

République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر
École Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach - Alger



**THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

Thème

**Induction de la variabilité génétique par radio-mutagenèse (rayons gamma)
chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et évaluation agronomique et génétique
(Low-Cost TILLING) de mutants en M₂.**

AMRI – TILIOUINE Wahiba

Devant le jury composé de :

Président :	Mr. AMIALI M.	Professeur	ENSA, El Harrach, Alger.
Directeur :	Mme. LAOUAR M.	M.C.A	ENSA, El Harrach, Alger.
Co-Directeur :	Mr. ABDELGUERFI A.	Professeur	ENSA, El Harrach, Alger.
Examineurs :	Mr. BENBELKACEM A.	Directeur de Recherche	INRAA, Constantine.
	Mr. M'HAMMEDI BOUZINA M.	Professeur	Université de Chlef.
	Mme. RAHAL-BOUZIANE H.	M.C.A	INRAA, Alger.

Année universitaire 2019-2020

Dédicaces

*A mon défunt PÈRE, qui est toujours dans mon esprit et dans mon cœur,
qui m'a toujours encouragé et soutenu dans mes études. Que Dieu, le
miséricordieux, l'accueille dans son éternel paradis,*

*A MA TRÈS CHÈRE MÈRE, tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un
grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Dieu, le tout puissant,
te préserver et t'accorder santé et longue vie,*

A mon époux Mohamed,

A ma fille Hibaterrahmane,

A toute ma famille et belle-famille.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie **ALLAH** pour la volonté, la force, la santé et la patience qu'il m'a donné afin de réaliser ce travail.

Ma profonde reconnaissance va à madame **Laouar M.**, directrice de thèse, maître de conférences à l'ENSA, pour son suivi, son entière disponibilité, ses orientations, sa gentillesse et pour les efforts fournis afin de concrétiser ce travail.

Mes grands remerciements s'adressent au Professeur **Abdelguerfi A.**, co-directeur ; je lui exprime ici ma profonde gratitude pour son suivi et ses précieux conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie fortement le Professeur **Amiali M.** d'avoir accepté de présider le jury de ce travail. Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Messieurs les Professeurs **Benbelkacem A.** et **Mhammedi-Bouzina M** et à Madame **Rahal-Bouziane H.** qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je tiens à exprimer mes sincères et vifs remerciements au feu **Dr. Labdi M.** (chercheur INRAA) de nous avoir fournie le matériel végétal (semences de pois chiche) pour initier ce travail de recherche.

Je remercie aussi, les étudiantes; Mlles **Moussaoui A., Chabani F.** et **Lamri R.** pour les efforts qu'elles ont fournis.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **Yefsah R.**, chercheur au centre national de la recherche nucléaire (CRNA) d'Alger, pour l'aide opportune du traitement d'irradiation des graines.

Mes sincères remerciements vont aussi à **Bradley J. Till**, à **Joanna Jankowicz-Cieslak** et à **Owen A. Huynh**, du Laboratoire d'amélioration des plantes et de génétique de l'AIEA en Autriche, pour leur assistance lors de la réalisation de la partie moléculaire.

Je tiens aussi à remercier **les ouvriers** des deux stations de l'ENSA et de l'INRAA (station de Baraki) pour leur aide durant l'installation des essais expérimentaux, les opérations de désherbage manuel et les travaux de récolte.

Des remerciements particuliers sont adressés à ; **Fatiha Zine, Leila Bouzid, Dahbia Tabti, Farida Alane, Dalila Boukecha, Adel Kadri et Hafida Rahal-Bouziane** pour leur aide et soutien dans cette recherche.

Ce travail a été effectué dans le cadre du projet de recherche AIEA ALG5026 : “Increasing the Genetic Variability for the Improvement of Strategic Crops (Wheat, Barley, Chickpea and Dates) for Enhanced Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses and the Development of Biotechnology Capacities”. Je tiens à remercier sincèrement, Monsieur **Baaliouamer M.** l’agent de liaison national NLO (AIEA) du Commissariat de l’Energie Atomique (COMENA), de m'avoir fourni les facilités nécessaires.

Enfin, mes remerciements s’adressent également à **tous ceux qui ont contribué à l’achèvement de ce travail**, qu'ils trouvent ici l’expression de mes profondes reconnaissances.

Résumé

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), l'une des plus importantes légumineuses à graines en Algérie, occupe la deuxième position après la fève-fêverole de point de vue superficie cultivée et production, où, le marché est très favorable pour le type "Kabuli". En même temps l'Algérie est le cinquième plus gros importateur de pois chiche au monde d'où un besoin important d'augmenter la production et le rendement. La création de nouvelles variétés adaptées à l'environnement algérien pourrait résoudre en partie le faible rendement. Parmi les techniques d'amélioration des plantes, la radiomutagenèse. C'est une méthode efficace pour l'induction de variabilité génétique désirable chez les espèces cultivées. Cette radiomutagenèse a rendu possible la création de plusieurs variétés performantes chez les légumineuses, particulièrement chez le pois chiche. Ainsi, Afin d'augmenter la variabilité génétique pour l'amélioration du pois chiche, deux génotypes de type kabuli (GP10 et Ghab4) ont été traités avec 150, 200, 250, 300, 350 et 400 Gray de rayons gamma (Cobalt 60). Deux différentes doses optimales ont été choisies pour la production de la génération M₁, 250 Gray et 280 Gray pour GP10 et Ghab 4 respectivement. La caractérisation au champ a commencé avec la génération M₂. Au total, 135 familles M₂ ont été semées sur le terrain, ce qui représente environ 4050 plants. Les caractères liés à la phénologie (nombre de jours à la floraison, nombre de jours à la maturité) et les caractères quantitatifs (hauteur de la plante, hauteur de la première gousse, nombre de branches primaires par plant, nombre de graines par gousse, nombre total de gousses par plant, nombre total des graines par plant, le rendement en grains et le poids de 100 graines) ont été enregistrés et analysés pour évaluer la variabilité génétique. Une évaluation de l'efficacité de TILLING à faible coût (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes) pour découvrir des mutations dans la génération M₂ a été réalisée. Les efforts ont été concentrés sur les gènes impliqués dans la résistance aux deux maladies importantes du pois chiche ; *Aschochyta blight* (AB) et *Fusarium wilt* (FW), ainsi que les gènes responsables de la floraison précoce. L'analyse de la variance a montré une différence hautement significative entre les familles pour tous les caractères phénotypiques cités ci-dessus. Les estimations les plus élevées des paramètres génétiques (coefficient de variation génotypique et phénotypique, l'héritabilité au sens large et l'avance génétique) ont été enregistrées pour le nombre de graines par plant et le rendement en grains. Le rendement en grains était hautement significatif et positivement corrélé avec le nombre de gousses et de graines par plant. L'analyse en « Path » a montré que le nombre total de graines par plant avait un effet direct positif le plus élevé, suivi par le poids de 100 graines. Un groupe sur neuf présentait les valeurs moyennes les plus élevées pour le nombre total de gousses et de graines par plant et le rendement en grains par plant. Selon le test de Dunnett, 37 familles M₂ supérieures au témoin ont été déterminées pour 5 caractères agronomiques. Des expériences pilotes de TILLING à faible coût montrent que le stock de semences utilisé pour la mutagenèse est homogène et que les petites mutations ne prédominent pas au dosage utilisé.

Mots-clés : Mutation induite, paramètres génétiques, analyse en « Path », analyse de cluster, composantes de rendement, sélection, TILLING à faible coût.

ملخص

تحريض التباين الوراثي عن طريق الطفرات الإشعاعية (أشعة غاما) في الحمص (*Cicer arietinum* L.) والتقييم الزراعي والوراثي (TILLING المنخفض التكلفة) للطفرات في M₂.

يعتبر الحمص (*Cicer arietinum* L.) ، أحد أهم البقوليات في الجزائر ، يحتل المركز الثاني بعد الفول والفرول من حيث المساحة المزروعة والإنتاج. السوق الجزائرية مواتية للغاية لنوع "كابولي". في نفس الوقت، تعد الجزائر خامس أكبر مستورد للحمص في العالم، ومن ثم فإن هناك حاجة ماسة إلى زيادة الإنتاج والمردود. إن إيجاد أصناف جديدة تتكيف مع البيئة الجزائرية يمكن أن يرفع جزئياً من المردود المنخفض. من بين تقنيات تربية النباتات، تعتبر عملية التوليد الإشعاعي (radiomutagenesis) طريقة فعالة لإحداث تغيير جيني مرغوب في الأنواع المستزرعة. جعلت هذه الطريقة من الممكن إنشاء العديد من الأصناف ذات الغلة العالية في البقوليات، لا سيما في الحمص. في هذا الصدد ومن أجل زيادة التنوع الوراثي لتحسين الحمص، تم علاج اثنين من الأنماط الجينية كابولي (Ghab4 و GP10) بـ 150، 200، 250، 300، 350 و 400 غراي من أشعة غاما (كوبالت 60). تم اختيار جرعتين مختلفتين مثاليين لإنتاج الجيل الأول M₁ ، 250 غراي و 280 غراي لـ GP10 و Ghab 4 على التوالي. بدأ التوصيف في الحقل مع الجيل الثاني M₂. تم زرع 135 عائلة M₂ في الحقل، تمثل ما يقرب من 4000 نبتة. تم تسجيل وتحليل الصفات المتعلقة بالفنولوجيا (عدد الأيام إلى الإزهار، والأيام حتى تاريخ النضج) والصفات الكمية (طول النبات، وارتفاع أول جراب، وعدد الأفرع الرئيسية للنبات، وعدد البذور في كل جراب، مجموع عدد القرون في النبات، عدد البذور الإجمالي في كل النبات، محصول البذور، وزن مئة بذرة) لتقييم التنوع الجيني. تم إجراء تقييم لفعالية TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes) منخفض التكلفة لاكتشاف الطفرات في الجيل الثاني M₂. تركزت الجهود على الجينات المشاركة في مقاومة المرضين الرئيسيين للحمص استوكيتا (AB) والفيوزاريوم الذبول (FW) ، بالإضافة إلى الجينات المسؤولة عن الإزهار المبكر. أظهر تحليل التباين وجود فرق كبير بين العائلات لجميع الصفات المظهرية المذكورة أعلاه. تم تسجيل أعلى تقديرات المعلمات الجينية (معامل التباين الوراثي والمظهر الظاهري، التوريث ذو المعنى الواسع والتقدم الوراثي) لعدد البذور لكل نبات وإنتاجية البذور. كانت غلة الحبوب ذات أهمية كبيرة وذات ارتباط إيجابي مع عدد القرون والبذور للنبات. أظهر تحليل المسار أن إجمالي عدد البذور لكل نبات كان له التأثير المباشر الإيجابي الأعلى، يليه وزن 100 بذرة. كانت واحدة من بين تسع مجموعات لديها أعلى متوسط قيم للعدد الكلي من القرون والبذور لكل نبات وحاصل البذور لكل نبات. وفقاً لاختبار Dunnett تم تحديد 37 أسرة M₂ أكبر من الصنف الأصلي لـ 5 صفات زراعية. تظهر تجارب TILLING منخفضة التكلفة أن مخزون البذور المستخدم في الطفرات هو متجانس وأن الطفرات الصغيرة لا تسود عند الجرعة المستخدمة.

الكلمات المفتاحية: الطفرات المستحدثة، المعلمات الجينية، تحليل المسار السببي، تحليل الكتلة، مكونات الإنتاجية، الاختيار، TILLING المنخفض التكلفة.

ABSTRACT

Induction of genetic variability by radio-mutagenesis (gamma rays) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and agronomic and genetic evaluation (Low-Cost TILLING) of mutants in M₂.

