploma thesis, University of Hohenheim, Institut für Pflanzenproduktion in den Tropen und Sutropen, 99p.
- Kreutz, C.A.J. 1995.** Orobanche In central and Northern Europe. A field guide. Natuur Historisch Genootschap in Limburg Ed. Vol. (I).159p
- Krishna Murty, G.V.G. 1994.** *Orobanche* problem and management in India. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.591-598.
- Krishna Murty, G.V.G., and Raju, C.A. 1994.** Effects of solarization on the gernamibility of broomrape seeds (microplot sutdy). In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.).

Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.493-495.

Laemmeli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 22: 680-685.

Lewontin, R.C., and Hubby, J.I. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54:595-609.

Linke, K.H. 1992. Biology and control of *Orobanche* in Legume Crops. Koch W., Walter H., Sauerborn J. 'ed.). *Plits* 10 (2).62p.

Linke, K.H., and Saxena, M.C. 1991. Study of variability and longevity of *Orobanche* seed under laboratory conditions. In K.Wegmann and L.J.Musselman (eds.). *progress in Orobanche Research*. Ederhard-Karls-Universitat, Tubingen, FRG. pp.110-114.

Ljubenova, A., and Minkov, I. 1998. Five *Orobanche* ecotypes-what's the difference?. In: K. Wegmann, L.J. Musselman, and D.M., Joel (eds.). *Current problems of Orobanche Researches*, Proceedings of the 4th International workshop on *Orobanche*. Albena, 23-26, September, Bulgaria (1998): 125-133.

Lopez-Bellido-Garrido-Rj, Lopez-Bellido-Lso. 2001. Effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil nitrate and wheat yield under rainfed Mediterranean conditions. *Agronomie*, 21: 6-7, 509-516

Mahmoudi, P. 1993. L' *Orobanche* à Ain dem. *El Djadid* 5:4-6.

Maire, 1939. Mission scientifique du Hoggar. Etudes sur la flore et la végétation du Sahara central. 3^{ème} partie. Mém. Soc. Hist. Nat. Afrique du Nord. pp.275-433.

May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes in molecular genetic analysis of populations: A practical approach, Hoelzel, A.R. (ed). IRI. Press, Oxsford. pp.1-27.

Mesa Garcia, J., and Garcia-Torres, L. 1986. Effect of planting date on parasitism of broad bean (*Vicia faba*) by crenate broomrape (*Orobanche crenata*). *Weed Science*, 34,544-550.

Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., and col. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3: 127-136.

- Milbourne, D., Meyer, R.C., Collins, A.J., Ramsay, L.D., Gebhardt, C., Waugh, R. 1998.** Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet*, 259 : 233-45.
- Moreno, M.T., Cubero, J.I., and Martin, M. 1979.** Meiotic behavior in *Orobanche crenata*. p.73-78. In L.J. Musselman, A.D. Worsham and R.E. Eplee (eds.) Proc. 2nd Symp. On Parasitic weeds. Raleigh, USA, North California State University.
- Mullis, K., Faloona, S., Schrf, S., Saski, R., Horn, G., and Erlich, H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273.
- Murdoch, A.J., and Ellis, R.H. 1992.** Longevity, viability and dormancy. pp.193-229. In M. Fenner (ed.) *The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. Wallingford, UK, C.A.B. International.
- Murphy, R.W., Sites, J.W., Buth, D.G., and Haufler, C.H. 1990.** Proteins I: Isozyme electrophoresis in molecular systematics. Hillis, D.M., and Moritz, C. (eds). Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp.45-126.
- Musselman, L.J. 1986.** Taxonomy of orobanche. In S.J. ter Borg (ed.). Proceedings of a workshop on biology and control of *Orobanche*. LH/VPO, wageningen, the Netherlands. pp.2-10.
- Musselman, L.J. 1994.** Taxonomy and spread of *Orobanche*. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.27-35.
- Musselman, L.J., and Parker, C. 1982.** Preliminary host ranges of some strains of economically important broomrapes (*Orobanche*). *Economic Botany*, 36:270-273.
- Musselman, L.J., Parker, C., and Dixon, C. 1982.** Notes on autogamy and flower structure in agronomically important species of *Striga* (Scophulariaceae) and *Orobanche* (Orobanchaceae). *Beitrag zur Biologie der Pflanzen*, 56:329-343.
- Musselman, L.J., Bharathalakshmi, S.B. Safa, Knepper, D.A., Mohamed, K.I., and White, C.L. 1991.** Recent research on the biology of *Striga asiatica*, *S.gesnerioides* and

S. hermonthica. In S.K. Kim(ed.). Combating *Striga* in Africa. Proc. Inter. Workshop IITA.Ibadan, Nigeria IITA. pp.31-41.