Chickpea (*Cicer arietinum* L.), one of the most important seed legumes in Algeria, occupies the second position after beans and faba beans in terms of cultivated area and production, where, the market is very favorable for the "Kabuli" type. At the same time, Algeria is the fifth largest importer of chickpea in the world, hence an important need to increase production and yield. The creation of new varieties adapted to the Algerian environment could partially solve the low yield. Among plant breeding techniques, radiomutagenesis is an efficient method for inducing desirable genetic variability in cultivated species. This radiomutagenesis has made possible the creation of several high-yielding varieties in legumes, particularly in chickpeas. Therefore, in order to increase genetic variability for chickpea improvement, two Kabuli genotypes (GP10 and Ghab4) were treated with 150, 200, 250, 300, 350 and 400 Gray gamma rays (Cobalt 60). Two different optimal doses were chosen for the production of M₁ generation, 250 Gray and 280 Gray for GP10 and Ghab 4 respectively. Field characterization began with the M₂ generation. 135 M₂ families were sown in the field resulting in approximately 4000 plants. Traits related to phenology (days to flowering, days to maturity), plant morphology of vegetative part (plant height, height of first pod, number of primary branches per plant) and yield (number of seeds per pod, total number of pods per plant, total number of seeds per plant, seed yield and hundred seed weight) were recorded and analyzed to evaluate genetic variability. An evaluation of the efficacy of low-cost TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) to discover mutations in M₂ generation was undertaken. The efforts were concentrated on genes involved in resistance to the two important diseases of chickpea; *Aschochyta blight* (AB) and *Fusarium wilt* (FW), as well as genes responsible for early flowering. The analysis of variance showed a highly significant difference among families for all studied traits. The higher estimates of genetic parameters (genotypic and phenotypic coefficient of variation, broad sense heritability and genetic advance) were recorded for number of seeds per plant and seed yield. Seed yield was highly significant and positively correlated with number of pods and seeds per plant. Path analysis showed that the total number of seeds per plant had the highest positive direct effect followed by hundred seed weight. One cluster from nine exhibited the highest mean values for total number of pods and seeds per plant and seed yield per plant. According to Dunnett's test, 37 M₂ families superior to the control were determined for 5 agronomical traits. Pilot experiments with low-cost TILLING show that the seed stock used for mutagenesis is homogeneous and that small mutation do not predominate at the dosage used.

Keywords: Induced mutations, genetic parameters, path analysis, cluster analysis, yield components, selection, low-cost TILLING.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
------------------------------------	---

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le pois chiche.....	7
1.1. Origine et taxonomie.....	7
1.2. Description botanique du pois chiche.....	7
1.3. Importance de la culture du pois chiche	10
1.3.1. Importance économique	10
1.3.2. Importance alimentaire	11
1.3.3. Importance agronomique et environnementale.....	12
2. Situation de la culture du pois chiche en Algérie	13
2.1. Production et importation.....	13
2.2. Zones de productions.....	14
2.3. État de la diversité en Algérie.....	15
2.4. Contraintes liées à la production de pois chiche.....	15
3. Évolution de l'amélioration chez le pois chiche	16
3.1. Méthodes d'amélioration conventionnelles.....	16
3.2. Mutagenèse induite	18
3.2.1. Approche historique sur les mutations induites.....	18
3.2.2. La mutagenèse dans l'amélioration des cultures.....	19
3.2.3. L'amélioration par mutation chez les légumineuses et le pois chiche.....	21
3.2.4. Types de mutations, agents mutagènes et dose.....	21
3.2.4.1. Types de mutations.....	21
3.2.4.2. Agents mutagènes	22
3.2.4.3. La dose d'un mutagène.....	24
3.3. Évaluation, identification et sélection des mutants.....	25
3.3.1. Évaluation phénotypique des populations de mutants.....	25
3.3.2. Évaluation génotypique des populations de mutants	26
3.3.3. Sélection des mutants.....	30

CHAPITRE 2 : EVALUATION DE LA RADIOSENSIBILITÉ CHEZ LE POIS CHICHE DE TYPE KABULI (*CICER ARIETINUM L.*)

1. Introduction.....	34
2. Matériel et méthodes	35
2.1. Matériel végétal.....	36
2.2. Présentation des conditions de l'étude.....	37
2.3. Caractères étudiés	37
2.4. Analyses statistiques des données.....	38
3. Résultats	39
3.1. Détermination de la dose létale DL ₅₀	39
3.1.1. Taux de germination.....	39

3.1.2. Taux de survie.....	39
3.2. Détermination de la dose de réduction de croissance RD ₅₀	39
3.2.1. Hauteur des plantules	39
3.2.2. Poids sec des pousses et des racines.....	42
3.2.3. Nombre de fleurs par plante.....	43
3.2.4. Nombre de gousses par plante.....	43
4. Discussion.....	44
5. Conclusion	45

CHAPITRE 3 : VARIABILITE GENETIQUE AU SEIN DE LA GENERATION M₂ DE POIS CHICHE (*CICER ARIETINUM* L.) INDUITE PAR RAYONS GAMMA.

1. Introduction.....	49
2. Matériel et méthodes	50
2.1. Matériel végétal et dispositif expérimental.....	50
2.1.1. Générations M ₁	50
2.1.2. Générations M ₂	51
2.2. Conditions des essais.....	52
2.3. Caractères étudiés.....	53
2.3.1. Mutations de la chlorophylle.....	53
2.3.2. Fertilité du pollen.....	54
2.3.3. Caractères quantitatifs	55
2.3.4. Caractère qualitatif : port des plants.....	56
2.4. Analyse statistique des données.....	57
3. Résultats.....	58
3.1. Spectre et fréquence des mutations de la chlorophylle dans la génération M ₂ ...	58
3.2. Fertilité du pollen.....	60
3.3. Variation génétique entre les familles.....	61
3.4. Valeur de sélection des caractères.....	63
3.5. Fréquence des mutations du port des plants	64
3.6. Relation entre les caractères.....	64
3.7. Structure de la population M ₂	68
3.8. Sélection de mutants prometteurs M ₂	70
4. Discussion	71
4.1. Mutations chlorophylliennes.....	71
4.2. Fertilité du pollen.....	73
4.3. Variabilité et performance des mutants supérieurs pour la reproduction.....	73
4.4. Meilleurs caractères pour une sélection efficace.....	74
5. Conclusion	76

**CHAPITRE 4 : ÉVALUATION MOLÉCULAIRE DE LA POPULATION M₂
PAR L'UTILISATION DU Low-Cost TILLING (Targeting Induced Local Lesion
IN Genomes).**

1. Introduction.....	78
2. Matériel et méthodes	79
2.1. Matériel végétal.....	79
2.2. Extraction de l'ADN génomique.....	80
2.3. Quantification et normalisation de l'ADN génomique.....	80
2.3.1. Sur gel agarose	80
2.3.2. Avec l'utilisation du spectromètre Nanodrop	81
2.3.3. Normalisation de la concentration de l'ADN génomique.....	81
2.4. Recherche sur la base de données de gènes candidats impliqués dans la résistance à l'antracnose, la fusariose et à la floraison précoce chez le pois chiche.....	81
2.5. Test d'amorces et TILLING à faible coût.....	81
2.5.1. Test d'amorces par amplification en chaîne par polymérase (PCR)	82
2.5.2. TILLING à faible coût.....	82
2.6. Validation des séquences des résultats obtenus avec l'utilisation de TILLING à faible coût.....	82
3. Résultats.....	83
3.1. Développement de TILLING à faible coût pour la découverte de mutations chez le pois chiche.....	83
3.2. La recherche dans la base de données de gènes candidats impliqués dans la résistance à l'antracnose, à la fusariose et à la floraison précoce chez le pois chiche.....	84
3.3. Réaction en chaîne par polymérase (PCR).....	85
4. Discussion	87
5. Conclusion	90
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	92
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96
ANNEXES	123
PUBLICATION.....	144

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Liste des variétés de pois chiche en production en Algérie (Zeghouane, 2018 et ITGC, 2018).....	15
Tableau 2 :	Schéma sommaire d'une sélection par mutation selon Forster and Shu, (2011).....	31
Tableau 3 :	Données des moyennes mensuelles des températures et précipitations (2014-2015).....	52
Tableau 4 :	Caractéristiques physico-chimiques du sol.....	53
Tableau 5 :	Liste des caractères quantitatifs étudiés et leur méthode d'évaluation.....	55
Tableau 6 :	Spectre et fréquence des mutations de la chlorophylle dans la génération M ₂ de pois chiche.....	60
Tableau 7 :	Taux de fertilité du pollen par famille.....	61
Tableau 8 :	Estimations des paramètres génétiques de divers caractères quantitatifs dans la génération M ₂ du pois chiche de type Kabuli.....	62
Tableau 9 :	Coefficients de corrélation entre divers caractères quantitatifs dans la génération M ₂ de pois chiche.....	65
Tableau 10 :	Analyse "Path" montrant l'effet direct et indirect de différents caractères sur le rendement en grains dans la génération M ₂ de pois chiche Kabuli.....	67
Tableau 11 :	Moyennes des Cluster des 135 familles de pois chiches M ₂ pour les différents caractères quantitatifs.....	69
Tableau 12 :	Comparaison des moyennes avec celles du témoin (test de Dunnett) des 135 familles M ₂	71
Tableau 13 :	Noms et séquences des amorces de pois chiche et les tailles du produit PCR.....	84
Tableau 14 :	Résultat du criblage d'amorces avec l'ADN génomique de la variété Ghab 4 du pois chiche et de quelques échantillons M ₂	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Caractéristiques morphologiques du pois chiche (<i>Cicer arietinum</i> L) : (a) aspect général de la plante, (b) fleurs et feuilles, (c) gousses et graines immatures, (d) gousses ouvertes, (e) graines des deux types Kabuli et Desi.....	9
Figure 2 :	Évolution des superficies emblavées et de la production du pois chiche entre 2007 et 2017 (Faostat, 2019).....	13
Figure 3 :	Zones d'aptitude à la culture du pois chiche (ITGC, 2010).....	14
Figure 4 :	Variétés mutantes enregistrées par continent (a) et par type de culture (b) (FAO/AIEA, 2014).....	20
Figure 5 :	Mutagènes couramment utilisés dans l'induction de mutation végétale (FAO/AIEA, 2018).....	23
Figure 6 :	Formation d'hétéroduplexes (Szurman-Zubrzycka <i>et al.</i> , 2017).	28
Figure 7 :	(A) Schéma simplifié du clivage par mésappariement et (B) visualisation des produits sur un gel de polyacrylamide à l'aide d'un séquenceur LI-COR (Szurman-Zubrzycka <i>et al.</i> , 2017).	29
Figure 8 :	Les deux cultivars de pois chiche Kabuli utilisés dans cette étude (Ghab 4 et GP10).....	35
Figure 9 :	Essai de radiosensibilité chez le pois chiche sous serre.....	37
Figure10 :	Essai de radiosensibilité chez le pois chiche sous serre après la transplantation.....	38
Figure 11 :	Moyennes du taux de germination, du taux de survie, de la hauteur des plantules (% du témoin) et leurs équation de régression pour les deux cultivars de pois chiche GP10 et Ghab 4 exposés à différentes doses de rayons gamma.....	40
Figure 12 :	Plantules des deux cultivars de pois chiche GP10 et Ghab 4 provenant de graines irradiées aux rayons gamma montrant la hauteur des plantules diminuant progressivement avec l'augmentation de la dose (c.v.: cultivar).....	41
Figure 13 :	Moyennes du poids sec des pousses et des racines (% de témoin) et leur équation de régression chez deux cultivars GP10 et Ghab 4 de pois chiche, exposés à différentes doses de rayons gamma.....	42

Figure 14 : Nombre de fleurs et de gousses moyen (% de témoin) et leur équation de régression chez les des deux cultivars GP10 et Ghab 4 de pois chiche exposés à différentes doses de rayonnement gamma.....	43
Figure 15 : Différentes étapes de création de la population M ₁ et M ₂	51
Figure 16 : Observation sous microscope optique des grains de pollen fertiles et stériles (G 40 x 10).....	55
Figure 17 : Les cinq différents types de port : (A) Représentation schématique selon le descripteur de pois chiche ICRISAT (1993), (B) photos correspondantes des cinq types de port sur terrain.....	56
Figure 18 : Les différents types de mutations chlorophylliennes ; (a) albina, (b) xantha, (c) chlorina, et (d) viridis.....	59
Figure 19 : Autres mutations chlorophylliennes ; (e) et (f) feuilles avec bordure jaune, (g) un plant avec une tige de type chlorina et une tige de type viridis.....	59
Figure 20 : Grains de pollen observés sous microscope optique (a) Grains de pollen fertiles et stériles (G10x40), (b) Grains de pollen fertiles (G10x10).....	60
Figure 21 : Fréquence de mutations du port des plants dans la génération M ₂ de pois chiche.....	64
Figure 22 : Path diagramme représentant les relations entre les différents caractères et le rendement en grains dans la génération M ₂ de pois chiche.....	66
Figure 23 : Phénogramme montrant le groupement hiérarchique de 135 familles de pois chiches M ₂ . La distance de Mahalanobis utilisée pour la classification basée sur dix caractères quantitatifs.....	68
Figure 24 : Plantules de mutants putatifs de pois chiche M ₂ et le parent cultivés dans la serre PBGL.....	79
Figure 25 : (A) Collecte des feuilles de pois chiche, (B) Feuilles de pois chiche placées dans des enveloppes et stockées dans une boîte contenant du gel de silice pour l'extraction d'ADN.....	79
Figure 26 : (A). Comparaison qualitative de l'ADN isolé en utilisant deux protocoles différents (protocole d'extraction d'ADN à faible coût avec de la poudre de silice et le kit commercial Qiagen) par électrophorèse sur gel d'agarose.	