Nassib, A.M., Ibrahim A.A., and Saber, H.A. 1978. Broomrape (*Orobanche crenata*) resistance in broad beans. In Proceedings ICARDA Workshop "Seed Legumes". Aleppo, Syria, ICARDA. pp.133-135.

Nassib, A.M., Ibrahim, A.A., and Saber, H.A. 1979. Broomrape (*Orobanche crenata*) resistance in broad beans : Breeding work in Egypt. In G. Hawtin and G.C. Chancellor (eds.). Food Legume Improvement and Development. Proc. of a workshop held at the University of Aleppo, Syria. pp.133-135.

Nassib, A.M., Hussein, A.H.A., el-Deeb, M.A., and Mosa, M. 1990. In: Nile Valley Regional program on Cool Season Food Legumes and cereals in Egypt, 1989/1990 Annual Report. Aleppo, Syria, ICARDA. pp.5-7.

Nassib, A.M., Hussein, A.H.A., saber, H.A., and El-Deeb, M.A. 1992. Effect on N,P and K nutrients with a reduced rate of Glyphosate on control and yield of faba bean in Middle Egypt. *Egyptian Journal of Applied Sciences* 7: 720-730.

Nassib, A.M., A.H.A. Hussein and M.A.El-Deeb.1993. Faba bean pilot demonstration plots on *Orobanche* control in middle Egypt. In Proceedings of the 18th International Conference for Statistics, Computer Science, Social and Demographic Research. Cairo, Egypt, Ain Shams University. pp.133-142.

Neale, D.B., and Harry, D.E. 1994. Genetic mapping in forest trees: RFLPs, RAPDs and beyond. *Ag. Biotech. News Inf.* 6: 107N-114N.

Nelson, J.C., Sorrels, M.E., Van deynze, A.E., et al. 1995. Molecular mapping of wheat : major genes and rearrangements in momoelogenous groups 4, 5 and 7. *Genetics.* 141 : 721-31.

Olson, M., Hood, L., Cantor, C., Doststein, D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science.*254 : 1434-1435.

Osborn, T.C., Alexander, D.C., and Fobes, J.F. 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. *Theo. Appl. Genet.* 73: 350-356.

- Pal, N.L., and Gopalachari, N.C. 1957.** A note on the root parasite *Orobanche* on tobacco and its control by weeding. In proceedings of the 1st Conference of Tobacco Research Workers in India. Bangalore, India. pp.52-54.
- Paran, I., Giodoni, D., and Jacosohn. 1997.** Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. *Heredity* 78: 68-74.
- Parker, C. 1986.** Scope of the problems caused by *Orobanche* species. In S.J. ter Borg (ed.). *Biology and control of Orobanche*. Proceedings of a workshop on biology and control of *Orobanche*. Wageningen, the Netherlands, LH/VPO. pp.11-17.
- Parker, C. 1994.** The present state of the *Orobanche* problem. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.17-26.
- Parker, C., and Riches, C.R. 1993.** Parasitic weeds of the world: Biology and control. 1st ed. Castelfield Press Limited, Kettering, Northants-UK.
- Parlevliet, J.E. 1981.** Race non-specific disease resistance. In: J.F. Jenkyn and R.T. Plumb (eds.). *Strategies for the control of cereal diseases*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp.47-54.
- Parlevliet, J.E. 1989.** Identification and evaluation of quantitative resistance. pp.215-248. In K.J. Leonard and E.F. Williams (eds.). *Plant Disease Epidemiology*. Vol.3. Genetics, Resistance and Management. McGraw-Hill, USA.
- Pejic, I., Ajmonnemarsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., and Motto, M. 1998.** Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1248-55.
- Pieterse, A.H., and Verkleij, J.A.C. 1994.** Germination ecology of *Striga* and *Orobanche* - an overview. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.36-48.
- Portnoy, V.H., Katzir, N., and Joel, D.M. 1997.** Species identification of soil-born *Orobanche* seeds by DNA fingerprinting. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 58: 49-54.