(B). Vérification Quantification et qualitative de l'ADN obtenu à l'aide des ADN standards et de visualisation d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

.....	83
Figure 27 : Évaluation en gel d'agarose du test PCR des amorces (4 amorces A1, A3, A7, A11) avec 5 concentrations différentes d'ADN génomique 10, 5, 1, 0,5, 0,1 ng/µl et le témoin TE, ADN du parent Ghab 4 (peigne 1), et l'ADN des plants M ₂ (peigne 2).....	85
Figure 28 : Évaluation en gel d'agarose du test PCR de l'amorce A8 (ca_efg2_2) avec l'AND des plants M2 (1 au 23) et du parent Ghab 4 (P).....	85
Figure 29 : Évaluation sur gel d'agarose de la digestion enzymatique en utilisant l'amorce A2 (ca_erlp_2) avec l'ADN des plants M ₂ (de 1 à 24).....	87
Figure 30 : Évaluation sur gel d'agarose de la digestion enzymatique en utilisant des amorces A3 (ca_erlp_3) avec un mélange d'ADN génomique et d'ADN des échantillons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 des plants M ₂ avec le parent Ghab 4, D1: génotype Desi n°1, D2: génotype Desi n° 2, D3: génotype Desi n°3, P: Ghab 4, D + P: trois génotypes Desi avec le parent Ghab4.....	87

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AIEA : Agence internationale de l'énergie atomique

ANF : facteurs antinutritionnels

C.V. : Coefficient de variation

CELI : nucléase extracellulaire purifiée à partir du céleri

CJE : extrait de jus de céleri

CRISPR: répétitions courtes palindromiques régulièrement entrecoupées et groupées (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)

CODDLE : Codons. Optimisés pour découvrir des lésions délétères (Codons. Optimized to Discover Deleterious Lesions)

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

GA% : gain génétique attendu en pourcentage de la moyenne

GA : Avancement génétique

GCV : Coefficient de variation génotypique

Gy : Gray

H² : héritabilité au sens large

JAS : jours après le semis

LSD : la plus petite différence significative (Least Significant Difference)

Mt : millions de tonnes

MVD : Base de données sur les variétés mutantes (Mutant varieties data base)

NCBI : Centre américain pour les informations biotechnologiques

PBGL : Laboratoire d'amélioration des plantes et de génétique de l'AIEA

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymérase Chain Reaction)

PCV : Coefficient de variation phénotypique

S.D. : Écart-type

S.E. : Erreur standard

SNP: Polymorphisme mono-nucléotidique (*single-nucleotide polymorphism*)

TILLING: Targeting Induced Local Lesions IN Genomes

LISTE DES TRAVAUX REALISES DANS LE CADRE DE CETTE THESE

- **AMRI-TILIOUINE W., LAOUAR M., ABDELGUERFI A., JANKOWICZ-CIESLAK J., JANKULOSKI L. AND TILL B.J.** (2018). Genetic Variability Induced by Gamma Rays and Preliminary Results of Low-Cost TILLING on M₂ Generation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 9:1568, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01568>

- **LAOUAR M., AMRI-TILIOUINE W., TABTI D., JANKOWICZ-CIESLAK J., AND TILL B. J.** (2018). Early assessment of Lentil and Chickpea mutant and evaluation of low cost TILLING on M₂ chickpea. 2018. FAO/IAEA International Symposium on Plant Mutation Breeding and Biotechnology -Vienna, Austria 27 – 31 August 2018 Conference ID: 56061 (CN-263)

- **AMRI-TILIOUINE W., LAOUAR M. AND ABDELGUERFI A.** (2018). Diversité génétique au sein d'une population de mutants de pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Congrès International: Les Rencontres de l'Agriculture et de la Biologie "RAB 2018". Constantine, Algérie, 05-07 mai 2018.

- **AMRI-TILIOUINE W., LAOUAR M. ET ABDELGUERFI A.** (2018). Variabilité Génétique Induite Par Rayonnement Gamma Chez Le Pois Chiche (*Cicer arietinum* L.). Séminaire International SIGRE'2018. ENSA, Alger, Algérie. 01 - 03 octobre 2018.

- **AMRI-TILIOUINE W., LAOUAR M. ET ABDELGUERFI A.** (2016). Determination of gamma radiation lethal dose in two cultivars of Kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Conference on Pulses for Health, nutrition and Sustainable Agriculture in Drylands (ICP 2016). Marrakesh, Morocco, 18-20 April, 2016.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

Les légumineuses à graines occupent une place importante dans l'agriculture mondiale en raison de leur richesse en protéines végétales, de leur large utilisation dans l'alimentation humaine, de leur faible coût de production, de leur capacité de "fixation" de l'azote atmosphérique et de leur transportabilité facile et sûre. Associées aux céréales, elles constituent un régime alimentaire équilibré, une riche source d'énergie, de minéraux et de certaines vitamines. Outre leur valeur nutritionnelle, les légumineuses à graines possèdent la propriété unique de maintenir et de restaurer la fertilité des sols par la fixation biologique de l'azote, ainsi que de conserver et d'améliorer les propriétés physiques des sols grâce à leur système racinaire profond (Kharkwal *et al.*, 1988).

Parmi les différentes légumineuses à graines, le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) ($2n = 2x = 16$) est la deuxième plus grande légumineuse consommée au monde. Il est cultivé dans plus de 55 pays et commercialisé dans 140 pays, sur environ 14 millions d'hectares, avec 96% de la superficie dans les pays en développement (FAO, 2018). C'est la première culture domestiquée dans la région méditerranéenne et le Moyen-Orient.

Le pois chiche est apprécié pour la composition nutritive de ses graines, riches en protéines et utilisées de plus en plus comme substitut aux protéines animales (Shrestha *et al.*, 2011).

Le pois chiche cultivé est classé en deux groupes distincts ; à savoir microsperma ou "Desi" et macrosperma ou "Kabuli". Les deux groupes diffèrent par la forme, la taille et la couleur des graines. Le type Kabuli a été cultivé traditionnellement dans le bassin méditerranéen et en Asie Centrale, tandis que le type Desi a été principalement produit dans le sous-continent Indien, en Afrique de l'Est et en Asie Centrale (Wani *et al.*, 2014).

En Algérie, le pois chiche est l'une des plus importantes légumineuses à graines ; il occupe la deuxième position après la fève, de point de vue superficie cultivée et production. Le marché est très favorable pour le type "Kabuli" avec une consommation moyenne de pois chiche qui est d'environ 5,5 kg/habitant/an et des besoins totaux moyens qui s'élèvent à environ 20 millions de tonnes/an. Au cours de la dernière décennie, la production moyenne de pois chiche était d'environ 24 041 t et les rendements variaient en moyenne, de 500 à 1100 kg/ha (FAO, 2018) ; ce qui est nettement inférieur aux rendements potentiels théoriques qui peuvent dépasser selon Salimath *et al.* (2007) 2 000 kg/ha. En conséquence, l'Algérie est le cinquième plus gros importateur de pois chiche au monde. Ainsi, ces chiffres soulignent la nécessité d'une amélioration génétique de la productivité et d'une plus grande stabilité. Plusieurs

contraintes d'ordre agronomique, climatique, socio-économique et organisationnel limitent cette production (Zeghouane *et al.*, 2016). En effet, le manque de variétés adaptées et productives est l'une des raisons principales d'une faible production. Durant les années cinquante, les travaux de Laumont et Chevassus (1956) sur la variabilité génétique du pois chiche existante en Algérie, ont recensé plus d'une trentaine de variétés. Actuellement, seules onze variétés sont produites pour répondre aux exigences des différentes zones agro-écologiques et faire face aux variations biotiques et abiotiques.

Par ailleurs, à l'instar de nombreuses autres cultures largement cultivées, le pois chiche possède une base génétique étroite résultant de la domestication (Varshney *et al.*, 2010). Parmi les techniques d'amélioration des plantes, la mutagenèse, est une approche efficace et importante pour l'amélioration des légumineuses. La technique de mutation induite a donné de bons résultats pour améliorer les caractères dans une large gamme de cultures. À ce jour, plus de 3 274 variétés de plus de 224 espèces végétales issues de programmes de mutagenèse ont été officiellement publiées, comme indiqué dans la base de données FAO/AIEA sur les variétés mutantes (MVD) (<http://mvd.iaea.org>). Parmi celles-ci, 493 variétés mutantes de légumineuses ont été homologuées avec 27 mutants améliorés de pois chiche mis en culture (Gaur *et al.*, 2007 ; Sagel *et al.*, 2009 ; MVD, 2017). Les mutations peuvent être induites par des mutagènes physiques et chimiques. Parmi les mutagènes physiques, les rayons gamma s'avèrent être la technique la plus fréquemment utilisée pour modifier les gènes, qui sont responsables de 64% des variétés mutantes et induites par le rayonnement (Maluszynski *et al.*, 2000 ; Ahloowalia *et al.*, 2004 ; Jankowicz-Cieslak et Till, 2015). Toutefois, la dose d'un mutagène appliquée est un facteur important à considérer dans tous les programmes de mutagenèse. La détermination de la dose de rayonnement appropriée pour chaque cultivar est d'une importance primordiale dans les études de sélection par mutation.

Les mutations induites ont un grand potentiel d'amélioration du potentiel de rendement du pois chiche grâce à une manipulation efficace des populations mutagénisées (Wani, 2011). L'efficacité de la sélection de la génération M₂ dans les expériences de sélection par mutation a été rapportée dans diverses cultures. Les estimations de paramètres génétiques tels que le coefficient de variabilité phénotypique et génotypique (PCV, GCV), l'héritabilité (H²) et le gain génétique (GA) pour divers caractères quantitatifs sont utiles pour concevoir un programme de sélection efficace. Les coefficients de corrélation et de "Path" sont des prérequis pour l'amélioration de n'importe quelle culture. La connaissance de la corrélation

entre le rendement et ses caractères contributifs est fondamentale pour trouver des directives pour la sélection des plantes. La partition de la corrélation totale, en effet direct et indirect par l'analyse en "Path", aide à rendre la sélection plus efficace (Kozkar, 2014).

Au cours des dernières années, la mutagenèse a reçu une grande attention en tant que méthode de révélation de la fonction des gènes ainsi que pour l'amélioration des caractères. Ceci est dû aux développements dans le domaine de la biologie moléculaire tels que le développement de la méthode de génétique inverse appelée TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) (Mc Callum *et al.*, 2000 ; Kurowska *et al.*, 2011 ; Hunter *et al.*, 2014). C'est une approche de dépistage précoce, efficace pour l'identification des mutations ponctuelles dans les gènes d'intérêt. Le TILLING est généralement appliqué en combinaison avec la mutagenèse chimique parce que cette méthode de découverte de mutation est optimisée pour la récupération des variations de nucléotides simples et de petites et grandes indels (insertions/délétions) et les mutagènes chimiques produisent ces spectres de mutations à haute densité. Cependant, il a été montré qu'il peut également être utilisé dans le balayage de populations mutantes irradiées par des rayons gamma, car il a été rapporté que de petites mutations peuvent être induites sous des traitements d'irradiation gamma (Sato *et al.*, 2006). Depuis la première description de TILLING, à la fin des années quatre-vingt-dix, des projets ont été développés pour plus de 25 espèces (Till *et al.*, 2014 ; Jankowicz-Cieslak et Till, 2016). Le Laboratoire FAO/AIEA d'amélioration des plantes et de génétique (PBGL, Seibersdorf, Autriche) a mis au point une série d'approches peu coûteuses et faciles à utiliser pour la caractérisation moléculaire des plantes mutantes adaptées aux laboratoires des pays en développement. Ces méthodes ne nécessitent pas d'équipements spécialisés et ne dépendent pas de produits chimiques toxiques (Till *et al.*, 2015).

La présente étude s'inscrit dans la partie "Pois chiche" qui s'intègre dans un projet de recherche AIEA ALG5026 dont l'intitulé est "Increasing the Genetic Variability for the Improvement of Strategic Crops (Wheat, Barley, Chickpea and Dates) for Enhanced Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses and the Development of Biotechnology Capacities".

Ainsi à travers cette thèse, nous ciblons comme grand objectif l'augmentation de la variabilité génétique du pois chiche pour des fins d'amélioration.

Le travail de cette thèse consiste, dans un premier lieu, à évaluer la radiosensibilité de deux cultivars de pois chiche de type Kabuli (GP10 et Ghab 4) traités avec six différentes doses de

rayons gamma (150, 200, 250, 300, 350 et 400 Grays) en utilisant du cobalt 60 et à estimer la dose de rayonnement appropriée pour chaque cultivar (DL_{50}/RD_{50}).

Dans un second lieu, ce travail consiste à évaluer la variabilité génétique induite par les rayons gamma au sein de la génération M_2 et à identifier les génotypes qui présentent une amélioration agronomique.