- Powell, W., Morgante, M., Andre. C., and col. 1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2 : 225-38.
- Quezel, P., and Santa, A. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, France.
- Radwan, M.S., Abdalla, M.M.F., Fischbeck, G., Metwally, A.A., and Darwish, D.S. 1988.** Variation in reaction of faba bean lines to different accessions of *Orobanche crenata* Forsk. *Plant Breeding*, 101: 208-216.
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., and col. 2000.** AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium spp.*). *Molecular breeding*, 6 :125-134.
- Roman, B., and Rubiales, D. 1999.** Molecular analysis of *Orobanche crenata* populations from Southern Spain. In: Resistance to *Orobanche*: The state of the art, pp.99-108. Junta de Andalucia, Spain.
- Roman, B., Alfaro, C., Satovic, Z., Cubero, J.I., Pujadas, A., and Ribiales, D. 2001a.** Genetic variation among *Orobanche* species collected in Southern Spain revealed by RAPD markers. In A. Fer, P. Thalouarn, D.M. Joel, L.J. Musselman, C.Parker and J.A.C. Verkleij (eds.). Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium. Nantes, France. Juin 2001. pp.53-56.
- Roman, B., Alfaro, C., Torres, A., Satovic, Z., Kharrat, M., Pujadas, A., and Ribiales, D. 2001b.** An analysis of genetic variation in natural populations of *Orobanche foetida* from Spain and Tunisie. In A. Fer, P. Thalouarn, D.M. Joel, L.J. Musselman, C.Parker and J.A.C. Verkleij (eds.). Proceedings of the 7th International Parasitic Weed Symposium. Nantes, France. Juin 2001. pp.57-60.
- Roumili, S. 1993.** Contribution à l'étude de l'*Orobanche* en Algérie. Thèse. Ing. Agr. INA, Algérie.
- Russell, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., et al. 1997.** Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95 : 714-22.
- Saber, H.A., El-Hady, M., Khalil, S.A., El-Sherbeeney, M.H., and Hassan, M.W. 1994.** New herbicides for *Orobanche* control in faba bean in Egypt. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on

Orobanche and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.572-575.

Saghir, A.R. 1987. Le problème de la cuscute en Algérie orientale. FAO report / May,21p.

Sauerborn, J. 1991. Parasitic flowering plants. Ecology and management. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany.

Sauerborne, J., and Saxena, M.C. 1980. A review on agronomy in relation to *Orobanche* problems in faba bean (*Vicia Faba* L.). In: S.J. ter Borg (ed). Biology and control of *Orobanche*. Proc. Of workshop on biology and control of *Orobanche*. Agricultural University, Wageningen, the Netherlands. pp.160-165.

Saxena, M.C. 1991. Status and scope for production of faba bean in the Mediterranean countries. Options Méditerranéennes, Série Séminaires n° 10, 15-20

Sylvian, S., Patricia, FR., Prado, E., and Prat, D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Cahiers d'études et de recherches francophones/ Agricultures. Vol.9, numéro 4, Juillet-Aout 2000:311-327, Ressources génétiques.

Tanksley, S.D., and Orton, T.J. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, Amsterdam.C.F.X.Yang and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 86:205-212.

Ter Borg, S.J., and Van Ast, A. 1991. Parasitic plants as stimulants of host growth. In: J. Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham and C. Parker (eds). 5th International Symposium on parasitic weeds. Nairobi, 24-30 June,1991. pp.442-446.

Teryokhin, E.S. 1994. Some biological peculiarities of *Orobanche* and its host plants and their possible significance for control strategies. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). Biology and Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.94-98.

Théaudet, C., thalouarn, P., Figureau, C., and Ferard, P. 1996. A new approach to *Orobanche* species identification. In: M.T., Moreno, J.I. Cubero, D. Brener, D. Joel, and L.J. Musselman(eds.). pp.143-150. junta de Andalusia, Cordoba, Spain.

Tosti, N., and Negri, V. 2002. Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *Unguiculata*) landraces. *Genome* 45: 268-275.