En outre, notre étude vise l'évaluation de l'efficacité de l'utilisation de l'approche de la génétique inverse, TILLING à faible coût, pour découvrir des mutations dans la génération M_2 avec l'utilisation de gènes d'intérêt impliqués dans les principales maladies de pois chiche, *Aschochyta blight* (AB) et *Fusarium wilt* (FW), ainsi que les gènes impliqués dans la floraison précoce.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une synthèse bibliographique sur l'espèce *Cicer arietinum* portant sur l'origine et la taxonomie, la description botanique, l'importance et la situation de la culture en Algérie. Aussi, nous avons abordé l'évolution de l'amélioration des cultures des légumineuses et du pois chiche et les méthodes d'amélioration conventionnelles ainsi que les mutations induites. Par la suite, l'évaluation phénotypique et génotypique, l'identification et la sélection des mutants ont été développées.

Dans le deuxième chapitre, nous avons abordé l'évaluation de la radiosensibilité chez deux cultivars de pois chiche de type Kabuli et la détermination de la dose de rayonnement appropriée pour chaque cultivar (DL_{50}/RD_{50}).

Le troisième chapitre correspond à l'étude de la variabilité génétique au sein de la génération M_2 de pois chiche induite par rayons gamma.

Le quatrième chapitre est consacré à l'évaluation moléculaire de la population M_2 par l'utilisation du TILLING à faible coût.

En finalité, les résultats les plus pertinents ont été repris dans une conclusion générale, tout en mentionnant quelques orientations et perspectives pour les travaux futurs.

CHAPITRE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le pois chiche

1.1. Origine et taxonomie

Le pois chiche est probablement originaire du Sud-Est de la Turquie, dans une petite zone près de la frontière syrienne entre les deux fleuves Tigre et Euphrate. On y trouve trois espèces annuelles sauvages de *Cicer*, étroitement apparentées au pois chiche ; *C. bijugum* K.H. Rech., *C. echinospermum* P.H. Davis et *C. reticulatum* Lad. Cette dernière, pourrait également être classée comme une variété sauvage ou sous-espèce de *C. arietinum* (Van der Maesen, 1987). Ladizinsky et Adler (1976) décrivent et classent *Cicer reticulatum* comme étant une sous-espèce de *Cicer arietinum* L. En utilisant des groupements basés sur la variation des allozymes, Kazan et Muehlbauer (1991) ont conclu que les groupements d'espèces de Ladizinsky et Adler (1976) étaient justes.

L'analyse moléculaire indique également que *Cicer reticulatum* est considérée comme le progéniteur sauvage (Zohary *et al.*, 2012). Par ailleurs, Laumont et Chevassus (1956) signalent la culture du pois chiche depuis la haute antiquité sur les rivages du Bassin Méditerranéen et en Mésopotamie, puis cette culture s'étendit à l'Inde et à l'ensemble de toute l'Asie. Helbaek (1970) rapporte que les découvertes archéologiques montrent que la culture du pois chiche date de plus de 5 450 ans avant .J.C. (Van der Maesen, 1987).

1.2. Description botanique du pois chiche

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) appartient à la famille des Fabacées, sous famille de Papilionoideae, et à la tribu de Cicéreae. Le genre *Cicer* se compose de 44 espèces, dont 35 espèces vivaces et huit espèces sauvages annuelles, et un pois chiche domestiqué, *Cicer arietinum* L. (Van der Maesen *et al.* 2007 ; Toker, 2009).

Le genre *Cicer* L. (Leguminosae, Cicéreae) a été classé par Popov (1929), qui a reconnu quatre sections Monocicer M. Pop., Chamaecicer M. Pop., Polycicer M. Pop., et Achantocicer M. Pop., en deux sous-genres (Pseudononis M. Pop et Viciastrum M. Pop.). Le genre a ensuite été révisé par Van der Maesen (1977) qui a ajouté des informations taxonomiques. Bien que le genre ait d'abord été classé dans la tribu Vicieae Alef., il a ensuite été classé par Kupicha (1977) en la tribu monotypique Cicéreae Alef., sous-famille Papilionoideae, famille Leguminosae. Il a été montré récemment que le genre *Cicer* comprend 42 espèces, dont 9 annuelles et 33 vivaces (Coles *et al.* 1998 ; Robertson *et al.* 2000).

Chickpea, le nom anglais de *Cicer arietinum* L. est également connu sous les noms communs ; Bengal gram (Inde), Garbanzo (Amérique latine), Hommes et Hamaz (Monde Arabe), Nohud et Lablabi (Turquie), Pois chiche (français) et Shimbra (Éthiopie) (Muehlbauer et Singh, 1987). Au même titre que la fève et les haricots, le pois chiche est une graine « protéagineuse » cultivée pour sa richesse en protéines (Ofal, 2011).

Le pois chiche est une plante annuelle herbacée, diploïde ($2n = 16$ chromosomes), autogame, présentant moins de 1% d'hybridation naturelle (allogamie). La taille de son génome est de 738 Mbp (Varshney *et al.*, 2013).

Le système racinaire est du type pivotant et très développé pouvant aller jusqu'à plus de 1 m de profondeur, et porte des nodosités fixatrices d'azote. La tige est plus ou moins ramifiée à port dressé ou rampant, dont la hauteur varie de 20 cm à 1 m. Les feuilles sont pseudo-imparipennées et la fleur est solitaire présentant les caractéristiques de la famille des Papilionacées (Fig. 1). Les gousses de forme ovale à réniforme mesurent entre 15 et 30 mm de long sur 8 à 15 mm de large et portent de 1 à 3 graines (Saxena, 1987). Toute la partie verte de la plante est pubescente dont les poils glandulaires sécrètent des exsudats acides, principalement de l'acide malique (Cubero, 1987).

Il existe deux types distincts de pois chiche cultivé, Kabuli ou "macrosperma" et Desi ou "microsperma" (Singh, 1987 ; Toker *et al.*, 2014). La distinction entre les deux types se fait sur la base de la taille et de la coloration des graines, des fleurs et des plantes (Fig. 1).

Le type Kabuli a généralement de grosses graines arrondies et blanches ou crèmes, qui pèsent plus de 26 grammes pour 100 graines.

Les plantes de type Kabuli sont grandes et dépourvues de pigmentation pourpre ou violette des feuilles, des fleurs, des tiges et des gousses.

Le type Desi a généralement des graines qui ont moins de 26 grammes pour 100 graines et ont un aspect rugueux et anguleux. La coloration peut varier du brun clair au noir avec toutes les nuances intermédiaires. Les graines sont souvent tachetées.

Même si les types Kabuli et Desi sont généralement distingués par la taille des graines et la coloration des graines, certains types de Kabuli sont plus petits que 26 grammes pour 100 graines et certains types de Desi sont plus grands que 26 grammes pour 100 graines (Muehlbauer and Rajesh, 2008). Toker (2009) a rapporté que le pois chiche Kabuli pourrait provenir du mutant spontané de *C. reticulatum*.

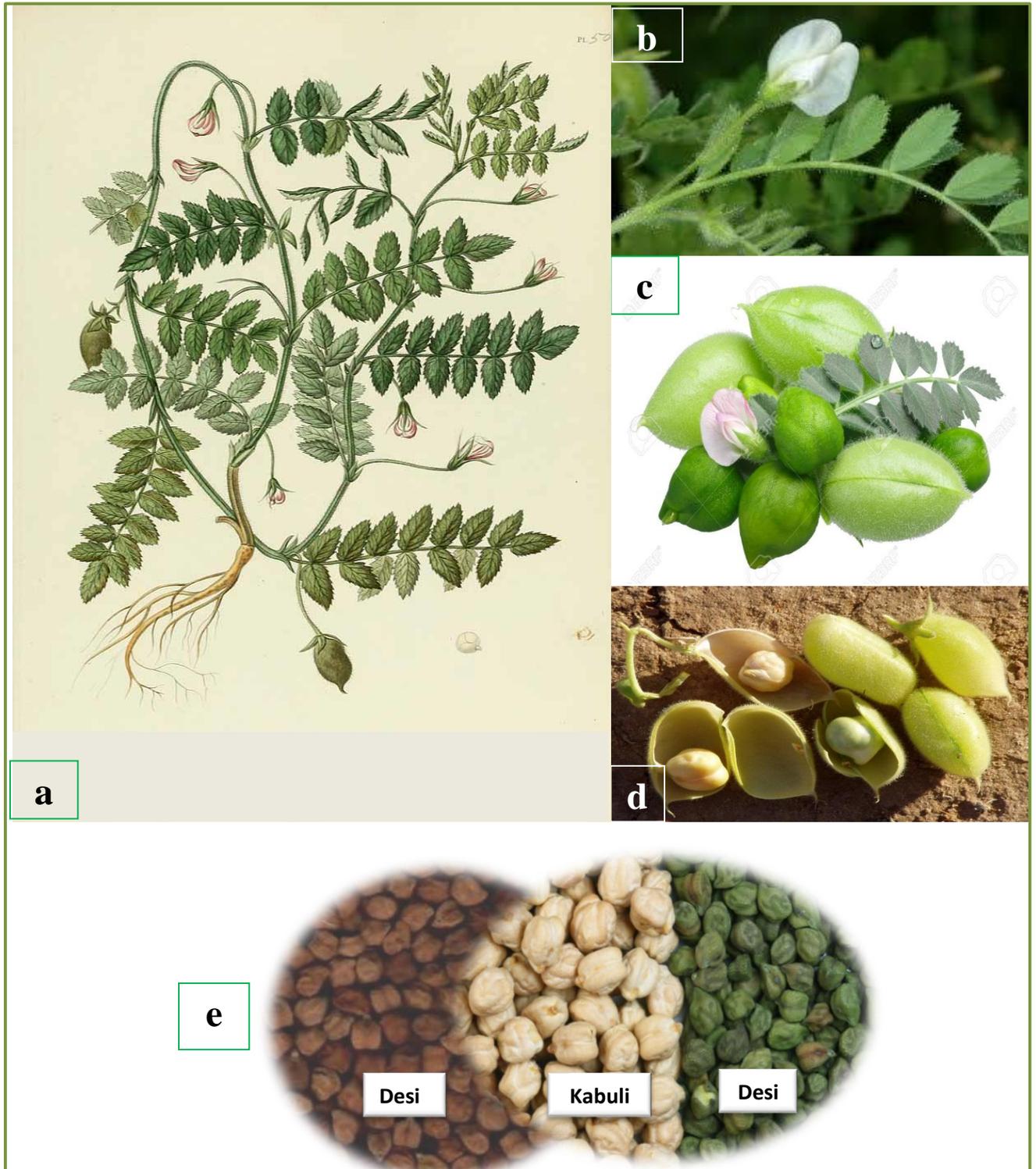


Fig. 1. Caractéristiques morphologiques du pois chiche (*Cicer arietinum* L) : (a) aspect général de la plante, (b) fleurs et feuilles, (c) gousses et graines immatures, (d) gousses ouvertes, (e) graines des deux types Kabuli et Desi.

Sources : photo (a) <https://booksofdante.files.wordpress.com>, photo (c) <https://fr.depositphotos.com>, photos (b, d et e) <https://www.feedipedia.org>

Il existe un troisième type intermédiaire appelé **Gulabi**, il a été identifié par ses grains lisses de couleur claire, ressemblent à celle du pois avec un bec (Wery, 1986). Le type Kabuli est essentiellement cultivé et consommé dans le pourtour méditerranéen, en Amérique du Sud et en Asie du Sud-Est, tandis que le type Desi, qui constitue 85 % de la production mondiale, fait partie des habitudes alimentaires de l'Inde. Il est également cultivé et consommé en Ethiopie, en Iran, au Canada, au Mexique et en Australie (FAO, 2016).

1.3. Importance de la culture du pois chiche

1.3.1. Importance économique

Le pois chiche est la deuxième plus grande légumineuse consommée au monde après le haricot commun. Il est cultivé dans plus de 50 pays et commercialisé dans 140 pays (Gaur et al., 2014) ; il est considéré comme une source essentielle de protéines dans de nombreux pays, en particulier dans le Sud et l'Ouest de l'Asie et en Afrique du Nord.

En 2018, au niveau mondial, plus de 14 millions d'hectares de terres agricoles ont été consacrés à la culture de pois chiche. La production de cette légumineuse a augmenté au cours des années 2006-2016 pour atteindre plus de 12 millions de tonnes. L'Asie reste le principal producteur de pois chiche avec 84,6% (9,310 Mt), suivi de l'Afrique 5,4% (0,598 Mt), ensuite l'Océanie 4,8% (0,528 Mt), puis l'Amérique du Nord et Centrale 3,9% (0,425 Mt) et enfin l'Europe 1,3% (0,138 Mt) (FAO, 2017).