- Van Woerden, I.C., Van Ast, A., Zaitoun, F.MF., and Ter Borg, S.J. 1994.** Roots exudates of resistant faba bean cultivars are strong stimulants of broomrape germination. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.169-172.
- Verkleij, J.A.C., and Pieterse, A.H. 1994.** Genetic variability of *Orobanche* (broomrape) and *Striga* (witchweed) in relation to host specificity. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.67-79.
- Verkleij, J.A.C., Egbers, W.S., and Pieterse, A.H. 1991a.** Allozyme variations in populations of *Orobanche crenata* from Syria. In K.Wegmann and L.J. Musselman (eds.) *Progress in Orobanche Research*. Eberhard-Karls-Universitat, Tubingen, FRG,1991. pp.304-317.
- Verkleij, J.A.C., Koevoets, P., Lopez-Granados, F., Egbers, W.S., Garcia-Torres, L., and Pieterse, A.H. 1991b.** Genetic variability in populations of *Orobanche crenata* from Spain. In J.K.Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham and C. Parker (eds.). *Proc. 5th Inter. Symp. on parasitic weeds*. Nairobi, Kenya, CIMMYT. pp.462-469.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., and al. 1995.** AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* pp.4407-4414.
- Vyas, B.P. 1966.** Control of *Orobanche* (on tobacco). *Indian Farming*, 16:51.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E., and Lodhi, M.A. 1992.** Inheritance and reliability of RAPD markers. pp.12-17. In *Proc. Symp. Applications of RAPD Technology to plant Breeding. Crop Sci. Soc. Amer.*, Minneapolis, Minnesota.
- Wegmann, K. 1994.** Physiology of host / *Orobanche* interaction. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and Management of Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.49-56.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., and Wieland, M. 1995.** DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton. 363p.
- Welsh, J., and McClland, M. 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18 (24): 7213-7218.

Whitworth-Rso. 2001 The benefits of wheat after faba beans. *Farmers'-Newsletter*. No. 157, 20-21.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6531-6535.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. pp.704-740. In R. Wu (ed.). *Methods in enzymology, Recombinant DNA, Part I, Vol.218*. Academic Press, San Diego.

Wrigley, C.W., Autran, J.C., and Bushuk, W. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. *Adv .Cereal Sci. Technol.*, 5: 211-259.

Yang, X., and Quiros, C. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 86:205-212.

Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R., and Lumpkin, T.A. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers, *Crop Science*, 39 : 268-275.

Zaitoun, F.M.F. 1990. Studies on the resistance and susceptibility of broad bean (*Vicia faba* L.) to broomrape (*Orobanche crenata* Forsk). PhD. Thesis, Fac. Agric., Alex. Univ., Egypt.

Zaitoun, F.M.F., Al-Manoufi, O.A., and Webber, H.C. 1989. A new method for assessment of loss in *Vicia faba* through infection with *Orobanche crenata*. In K. Wegmann and L.J.Musselman(eds.). *Progress in Orobanche research, proceedings of the International Workshop on Orobanche research*. Obermarchtal, 1989.Tubingen, Germany, Eberhard-Karls University. pp.257-277.

Zaitoun, F.M.F., Al-Manoufy, O.A., and Webber, H.C. 1991. Mechanisms of tolerance and susceptibility of three *Vicia faba* varieties to the infection with *Orobanche crenata*. In J.K.Ransom, L.J. Musselman, A.D. Worsham and C. Parker (eds.). *Proc. 5th Inter. Symp. On parasitic weeds*. Nairobi, Kenya, CIMMYT. pp.195-207.

Zaitoun, F.M.F., and Ter Borg, S.J. 1994. Resistance against *Orobanche crenata* in Egyptian and Spanish faba bean. In A.H. Pieterse, J.A.C. Verkleij and S.J. ter Borg (eds.). *Biology and*

Management of *Orobanche*. Proc. 3rd Inter. Workshop on *Orobanche* and related *Striga* research. Amsterdam, The Netherlands, Royal Tropical Institute. pp.264-275.

Zaki, M.A. and Tewfik, M.S. 1974. Trials on the germination of *Orobanche* seeds (*in vitro*). *Egypt. J. Bot.*,17: 179-181.

Zeid, M.M. 1997. Biotechnological studies on some field crops, genetic variability in faba bean (*Vicia faba* L.) and broomrape (*Orobanche* sp.). Master thesis, Fac. Agric., Alex. Univ., Egypt.

Zeid, M., Madkour, M., Koreim, Y., Nawar, A., Soliman M., and Zaitoun F. 1997. Molecular studies on *Orobanche*. *J. Phytopathology* 145, 351-355.