L'Inde est, de loin, le principal producteur de pois chiche avec 72% (7,17Mt) de la production mondiale en 2016, soit dix fois plus que l'Australie qui est le deuxième plus grand producteur mondial. Les autres principaux producteurs de pois chiche au monde sont le Pakistan, la Turquie, le Myanmar, l'Éthiopie, l'Iran, le Mexique, le Canada et les Etats Unis d'Amérique (FAO, 2017). Bien que l'Inde soit le plus grand producteur de pois chiche dans le monde, il représente également le plus gros importateur, représentant environ un quart du volume total des importations mondiales. Le Bangladesh, l'Espagne, l'Algérie, les Émirates Arabes Unis, l'Espagne et le Pakistan figurent parmi les principaux pays importateurs de pois chiche. Tandis que les principaux pays exportateurs sont : l'Australie, l'Inde, le Mexique, l'Argentine, l'Éthiopie, le Canada, les États-Unis d'Amérique, la République-Unie de Tanzanie, les Émirates Arabes Unis et la Turquie (FAO, 2015).

1.3.2. Importance alimentaire

Les légumineuses sont une source importante de nourriture et lorsqu'elles sont combinées avec des céréales, elles fournissent une composition d'acides aminés équilibrée de point de vue nutritionnelle avec un rapport proche de l'idéal pour les humains (Wood and Grusak, 2007). Actuellement, la consommation fréquente de légumineuses est recommandée par la plupart des organismes de santé (Leterme, 2002). Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande une consommation de 80 g/jour par personne de légumineuses (Yadav *et al.*, 2007). Les nutritionnistes, également, recommandent vivement l'introduction des légumineuses comme le pois chiche dans l'alimentation humaine au vu de nombreux avantages nutritionnels de cette ressource alimentaire (Ravi et Bhattacharya, 2004). Le pois chiche est une excellente source de protéines, de glucides complexes, de fibres, de lipides, de vitamines et de minéraux (Wood and Grusak, 2007). Toutefois, la qualité nutritionnelle des graines peut varier en fonction du facteur génétique (variété), de l'environnement, du climat, de la nutrition du sol, de la biologie du sol, des pratiques culturales et des facteurs de stress biotiques et abiotiques (Singh *et al.* 1982 ; Rupperez, 1998).

La teneur en protéines de la graine de pois chiche varie de 16,7% à 30,6% et de 12,6% à 29,0% pour les types Desi et Kabuli respectivement. Elle est généralement 2 à 3 fois plus élevée que celle des céréales. La teneur totale en lipides des types Desi et Kabuli varie de 2,9% à 7,4% et de 3,4% à 8,8% respectivement. Les hydrates de carbone sont la principale composante nutritionnelle de cette espèce, avec 51 à 65% pour le type Desi et 54 à 71% pour le type Kabuli. Le pois chiche contient plusieurs vitamines hydrosolubles comme les vitamines du complexe B et la vitamine C, ainsi que plusieurs vitamines liposolubles comme la vitamine A, la vitamine E et la vitamine K. Il contient moins de 0,04% et 0,09% de tanins condensés dans les types Kabuli et Desi, respectivement. Pour ce qui est des teneurs en minéraux, le pois chiche est très riche en phosphore et en magnésium. 100 g de graines fournissent en moyenne 394 à 451,5 mg de phosphore, 994,5 à 1060 mg de potassium, 4,5 à 5,5 mg de fer, 3,4 à 4,1 mg de zinc, 147 à 169 mg de magnésium et 82 à 165 mg de calcium (Wang *et al.*, 2010).

En général, le pois chiche contient peu de facteurs antinutritionnels (ANF) et peut jouer un rôle dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies chroniques. Il a été ainsi associé à la prévention de maladies cardiovasculaires, à la gestion du diabète de type 2 et à l'abaissement des taux de cholestérol (Wood and Grusak, 2007 ; O'Neil *et al.*, 2014). Les

fibres insolubles de ces graines ont été associées à la réduction de l'incidence du cancer du côlon, alors que les fibres solubles ont un effet bénéfique sur la perte de poids (Agriculture and Agri-Food Canada, 2006).

En effet, le pois chiche est destiné, en sa majeure partie, pour la consommation humaine et les débris de culture sont utilisés pour le bétail comme fourrage (Upadhyaya *et al.*, 2001). Par ailleurs, la plante entière, la graine et la paille peuvent aussi être utilisées dans l'alimentation des ruminants et de la volaille. Chez cette dernière, la farine du pois chiche (type Kabuli) est meilleure, sur le plan nutritif, que celle du pois protéagineux. Elle peut bien être incorporée dans les aliments complets des jeunes et des adultes (Hamadache, 2014).

1.3.3. Importance agronomique et environnementale

Le pois chiche est, non seulement, une source importante de protéines dans les régimes alimentaires humains, mais aussi, il joue un rôle important dans le maintien de la fertilité du sol, en particulier dans les terres arides en fixant l'azote atmosphérique. Le pois chiche obtient une proportion significative de son besoin en azote grâce à la fixation symbiotique de l'azote (Kantar *et al.* 2007). Il peut fixer plus de 140 kg/ha d'azote atmosphérique et satisfaire plus de 80% de ses besoins en azote (Saraf *et al.* 1998). De ce fait, il constitue un bon précédent dans les rotations culturales, surtout avec les céréales.

Il est cultivé sur une large gamme de zones bioclimatiques qui s'étendent du subtropical, l'Inde et le Nord-Est de l'Australie, aux zones arides et semi-arides des régions du bassin méditerranéen et de l'Australie Méridionale (Siddique *et al.*, 1999 ; Singh, 1997). En pratique, environ 90% des cultures de pois chiche sont cultivées dans des conditions pluviales sans dépendre de l'irrigation (Kumar et Abbo, 2001). Ses besoins en eau sont limités en zone méditerranéenne, ne dépassant pas 300 mm. Il peut même produire un rendement intéressant (de 9 à 30 qx/ha avec une pluviométrie de 100 à 240 mm bien répartie (Singh et Bushan, 1979 ; Hamadache, 2014). Il est considéré comme étant une culture bien adaptée aux régions sèches (Street *et al.*, 2008).

Dans la région méditerranéenne, le pois chiche peut être conduit comme culture principale en hiver ou comme culture dérobée au printemps. Il s'adapte aux divers environnements physiques : sols riches ou pauvres, climat secs ou humides (Hamadache, 2014). Le pois chiche est une plante sécrétant de l'acide malique, ce qui induit d'une part une répulsion vis-à-vis

des insectes et d'autre part, il favorise une « résistance naturelle » de la plante, limitant les applications de produits phytosanitaires (Fabre, 2008).

2. Situation de la culture du pois chiche en Algérie

2.1. Production et importation

Le pois chiche occupe la deuxième position après la fève-fèverole en surface cultivée. La majeure partie des superficies cultivées de cette espèce est concentrée dans la région Nord-Ouest du pays, particulièrement, dans les régions d'Ain-Temouchent, Tlemcen, Mostaganem, Mascara et Sidi Bel Abbès. Au cours des années de 2013 à 2017, la superficie réservée à la culture du pois chiche en Algérie était de 31,84% de la superficie totale réservée aux légumineuses alimentaires (DSASI, 2013-2017) qui est de 100 407 ha. Ces dernières années, la superficie du pois chiche a augmenté passant de 20 681 ha durant l'année 2007 à 33 295 ha durant l'année 2014 ; par la suite, elle a connue une régression constante durant les années 2015 et 2016 avec plus de 5 000 ha. Concernant les productions, elles fluctuent d'une année à l'autre. Les productions les plus importantes ont été observées durant les années 2012-2014, avec une production maximale en 2014 de 351 180q. Durant les deux années 2015 et 2016, une nette régression a été notée et estimée à plus de 15 000q (Fig. 2).

Au cours de la décennie 2007-2017 le rendement est passé d'environ 6 q/ha à plus de 10 q/ha.

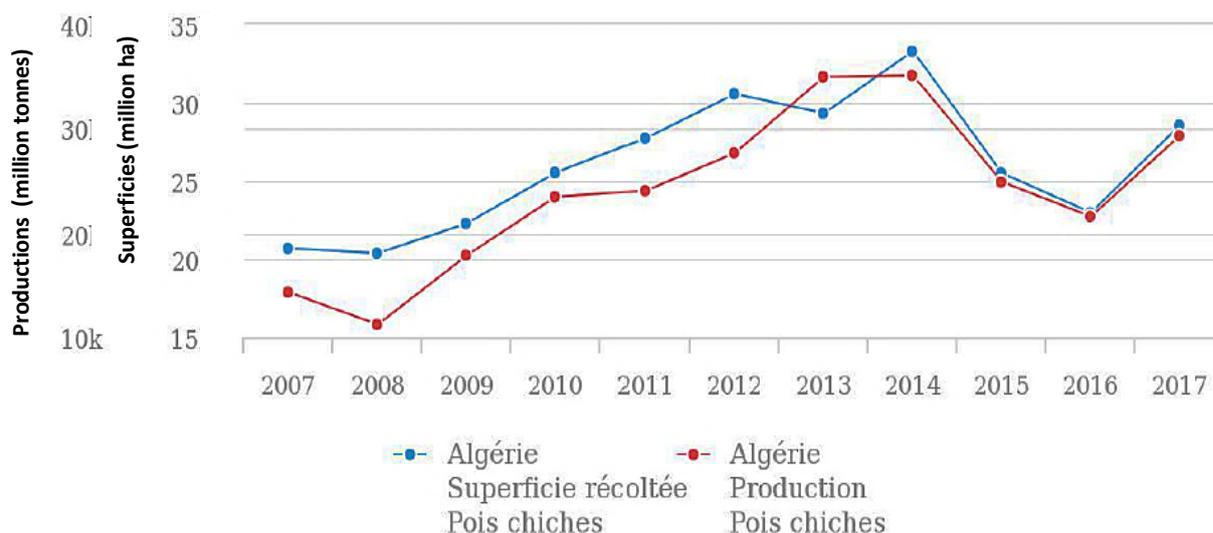


Fig. 2. Évolution des superficies emblavées et de la production du pois chiche entre 2007 et 2017 (Faostat, 2019).

Cependant, la production nationale est très faible, irrégulière et ne peut satisfaire qu'une petite partie de la consommation locale croissante. En conséquence, afin de combler le déficit de la production en pois chiche, l'Algérie fait recours à des importations massives, de l'ordre de 66 000 tonnes, soit plus de 200% de sa production (Madrid *et al.*, 2015).

2.2. Zones de productions

En Algérie, la culture de pois chiche est présente dans nos systèmes agraires, associée aux céréales depuis fort longtemps (Zine *et al.*, 2015). Le pois chiche est actuellement cultivé dans les zones de culture du blé dur, c'est-à-dire les zones où la pluviométrie annuelle moyenne est supérieure à 400 mm. Il s'agit de la zone Nord-Ouest (Ain Témouchent, Tlemcen, Sidi Bel-Abbès, Mostaganem, Mascara), du Nord-Est (Guelma, Skikda) et le Centre (Bouira, Chlef, Ain Defla). Les wilayas dont les superficies sont les plus importantes sont situées au Nord-Ouest. En effet, à elles seules, celles d'Ain Témouchent, Tlemcen, Mostaganem, Mascara et Sidi Bel-Abbès, représentent 16 092 hectares, soit, 56,3% de la superficie nationale totale (28 553 ha) occupée par cette espèce, durant la campagne agricole 2016/2017, suivie par les wilayas de la région Nord-Est, avec 20,4 % et le Centre avec 17 % (Zeghouane, 2018). L'ITGC, en 2010, a déterminé les régions d'aptitude à la culture du pois chiche (Fig. 3).

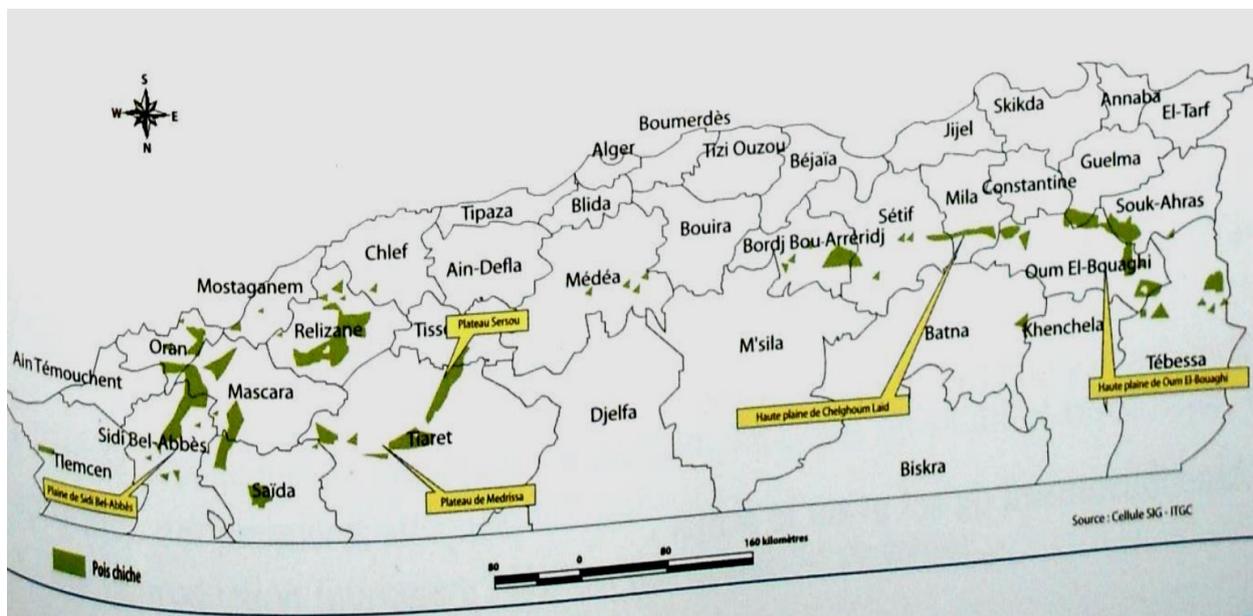


Fig. 3. Zones d'aptitude à la culture du pois chiche (ITGC, 2010)

2.3. État de la diversité en Algérie

Les travaux réalisés dans les années cinquante par Laumont et Chevassus (1956), sur l'amélioration du pois chiche en Algérie, ont permis de décrire une collection constituée d'une trentaine de variétés locales. Au cours des années soixante-dix, Anthelme *et al.*, (1978) ont évalué la diversité variétale de 11 cultivars locaux (Cunin 11, Issers 537, ATEC 10, Tessallah, Oran précoce, Misserghin, rabat 57, Ain Témouchent 161 et Abdellys). Zaghouane (1997) a mentionné que les cultivars locaux, utilisés par les agriculteurs depuis longtemps, sont des variétés rustiques de printemps qui s'adaptent bien aux conditions locales ; ils possèdent un grain de bonne qualité et très apprécié par le consommateur. Cependant, ils se caractérisent par une faible productivité et une sensibilité élevée aux stress biotiques et abiotiques. A cause de ces facteurs limitants, ces variétés sont de plus en plus délaissées et remplacées par des variétés nouvellement introduites. En conséquence, une érosion importante a été remarquée sur les cultivars locaux de pois chiche. Les introductions massives, d'une part, des semences étrangères et, d'autre part, des graines pour la consommation ont contribué aussi pour beaucoup dans la perte du matériel végétal local (Zine-Zikara, 2015). Actuellement, 70% des variétés introduites en milieu producteur et produites par les agriculteurs en Algérie, ont été le produit de coopération technique avec l'ICARDA (Tab. 1). Ces variétés ont été sélectionnées pour leur précocité, leur tolérance à l'antracnose et au froid et aussi pour la qualité du grain (Zeghouane, 2018).

Tab.1. Liste des variétés de pois chiche en production en Algérie (Zeghouane, 2018 et ITGC, 2018).

Espèce	Nombre de variétés	Liste des variétés	Observation
Pois chiche	11	El Ogbane, Beni Hmiden, Souagui, Makerra, Beni Aziz, Tessala, Seraidi, Oued Rhumel, Ain Zada, Tafna, Djebel Fernan.	Variétés introduites de l'ICARDA, nouvellement produites en semences et commercialisées.

2.4. Contraintes liées à la production de pois chiche

Le pois chiche est cultivé principalement comme culture de précipitation, en hiver dans les climats subtropicaux et au printemps dans la région méditerranéenne et les climats tempérés. Il est l'unique légumineuse à graines conduite en culture pluviale de printemps dans le bassin méditerranéen (Bamouh *et al.*, 2002). En conséquence, les grandes fluctuations dans la quantité et la distribution des pluies limitent sa productivité, cette culture se trouve donc

exposée à la sécheresse durant sa phase de reproduction et aux gelées printanières (Labdi, 1990). Les différentes contraintes biotiques dont souffre cette culture sont l'antracnose causée par *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., la fusariose vasculaire causée par le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, la pyrale (*Helicoverpa* spp.) et la mineuse des feuilles (*Liriomyza cicerina*) et les mauvaises herbes.

Pour les cultures d'hiver, la maladie de l'antracnose est considérée comme le facteur le plus important limitant le rendement qui peut causer la perte totale de la récolte. Ainsi, l'introduction de semis d'hiver dans le bassin méditerranéen nécessite le développement de cultivars avec une meilleure résistance à l'antracnose et à la fusariose vasculaire. Outre ces contraintes biotiques et abiotiques ; la non-maîtrise et le non-respect des techniques culturales, et les pertes pendant la récolte sont souvent parmi les causes de la faiblesse de la productivité du pois chiche en Algérie.

3. Évolution de l'amélioration chez le pois chiche

Au cours des années, d'importants progrès dans l'amélioration variétale de pois chiche ont été enregistrés et un nombre important de variétés améliorées ont été commercialisées dans le monde. Les principales étapes d'un programme d'amélioration sont : la création de variation génétique, la sélection au sein de cette variation et l'évaluation des lignées sélectionnées. Ainsi, la variation génétique constitue la base d'un programme de sélection. Le succès d'un programme d'amélioration dépend de la nature et de l'ampleur de la variabilité (Salimath *et al.*, 2007).

3.1. Méthodes d'amélioration conventionnelles

L'amélioration conventionnelle (amélioration classique ou traditionnelle) est le développement de nouvelles variétés (cultivars) de plantes en utilisant des outils plus anciens et des processus naturels, par opposition aux outils plus récents, plus compliqués d'amélioration moléculaires des plantes (Jain et Kharkwal, 2004).

Dans l'amélioration conventionnelle, les sélectionneurs assemblent les caractères souhaitables de plantes différentes, mais habituellement étroitement apparentées dans le nouveau cultivar en utilisant les techniques de croisement (hybridation) (Acquaah, 2012). Par conséquent, le produit de l'amélioration conventionnelle ne fait que souligner les caractères cibles qui

préexistent au potentiel génétique de l'espèce, sans introduire de nouveaux gènes (Jakowitsch *et al.*, 1999).

La sélection conventionnelle s'est concentrée donc sur l'amélioration du rendement du pois chiche grâce à une sélection rigoureuse de ses composantes. Actuellement, les objectifs de sélection des améliorateurs de pois chiche sont : (1) un rendement plus élevé, (2) une adaptabilité plus large, (3) une résistance aux stress abiotiques, y compris la sécheresse et (4) une résistance aux stress biotiques (Maqbool *et al.*, 2017). Le succès d'un programme d'amélioration dépend de la nature et de la grandeur de la variabilité. La création de la variation génétique devient cruciale pour un programme d'amélioration réussi, à travers : l'introduction de cultivars et de matériel provenant d'autres sources de ségrégation à l'intérieur ou à l'extérieur du pays, l'hybridation et la mutation (Salimath *et al.*, 2007).

L'objectif de l'hybridation est de combiner les traits souhaitables de deux parents ou plus en un seul cultivar. Le succès ou l'échec d'un programme d'hybridation est en grande partie déterminé par le bon choix des parents (Salimath *et al.*, 2007 ; Maqbool *et al.*, 2017). La plupart des programmes d'amélioration de pois chiche se sont limités à l'hybridation intra spécifique qui comprend des croisements Desi × Desi, Kabuli × Kabuli ou Desi × Kabuli. Les croisements entre les parents Desi et Kabuli ont été largement utilisés pour exploiter les gènes présents dans un groupe. Par exemple, les parents Desi ont apporté des gènes importants pour la résistance à la fusariose et à l'antracnose ainsi qu'à la tolérance à la sécheresse pour le type Kabuli. Dans les programmes de sélection de type Desi ; inversement, les parents Kabuli ont été une source de qualité de semences améliorées, en particulier la grande taille des graines. Les croisements Desi × Kabuli ont toujours produit des progénitures à haut rendement et ils ont été la source de nombreux nouveaux cultivars (Yadav *et al.*, 2004). En outre, des efforts ont été faits pour utiliser des croisements interspécifiques pour améliorer la variabilité génétique et l'introgession de gènes utiles dans le cultigène provenant de *Cicer spp.* sauvage (Gaur *et al.*, 2007).

Par ailleurs, le croisement chez le pois chiche est un travail fastidieux et le succès de l'hybridation artificielle varie de 10% à 50% selon les conditions météorologiques ; en particulier, la température et l'humidité, en plus des génotypes impliqués. Etant donné que les fleurs de pois chiche sont petites et délicates, l'émasculation et la pollinisation provoquent généralement des dommages aux parties florales, réduisant ainsi le taux de réussite (Salimath *et al.*, 2007). La méthode "pedigree" (généalogique), n'est pas pratiquée actuellement dans sa

forme originale, car elle est lourde et ne peut traiter qu'un nombre limité de croisements. Cependant, la méthode "bulk" est maintenant la méthode de sélection la plus couramment utilisée chez le pois chiche après l'hybridation. Toutefois, la méthode de la descendance d'un seul grain (Single Seed Descent SSD) est couramment utilisée (Gaur *et al.*, 2007).

3.2. Mutagenèse induite

Il y'a différentes voies pour accroître la variabilité génétique, selon qu'on recherche une meilleure valeur intrinsèque des allèles, ou un meilleur arrangement ou encore un meilleur dosage (Demarly, 1977 ; Lafon *et al.*, 1987 ; Vilain, 1989). Les mutations naturelles présentant un intérêt économique sont relativement rares (10^{-6} et 10^{-8}), on recherche à augmenter leur fréquence artificiellement par l'utilisation des agents mutagènes (Geneves, 1988 ; Gauthier, 1991 ; Kharkwal, 2011). La mutagenèse qui induit une variation nouvelle directement dans la forme évoluée est un instrument rapide qui peut être efficace (Fossati, 1972). Elle peut apporter à une espèce ou à une variété, un surcroît de variabilité génétique exploitable (Deshayes et Cornu, 1980). Plusieurs milliers de variétés dérivent de mutations induites, surtout à la suite d'irradiation. Les mutations ainsi obtenues peuvent être utilisées directement lorsqu'on cherche à améliorer un ou quelques caractères aisément identifiables et à déterminisme simple (Herve, 1976). L'intérêt pratique de la mutagenèse ne se limite pas uniquement à l'obtention de mutants progressifs, ceux-ci, ainsi que tout mutant porteur d'un caractère amélioré, peuvent aussi être intégrés dans un programme d'hybridation (Moes, 1959).

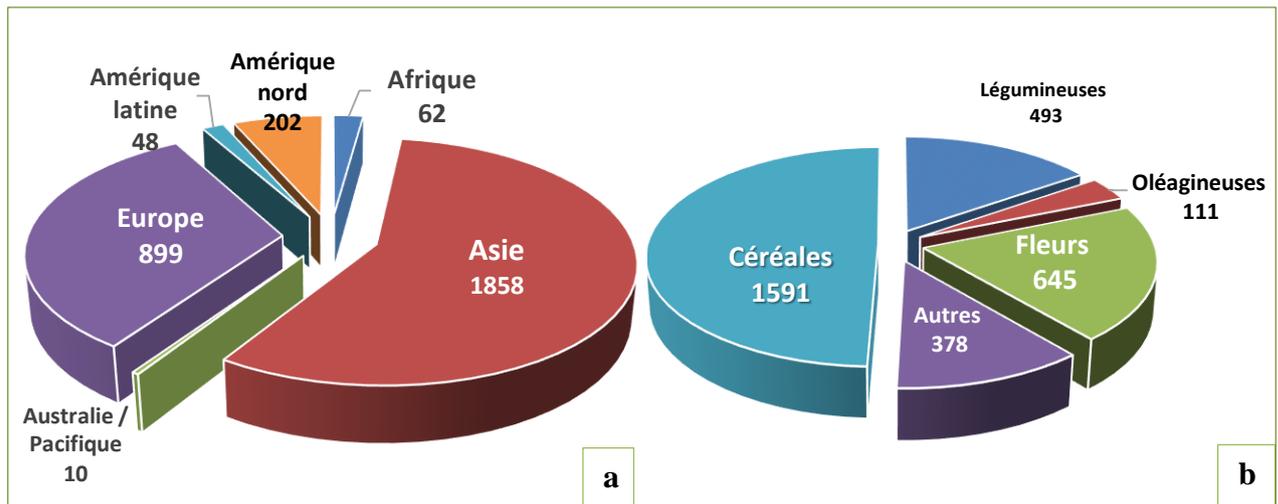
3.2.1. Approche historique sur les mutations induites

Le terme "mutation" a été proposé pour la première fois en biologie par Hugo de Vries (1848-1935). En 1901 il publie "La théorie de la mutation – Essai et observations sur l'origine des espèces dans le règne végétal". Pour Hugo de Vries, les mutations sont responsables de l'apparition de nouvelles espèces. La plus ancienne description de mutants spontanés est apparue vers 300 ans av. J.-C. en Chine et a elle été décrite spécialement dans les cultures céréalières dans un livre "Lulan" (van Harten, 1998), tandis que Muller (1927) a découvert des mutations induites chez *Drosophila melanogaster* L.). Après la découverte de mutations induites par les rayons X, Stadler (1928) a confirmé la puissance des rayons X pour induire une mutation et a montré son application à l'orge (*Hordeum vulgare* L.). L'induction artificielle de mutations par des rayonnements ionisants remonte donc au début du XXe siècle,

mais il a fallu attendre une trentaine d'années pour démontrer que ces mutations pouvaient servir à la sélection des plantes. Les premières tentatives faisaient appel, la plupart du temps, aux rayons X. Par la suite, les rayons gamma et les neutrons ont pris la relève au fur et à mesure que ce type de rayonnements pouvait être couramment obtenu dans les centres d'étude nucléaire. Vers le milieu des années 60, la section de la sélection des plantes du Laboratoire d'agronomie de l'AIEA a été créée à Seibersdorf dans la banlieue de Vienne pour venir en aide au programme de la Division mixte FAO/AIEA sur l'amélioration génétique des plantes cultivées. Les phytogénéticiens ont été encouragés à utiliser des techniques de mutation à des fins bénéfiques (Novak et Brunner, 1992).