Zermane, N. 1998. Contribution à l'étude des phanérogames parasites de l'Algérie: inventaire, répartition géographique, plantes hôtes, dégâts et quelques méthodes de lutte. Thèse de Magister, INA, Algérie.209p.

Zermane N., Kroschel J., Souissi T. and KharratM. 2002. Field survey on *Orobanche* infestation of faba bean in Tunisia. In: Deininger A. (ed.) Proceedings of the Deutscher Tropentag 2002 „Challenges to organic farming and sustainable land use in the tropics and subtropics“, 9-11 Oct, University of Kassel, Witzenhausen, Germany, (Abstract) p. 79.

Zhang, D. 2002. Marqueurs moléculaires: outils de choix pour le génotypage des plantes. 12^{ème} colloque sur les Recherches Fruitières, Les apports de la biologie moléculaire en arboriculture fruitière. Bordeaux-30-31, mai 2002.

7.

Annexes

ANNEXE I : Préparation des solutions pour la PAGE :

A).Solution monomère :

Acrylamide (30%)	58,4 g
Bis-acrylamide (2,7%)	1,6 g

Les deux solides ont été dissous dans de l'eau distillée et le volume complété à 200 ml.

B).Tampon du gel de séparation(1,5 M Tris-HCl, pH=8,8) :

Tris-base	18,15% (w/v)
-----------	--------------

Le pH a été ajusté à 8.8 avec une solution d'HCl (6 N), et le volume complété à 100 ml.

C).Tampon du gel de concentration (1M Tris-HCl, pH=6,8) :

Tris-base	12,1 g(w/v)
-----------	-------------

Le pH est ajusté à 6,8 par une solution d'HCl (6 N).

D).Solution de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) :

SDS	10%(w/v)
-----	----------

E).Solution d'Ammonium Persulfate : La solution est préparée juste avant utilisation.

APS	10%(w/v)
-----	----------

F).Tampon de l'électrode (5x):

Tris-HCl	15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
H ₂ O	1 L

La solution est diluée à 1x et le pH ajusté à 8,3 avec une solution d'HCl (6 N).

G).Tampon Tris (pH=6,8) (tampon de dénaturation):

Tris-HCl (pH=8.0)	60 mM
SDS (w/v)	2%
Glycerol	10%
0,05% bleu de Bromophenol (w/v)	1%
β-Mercaptoethanol	0,5%

H).Solution de coloration :

Bleu de Coomassie R-250 brillant	0,5 g(w/v)
Acide acétique glacial	10%(w/v)
Méthanol	40%(w/v)

I).Solution de décoloration:

Acide acétique glacial	10%
Méthanol	40%

NB: Toutes les solutions doivent être filtrées.

ANNEXE II : Préparation du gel d'électrophorèse pour la SDS-PAGE

<i>Réactif</i>	<i>Gel de séparation(10%)</i>	<i>Gel de concentration (4%)</i>
Solution monomère	10,0 ml	1,30 ml
Tampon de séparation(pH=8,8)	7,5 ml	-
Tampon de concentration(pH=6,8)	-	2,5 ml
SDS 10%	0,3 ml	0,1 ml
DH ₂ O	12,5 ml	6,1 ml
APS(10%)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

ANNEXE III : Préparation du tampon d'extraction d'ADN : CTAB, pH= 8 (pour 50 ml)

Composant	Concentration	Quantité
CTAB	2 %	1 g
NaCl	1.42 M	4.14 g
EDTA	20 mM	0.37 g
Tris-HCl	100 Mm	0.39 g
PVP	2 %	1 g
Acide ascorbique	5 mM	0.044 g
Sarkosyle	4 mM	0.044 g
Mercaptoéthanol	1 µl/ml	50 µl
H ₂ O distillée	-	Qsp. 50 ml

**ANNEXE IV : Taille et concentration des différentes bandes du DNA marker
(Lambda DNA Hind III digest and Phi X174 Hae III digest).**

Bandes d'ADN	bp	concentrations dans 1 µl
1 _____	23130	9.5ng
2 _____	9416	3.9ng
3 _____	6557	2.7ng
4 _____	4361	1.8ng
5 _____	2322	0.96ng
6 _____	2027	0.84ng
7 _____	1353	2.50ng
8 _____	1078	2.00ng
9 _____	872	1.60ng
10 _____	603	1.10ng
11 _____	564	1.00ng
12 _____	310	0.57ng

ANNEXE V : Amorces OPERON utilisées dans l'analyse RAPD.

Code amorce	Séquence 5'→3'	% GC
OP-B1	5'-GTTTCGCTCC-3'	60
OP-B5	5'-TGATCCCTGG-3'	60
OP-B12	5'-CCTTGACGCA-3'	60
OP-B13	5'-TTCCCCCGCT-3'	70
OP-B18	5'-CCACAGCAGT-3'	60
OP-B20	5'-GGACCCTTAC-3'	60
OP-C7	5'-GTCCCGACGA-3'	70
OP-C9	5'-CTCACCGTCC-3'	70
OP-G15	5'-ACTGGGACTC-3'	60
OP-G19	5'-GTCAGGGCAA-3'	60

ANNEXES VI : Préparation du gel d'agarose (1%) pour l'électrophorèse des produits d'amplification de la PCR

Peser 1g d'agarose et le mettre dans un Erlen Mayer de 250 ml, puis ajouter 100 ml de tampon TBE (1X), pH=8. Dissoudre dans le micro onde pendant 2 min; une fois l'agarose dissous le laisser refroidir un peu, puis ajouter 4 µl de bromide d'ethidium. Bien mélanger pour homogénéiser la solution. Couler immédiatement le gel dans la cellule d'électrophorèse et laisser solidifier.

TBE (1X):

Composant	Concentration
Tris-borate	90 mM
EDTA	2 mM

ANNEXES VII : Préparation des plaques, du gel et des échantillons pour l'électrophorèse des produits d'amplification de l'AFLP

1.Préparation des plaques:

Si les plaques sont utilisées pour la première fois, les laver abondamment au détergent, puis les rincer abondamment à l'eau (sous le robinet). La préparation des plaques commence par trois rinçages consécutifs à l'eau distillée stérile. Les deux plaques sont ensuite rincées à l'éthanol à 70%, à l'aide d'un papier buvard. La préparation se fait de la manière suivante:

*Appliquer 1 ml de Bind Silane, sur la grande plaque, et laisser sécher pendant 4 à 5 min, puis appliquer 2 ml d'éthanol à 95% afin d'éliminer l'excès de Bind Silane. Cette opération est répétée trois fois.

*Appliquer 1 ml de SigmaCote sur la petite plaque, et laisser sécher pendant 5 à 10 min, puis essuyer avec un papier buvard afin d'éliminer l'excès de SigmaCote.

*Assembler les deux plaques, en mettant la petite plaque sur la grande plaque, séparées par deux spacers en plastique. L'assemblage est renforcé par des pinces.

Solution de Bind Silane: à préparer dans un tube de 1.5 ml

Composant	Volume
éthanol à 95%	995 µl
acide acétique glacial (0.5%)	5 µl
Bind Silane	3 µl

NB: Bind Silane et SigmaCote sont des solutions toxiques le port de gants est obligatoire. Changer de gants entre les traitements des deux plaques, pour éviter les contaminations.

2.Préparation du gel:

Composant	Concentration finale	
Urée	31,50 g	7 M
H2O deionisée	36,25 ml	-
Tampon TBE 10X	3,75 ml	0,5X
Acrylamide bis(19:1)40%	11,25 ml	6%

Filtrer la solution d'acrylamide à travers un filtre de 0.2 microns, puis ajouter 50 µl de TEMED et 500 µl d'APS (frais) à 10%, agiter doucement. Ensuite, couler la solution d'acrylamide entre les deux plaques; afin d'éviter de produire des bulles d'air commencer à couler d'un coté et maintenir un flux constant. Après cela, positionner le système d'assemblage horizontalement sur deux portes tubes ou autre support similaire. Insérer le peigne entre les deux plaques. Laisser le gel polymériser au moins 1 heure.

3.Préparation des échantillons pour l'électrophorèse:

Après amplification, ajouter 5 µl de formamide (98% formamide, 10mM EDTA, bromphenol blue, Xylène cyanol) dans chaque microcentritube. Chauffer les tubes pendant 3 mn à 90°C puis placer immédiatement dans de la glace.