3.2.2. La mutagenèse dans l'amélioration des cultures

Les premiers succès en amélioration des cultures ont été obtenus en exploitant des mutants spontanés (naturels). L'exemple le plus connu est le déploiement de mutants semi-nains de blé et de riz dans la "Révolution Verte" entre 1965 et 1980. Des rendements sans précédent ont été obtenus, ce qui a permis de résoudre de nombreux problèmes de sécurité alimentaire dans les pays en développement à l'époque. Plusieurs exemples importants de mutants spontanés peuvent être cités : le maïs à faible teneur en lignine (en 1920), le lupin doux et non toxique (en 1942), les mutants de bourgeons dans de nombreuses fleurs, plantes ornementales et arbres fruitiers (Forster and Shu, 2011). Le premier exemple d'une variété obtenue par mutation induite est celui du tabac vert pâle, var. Chlorina, obtenue en Indonésie en 1936. Au cours des six dernières décennies, des milliers de nouvelles variétés de cultures mutantes ayant des caractères agronomiques améliorés ont été développées par des mutations induites dans le monde entier (Jain et Maluszynski, 2004). Plus de la moitié des variétés mutantes se trouvent en Asie, 1858 variétés notamment en Inde, Japon et Chine, suivie par l'Europe (899 variétés), l'Amérique du Nord (202 variétés), l'Afrique (62 variétés), l'Amérique latine (48 variétés) et l'Australie/Pacifique (10 variétés) (Forster and Shu, 2011) (Fig. 4 a). Une grande variabilité génétique a été donc induite par divers mutagènes dans différentes espèces cultivées qui ont entraîné, de par le monde, le développement de plus de 3 274 variétés mutantes pour environ 224 espèces végétales, comme indiqué dans la base de données FAO/AIEA sur les variétés mutantes (MVD) (<http://mvd.iaea.org>) (Fig. 4 b).



Parmi les variétés mutantes, la majorité sont

Fig. 4. Variétés mutantes enregistrées par continent (a) et par type de culture (b) (FAO/AIEA, 2014).

des cultures vivrières économiquement importantes, comme le riz, le blé, le coton, le colza, le tournesol, le sésame, le pamplemousse et la banane, contribuant à une sécurité alimentaire dans le monde (Gulfishan *et al.*, 2015).

Les rayons gamma étaient la technique la plus fréquemment utilisée pour modifier les gènes chez 64% des variétés mutantes induites par le rayonnement (Maluszynski *et al.*, 2000 ; Ahloowalia *et al.*, 2004). Par ailleurs, les mutants induits sont disponibles gratuitement pour les programmes d'amélioration des cultures, sans restriction quant à leur utilisation, contrairement aux variétés végétales protégées (Gulfishan *et al.*, 2015).

De nombreux mutants ont été créés en tant que nouvelles variétés et beaucoup d'autres ont été utilisés comme parents pour créer des variétés présentant des caractéristiques améliorées tels qu'un rendement amélioré, une qualité meilleure, une absorption accrue de certains métaux, un enracinement plus profond et une résistance aux stress biotiques et abiotiques (Gulfishan *et al.*, 2015). "Diamant", un cultivar mutant de l'orge, a été utilisé pour la reproduction de plus de 150 cultivars d'orge dans le monde entier (Ahloowalia *et al.*, 2004).

Kharkwal et Shu (2009), dans leur publication sur la contribution des variétés mutantes cultivées dans le monde à la sécurité alimentaire, ont conclu que les variétés mutantes contribuent de manière significative à assurer la sécurité alimentaire et nutritionnelle en renforçant la résistance aux facteurs biotiques et abiotiques. D'autre part, les populations de mutants ont également été utilisées comme ressource pour la génomique et l'amélioration moléculaire (Gulfishan *et al.*, 2015).

3.2.3. L'amélioration par mutation chez les légumineuses et le pois chiche

L'amélioration par mutation est très utile chez les légumineuses car la variabilité du matériel génétique est faible. Plusieurs mutagènes physiques et chimiques (rayons gamma, rayons X, EMS et autres) ont été utilisés pour induire cette variabilité et développer de nouvelles variétés chez les légumineuses. Cependant, la majorité des variétés ont été développées grâce aux rayons gamma (Solanki *et al.*, 2011). "Sanilac", une variété du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.), a été le premier mutant de légumineuse créé au Michigan en 1956 (van Harten, 1998). À l'échelle mondiale, jusqu'à présent, 493 variétés de légumineuses ont été obtenues et sont en culture commerciale. Ce sont le soja (173), l'arachide (76), le haricot mungo (39), le pois chiche (27), la lentille (18), le niébé (13), le haricot urd (*Vigna mungo*) (9), le pois d'angole (7) et autres (138) (<http://mvgs.iaea.org>, avril 2017).

Chez le pois chiche, des travaux d'induction de mutation ont probablement été initiés dans le sous-continent Indien (Sharma et Varshney, 1999). Les travaux ont été encouragés par les projets FAO/AIEA afin de créer des variations utiles (Khan et Shakoor, 1977 ; Shaikh, 1977 ; Sharma et Kharkwal, 1982 ; Shaikh *et al.*, 1983 ; Haq *et al.*, 1986). Ces travaux ont créé de nombreuses mutations uniques à utiliser dans les programmes de sélection végétale. La première variété issue de mutation M-699 (Hyprosola) a été obtenue en 1981 au Bangladesh (Wani *et al.*, 2014).

Les détails de certaines variétés améliorées de pois chiche mises au point à la suite de mutations induites sont donnés en annexe 1. Plus de 150 mutants de pois chiche ont été mentionnés dans la littérature jusqu'à ce jour. Des problèmes particuliers de pois chiche ont été résolus par l'intermédiaire de l'amélioration par mutation. Par exemple, M16119 est à la fois tolérant au froid et résistant à l'antracnose (Haq et Singh, 1994). Certains mutants de pois chiche (CM 88 et CM 98) pourraient entraîner des gains de 9,6 millions de dollars au Pakistan (Ahloowalia *et al.*, 2004).

3. 2.4. Types de mutations, agents mutagènes et dose

3.2.4.1. Types de mutations

Les mutations peuvent être largement divisées en mutations intragéniques ou ponctuelles (survenant dans un gène de la séquence d'ADN), en mutations intergéniques ou structurelles au sein des chromosomes (inversions, translocations, duplications et délétions) et en mutations conduisant à des changements dans le nombre de chromosomes (euploïdie et

aneuploïdie). De plus, il est important de faire la distinction entre les mutations nucléaires et extranucléaires (principalement les chloroplastes et les mitochondries), qui présentent un intérêt considérable pour l'agriculture (van Harten, 1998 ; Medina *et al.*, 2004 ; Pathirana, 2012).

Par ailleurs, les mutations sont aussi classées en deux groupes en fonction de l'ampleur de l'effet phénotypique produit par elles-mêmes (Gaul, 1964 ; Solanki *et al.*, 2011) :

- **Macromutations** : elles produisent un effet phénotypique important et reconnaissable sur les plantes individuelles. Celles-ci sont de nature oligogénique et peuvent être facilement sélectionnées dans la génération M₂.
- **Micromutations** : elles produisent un petit effet phénotypique qui ne peut être identifié que sur la base d'une population. Celles-ci sont de nature polygénique et la sélection de telles mutations peut être retardée jusqu'à M₃ ou les générations suivantes.

3. 2.4.2. Agents mutagènes

Les mutagènes sont principalement de deux types (Fig. 5);

- **Les mutagènes chimiques** : ils peuvent être divisés en trois groupes, à savoir : (a) des agents alkylants tels que le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), le méthylméthanesulfonate (MMS), l'éthyléthanesulfonate (EES), l'éthylène imine, le diéthylsulfate (dES), les composés nitrosés ; (b) des analogues basiques tels que le 5-bromo uracile, la 5-bromo désoxyuridine; et (c) d'autres comme les azotures (azoture de sodium), les antibiotiques, les acridines, l'acide nitreux et l'hydroxylamine.

Les agents mutagènes chimiques préférés appartiennent à la classe des agents alkylants (Natarajan, 2005). Tous ces produits chimiques réagissent avec l'ADN en alkylant les groupes phosphate ainsi que les bases puriques et pyrimidiques (Solanki *et al.*, 2011).

- **Les mutagènes physiques** : ils comprennent les rayonnements électromagnétiques, tels que les rayons gamma, les rayons X et les rayonnements UV, ainsi que les rayonnements particuliers, tels que les neutrons rapides et thermiques, les particules α et β (Van Harten, 1998 ; Kodym and Afza, 2003). Les principales sources de rayons gamma sont les isotopes Cobalt-60 (⁶⁰Co) et Césium-137 (¹³⁷Cs) (FAO/AIEA, 2018).

En général, les radiations ionisantes telles que les rayons X et les rayons gamma sont plus utilisés en raison de leur application facile, de leur bonne pénétration, de leur reproductibilité et de leur fréquence de mutation élevée. Les différents mutagènes augmentent la fréquence des mutations qui peuvent être soumises à la sélection, mais aucun mutagène n'est spécifique à un type de mutation. Cependant, les radiations ionisantes produisent surtout des cassures chromosomiques, entraînant des délétions, inversions et des translocations (Bouharmont, 1995).

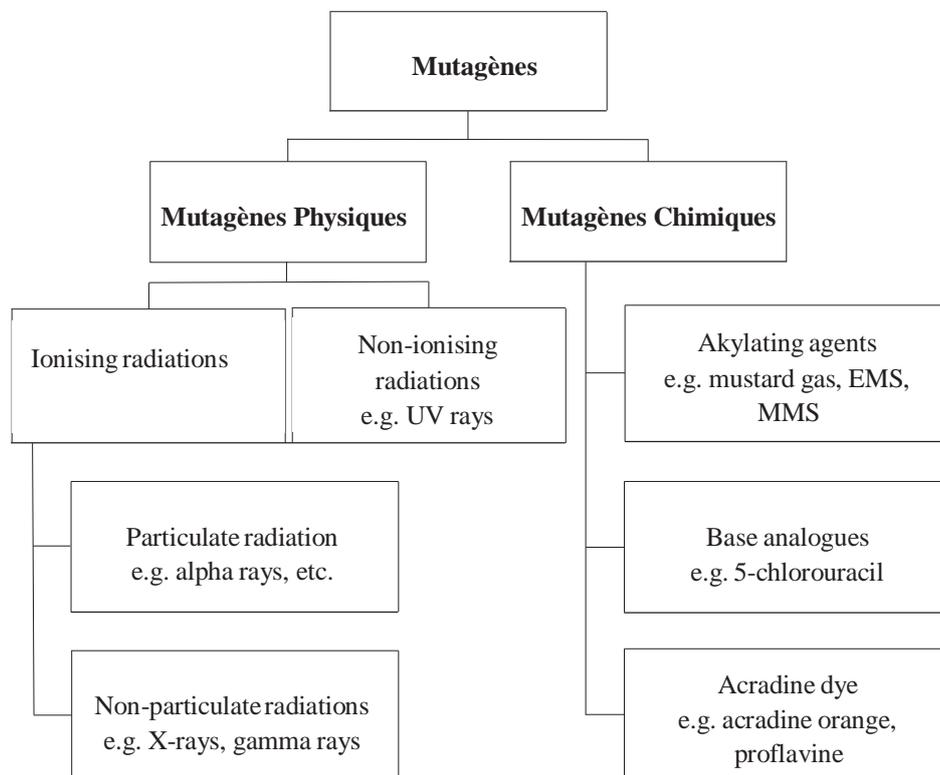


Fig. 5. Mutagènes couramment utilisés dans l'induction de mutation végétale (FAO/AIEA, 2018).