Formamide:

Composant	Quantité
Formamide (98%)	9.8 ml
EDTA(0.5 M)	0.2 ml
Bleu de bromphenol	5 mg
Xylène cyanol	5 mg

ANNEXES VIII : Préparation des solutions de fixation, de coloration et de développement du gel AFLP

1. Solution A: solution de fixation

Composant	Volume
Acide acétique glacial (10%)	100 ml
H2O distillée	Qsp.1000ml

2. Solution B: solution de coloration

Composant	Quantité
Nitrate d'argent	1.5 g
H2O distillée	Qsp 1000 ml

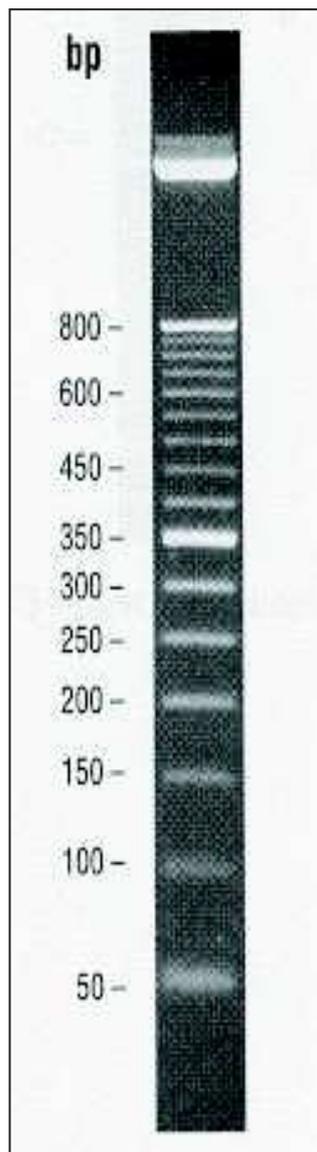
Ajouter 1.5 ml de formaldéhyde (37%), 15 min avant utilisation.

3.Solution C: solution de développement

Composant	Quantité
Carbonate de sodium	30 g
H2O distillée	Qsp 1000 ml

Ajouter 1.5 ml de formaldéhyde (37%) et 200 ul de sodium thiosulfate (10mg/ml, préalablement refroidi à -20°C), 15 min avant utilisation.

ANNEXES VIII : Marqueur AFLP : 50 bp DNA ladder



SUMMARY:

Orobancha crenata is an obligatory parasitic plant of broad bean and other leguminous cultures, and generates serious damages on these cultures. Molecular approach by the use of three techniques of marking: SDS-PAGE, RAPD and AFLP was privileged in this study.

The principal objective of this work, is to determine the intraspecific level of diversity, among populations of *O. crenata* collected in various geographical localities of the Mitidja in Algeria, and to highlight interspecific polymorphism between the three most widespread species of broomrape in Algeria, namely *O. crenata*, *O. ramosa* and *O. aegyptiaca*.

The second objective is to study the effectiveness of the two types of DNA markers, RAPDs and AFLPs, in the detection of interspecific and intraspecific genetic polymorphism.

The electrophoresis of native proteins of broomrape's seeds in SDS-PAGE, generated a relatively similar electrophoretic profiles between the various analyzed ecotypes of *O. crenata*. The comparison between the latter and those of *O. ramosa* revealed an obvious and clear difference.

The interspecific and intraspecific genetic polymorphism was highlighted through the use of the two techniques of DNA marking, the RAPD and the AFLP. On the whole, 144 RAPDs markers were identified among the six ecotypes of *O. crenata* and *O. aegyptiaca* through which we could distinguish the two sections to which the two species belong, namely the Tryonikon section for *O. aegyptiaca* and the Osproléon section for *O. crenata*.

The DNA analysis by the use of AFLP also revealed a notable polymorphism between the various ecotypes tested. On the whole, 429 AFLP markers were generated with 3 combined primers.

The AFLP produced a better resolution of the analyzed genomic profiles. This technique proved more precise and more sensitive than the RAPD in the detection of polymorphism between very close genotypes.

الملخص العربي

هالوك الفول أو الجعفيل نبات متطفل كليا على مزروع الفول و بقوليات أخرى. الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو تسليط الضوء على الاختلافات أو الفروقات الجينية الموجودة بين مختلف مجتمعات نبات الهالوك تحت الدراسة و الملتقطة من أنحاء مختلفة من منطقة المتيجة، و هذا عن طريق ثلاثة تقنيات للمعلومات الجزيئية و هي التفريد الكهربائي للبروتينات SDS-PAGE، التضاعف العشوائي لتبينات الحمض الريبسي النووي أو RAPD و تضاعف لتبينات قطع مختلفة الطول AFLP ، و تقييم قوة و دقة كل تقنية في تبين الفروقات الجينية الموجودة بين مختلف مجتمعات هالوك الفول *D.crenata* و بين أنواع الهالوك الأخرى *O. aegyptiaca* و *D. ramosa* التي تم دراستها.

أظهرت نتائج التفريد الكهربائي للبروتينات الكلية لبدور الهالوك فروق معنوية ما بين أنواع الهالوك و لكن الفروق ما بين مختلف مجتمعات هالوك الفول كانت ضئيلة.

تم أيضا قياس الاختلافات الوراثية على مستوى الحمض الريبسي النووي باستخدام تقنية ال RAPD حيث تم انتاج 144 قطعة جزيئية للحمض الريبسي النووي و أظهرت النتائج وجود فروق وراثية واضحة بين أنواع الهالوك بينما كانت الفروق الوراثية بين مجتمعات هالوك الفول أقل، لكن التقنية سمحت بالتمييز بين هذه المجتمعات.

أظهرت نتائج ال AFLP وجود فروق معتبرة ما بين مجتمعات هالوك الفول، حيث أن هذه التقنية سمحت باظهار تجمعات وراثية مختلفة حسب الفليل المستعمل. لكن هذه التقنية أظهرت أنها أكثر دقة و أكثر قدرة من ال RAPD، حيث أنتجت من خلال الثلاث فتائل المستعملة 429 قطعة جزيئية للحمض الريبسي النووي.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أنه بالإمكان الكشف على الاختلافات الجينية لمختلف أنواع الهالوك عن طريق التقنيات الثلاث، لكن الفروقات الجينية الموجودة بين مجتمعات هالوك الفول قد تم تسليط الضوء عليها بصفة دقيقة و قوية عن طريق تقنية ال AFLP .

RESUME :

L'*Orobanche crenata* est une plante parasite obligatoire de la fève et autres cultures de légumineuses, et engendre de sérieux dégâts sur ces cultures.

L'objectif principal de ce travail, est de déterminer le niveau de diversité intraspécifique, parmi des populations d'*O. crenata* collectées dans différentes localités géographiques dans la région de la Mitidja en Algérie, et de mettre en évidence le polymorphisme interspécifique entre les trois espèces d'orobanche les plus répandues en Algérie, à savoir *O. crenata*, *O. ramosa* et *O. aegyptiaca*.

Le second objectif, est d'étudier l'efficacité des deux types de marqueurs d'ADN la RAPD et l'AFLP, dans la détection du polymorphisme génétique interspécifique et intraspécifique.

L'approche moléculaire par l'emploi de trois techniques de marquage: SDS-PAGE, la RAPD et l'AFLP a été privilégiée dans cette étude.

L'électrophorèse des protéines natives des graines d'orobanche en SDS-PAGE, a généré des profils protéiques électrophorétiques relativement similaires entre les différents écotypes d'*O. crenata* étudiés. La comparaison de ces derniers avec ceux d'*O. ramosa*, a révélé une différence évidente et claire.

Le polymorphisme génétique interspécifique et intraspécifique de l'ADN génomique a été mis en évidence à travers l'emploi des deux techniques de marquage moléculaire de l'ADN, la RAPD et l'AFLP. Au total, 144 marqueurs RAPD ont été identifiés parmi les six écotypes d'*O. crenata* et *O. aegyptiaca*, à travers lesquels nous avons pu distinguer les deux sections auxquelles appartiennent les deux espèces, à savoir la section Tryonikon pour l'espèce *O. aegyptiaca* et la section Osproléon pour l'espèce *O. crenata*.

L'analyse de l'ADN génomique par l'emploi de l'AFLP a aussi révélé un polymorphisme notable entre les différents écotypes testés. Au total, 429 marqueurs AFLP ont été générés avec 3 amorces combinées.

L'AFLP a produit une meilleure résolution des profils génomiques analysés. Cette technique s'est avérée plus précise et plus sensible que la RAPD dans la détection du polymorphisme entre des génotypes très proches.