3. 2.4.3. La dose d'un mutagène

La dose appliquée d'un mutagène est un facteur important à considérer dans tout programme de mutagenèse (Solanki *et al.*, 2011). Il y a un effet génotypique significatif de la sensibilité aux traitements mutagènes chez les plantes. Il est donc recommandé d'effectuer des essais préliminaires pour déterminer les doses appropriées. La détermination de la dose qui donnerait la plus grande quantité de mutation désirable par dose unitaire tout en produisant la moindre densité d'effets indésirables, lorsqu'on utilise des mutagènes physiques, est connue sous le nom de "test de sensibilité aux rayonnements", mais plus communément appelé, "test de radiosensibilité". Une détermination de la dose mutagène qui entraîne une réduction de 50% de la germination des graines ou de la viabilité des plantules, connue sous le nom de "DL₅₀", a été utilisée pour prédire avec précision la dose mutagène la plus effective et la plus efficiente. La détermination de la dose mutagène qui conduit à la réduction de la croissance moyenne des plantules de 50% est également utile pour prédire une telle dose mutagène ; est connu sous le nom de "RD₅₀" (Kodym *et al.*, 2012).

La DL₅₀ et une dose proche de la RD₅₀ ; elles sont considérées comme optimales par de nombreux chercheurs. De telles doses produiraient une fréquence maximale de mutations avec un minimum de danger. Une dose optimale peut être déterminée avec un traitement préliminaire. Les doses élevées de mutagènes sont létales pour de nombreuses plantes, tandis que le faible dosage produira moins de fréquence de mutation (Salimath *et al.*, 2007 ; Solanki *et al.*, 2011 ; Wani *et al.*, 2014). Certains facteurs influençant les effets des mutagènes sont biologiques (volume nucléaire, volume des chromosomes et teneur en ADN de la variété), ou environnementaux (oxygène, état hydrique et température) ou chimiques (Sigurbjörnsson, 1983). La teneur en eau des graines est un facteur critique affectant la fréquence de mutation. Même des différences faibles dans la teneur en eau peuvent avoir une influence très prononcée sur l'effet biologique final. Une différence de seulement 0,2 à 0,3% d'eau pourrait modifier considérablement la radiosensibilité de certaines espèces. Les graines contenant de 12 à 14% d'eau donnent habituellement une fréquence de mutation plus élevée par irradiation (Solanki *et al.*, 2011 ; AIEA, 2018).

3.3. Évaluation, identification et sélection des mutants

3.3.1. Évaluation phénotypique des populations de mutants

La sélection végétale a traditionnellement été un processus basé sur la sélection phénotypique. Ainsi, la variation du phénotype était le premier moyen par lequel les mutations ont été décrites et cataloguées (Lundqvist *et al.*, 2012). Certains traits mutants, par exemple, la taille de la plante, la couleur de la feuille et la fertilité peuvent être facilement détectées et sélectionnées en observant la croissance de la population des mutants. Toutefois, de nombreuses méthodes de dépistage ont été développées pour des caractères spécifiques. Ainsi, les mutants pour l'efficacité d'utilisation des engrais, la résistance aux herbicides et la résistance aux stress biotiques et abiotiques, etc., peuvent être sélectionnés en passant sur le terrain et en sélectionnant des plantes prometteuses. Celles-ci peuvent ensuite être soumis à des tests plus rigoureux pour la confirmation et la détermination de l'hérédité de ces caractères (Shu *et al.*, 2011). L'utilisation de procédures appropriées pour le traitement mutagène, le développement et la gestion d'une population mutante et la sélection de mutants sont des éléments clés de l'exploitation des mutants. Cela comprend la culture et la récolte des populations M_1 et M_2 et, dans certains cas, celle des populations M_3 . Si la procédure est inappropriée, les mutants ne peuvent pas être détectés efficacement même s'ils sont générés à haute fréquence. Toutefois, la procédure de développement et de gestion de la population peut être différente pour les cultures autogames et à pollinisation croisée, et pour les caractères qualitatifs et quantitatifs. Le développement d'une procédure pertinente doit également prendre en compte l'ontologie et la nature chimérique de la plupart des plantes M_1 , ainsi que la fréquence et l'hérédité des mutations induites (Ukai and Nakagawa, 2011).

Le phénotypage précis des plantes demeure donc aussi important et constitue sans doute le principal goulot d'étranglement dans la sélection végétale (Fiorani et Schurr, 2013). Ceci est particulièrement vrai dans l'amélioration végétale par mutation où un caractère nouveau peut apparaître seulement une fois dans une population de plusieurs milliers de lignées mutantes (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2017).

Suite à l'induction de la mutation, les plantes sont évaluées pour les traits héréditaires qui sont différents de la lignée parentale non mutagénisée. Cependant, lors de l'utilisation de la mutagenèse physique ou chimique, la première génération (appelée M_1) est une mosaïque génétique du fait que chaque cellule traitée par mutagène est capable d'accumuler des mutations différentes. Cette génération chimérique n'est donc pas adaptée à l'évaluation

phénotypique ou génotypique car différents tissus peuvent avoir des génotypes différents et exprimer ainsi des caractères différents. Une fois les traits potentiellement intéressants récupérés, un travail est entrepris pour fixer le ou les nouveaux allèles dans la population et assurer la stabilité et l'héritabilité des caractères désirés (Jankowicz-Cieslak and Till, 2017).

3.3.2. Évaluation génotypique des populations de mutants

Le génotypage des plantes peut être considéré globalement comme tout test expérimental visant à évaluer les différences dans la séquence nucléotidique au sein ou entre les espèces. Il s'agit d'une approche particulièrement puissante car la variation des nucléotides est le principal contributeur à la variation phénotypique héréditaire. Ainsi, cette approche fournit également des informations importantes sur l'évolution des plantes et permet des sélections efficaces qui évitent les effets confondants des interactions génotype x environnement (GxE) (Annicchiarico, 2002).

Dans la recherche sur la mutagenèse chez les plantes, la génomique et les techniques moléculaires sont devenues une ressource reconnue et des mutants induits sont devenus une ressource certaine dans les études de génomique (Forster and Shu, 2011). Une gamme importante de techniques moléculaires peut être donc utilisée pour la caractérisation de la variation des nucléotides naturels et induits chez les plantes cultivées. Parmi les techniques particulièrement prometteuses figurent : le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP), le polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP), l'ADN polymorphe aléatoire amplifié (RAPD), les microsatellites ou répétition de séquence simple (SSR), les séquences répétées inter-simple (ISSR), les séquences polymorphes amplifiées clivées (CAPS), les régions amplifiées par séquence (SCAR), les étiquettes de séquences exprimées (EST), le polymorphisme amplifié inter-rétrotransposon IRAP, et le polymorphisme de nucléotide simple (SNP) (PBGL, 2013). De nombreuses autres méthodes de détection des mutations dans le gène d'intérêt ont été développées et examinées par Shu *et al.*, (2012). Parmi celles-ci figurent des techniques telles que le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) (Hestekin et Barron, 2006), la chromatographie en phase liquide haute performance dénaturant (DHPLC) (McCallum *et al.*, 2000), l'électrophorèse sur gel en gradient de température/dénaturation (TGGE/DGGE) (Hestekin et Barron, 2006), l'électrophorèse sur gel / capillaire sensible à la conformation (CSGE/CSCE) (Gady *et al.*, 2009) et la fusion à haute résolution (GRH) (Gundry *et al.*, 2003). Ces méthodes offrent des opportunités pour des gains d'efficacité importants tout en réduisant le temps de récupération

des variants désirés. Cependant, ces nouvelles technologies ont tendance à être coûteuses et nécessitent un haut niveau d'expertise technique. Par conséquent, des méthodes de criblage à haut débit et rentables sont nécessaires pour l'identification rapide et la caractérisation des mutants putatifs (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2017).

TILLING : une technique de génétique inverse pour l'identification de mutations induites

Une approche de génétique inverse appelée TILLING « Targeting Induced Local Lesion IN Genomes », a été mise au point à la fin des années quatre-vingt-dix (Meeley et Briggs, 1995 ; McCallum *et al.*, 2000 ; Hirochika, 2001 ; Conrad *et al.*, 2008 ; Hunter *et al.*, 2014). "TILLING" ; abréviation de criblage des lésions locales induites dans les génomes, qui peut être utilisé à la fois pour la génomique fonctionnelle ainsi que pour la sélection pratique. Plusieurs rapports ont démontré que c'est une technique à haut débit pour la détection de mutations ; elle est rentable et applicable à la plupart des organismes. Même si le TILLING a été conçu à l'origine pour le dépistage de mutations dans les populations mutantes générées par des agents mutagènes chimiques, comme le EMS ; il a été aussi montré qu'il pourrait être adopté à des populations mutantes par mutagenèse physique, tels que les rayons gamma et l'irradiation par des neutrons rapides (Shu, 2009). Initialement utilisé sur *Arabidopsis thaliana*, le TILLING est utilisé aussi sur la tomate, le melon, le pois, le colza, le blé, l'orge, le riz, le maïs, le soja, la luzerne, etc...

Dans le TILLING traditionnel, la banque d'ADN génomique est criblée par PCR et par clivage enzymatique des hétéroduplexes afin d'identifier les mutations dans les gènes ciblés (Pino-Nunes *et al.*, 2009 ; Mba, 2013). Les réactions de PCR sont généralement effectuées sur des pools de cinq à huit fois de l'ADN matrice, puis les échantillons amplifiés subissent une dénaturation et une renaturation lente qui conduit à la recombinaison de brins simples en une forme à deux brins. Les hétéroduplexes n'apparaissent que dans les pools contenant de l'ADN portant une mutation du fragment en cours d'analyse (Fig. 6).

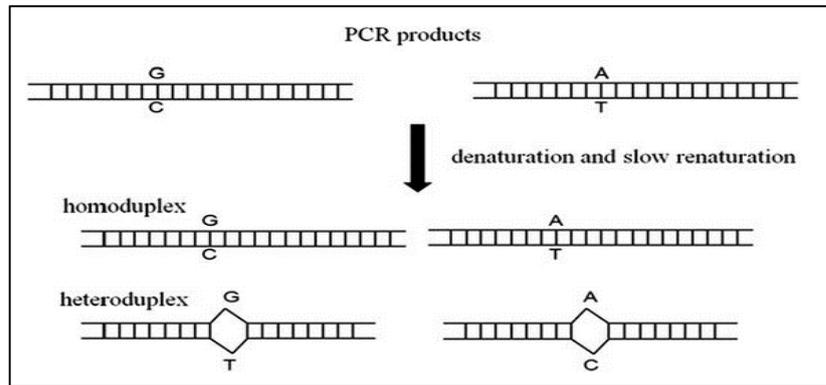


Fig. 6. Formation d'hétéroduplexes (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2017).

Des enzymes capables de reconnaître spécifiquement des défauts d'appariement et de couper le gène étudié à certains endroits bien précis permettent d'isoler des plantes mutantes potentiellement intéressantes. Une gamme d'enzymes a été décrite pour le clivage mismatch (par mésappariements) incluant le haricot mungo nucléase, extrait de pétioles de brassica et extrait brute de céleri (Sato *et al.*, 2006 ; Till *et al.*, 2004). L'endonucléase spécifique (par exemple, CEL I, l'enzyme la plus fréquemment utilisée) reconnaît et coupe les hétéroduplexes précisément à la position 3' du site de mismatch.

Les fragments coupés peuvent être visualisés : (1) sur des gels de Polyacrylamide dans un séquenceur LI-COR (lorsque des amorces marquées sont utilisées) ou (2) directement sur des gels d'agarose ou de Polyacrylamide (lorsque des amorces non marquées sont utilisées). L'électrophorèse sur polyacrylamide dans un séquenceur LI-COR permet une détection très sensible des mutations. Les produits de PCR de toute la longueur sont visibles dans les deux canaux du LI-COR (700 et 800 nm), alors que dans le cas de pools contenant de l'ADN avec une mutation, l'un des fragments clivés est visible dans le canal de 700 nm et l'autre dans le canal de 800 nm (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2017) (Fig. 7).

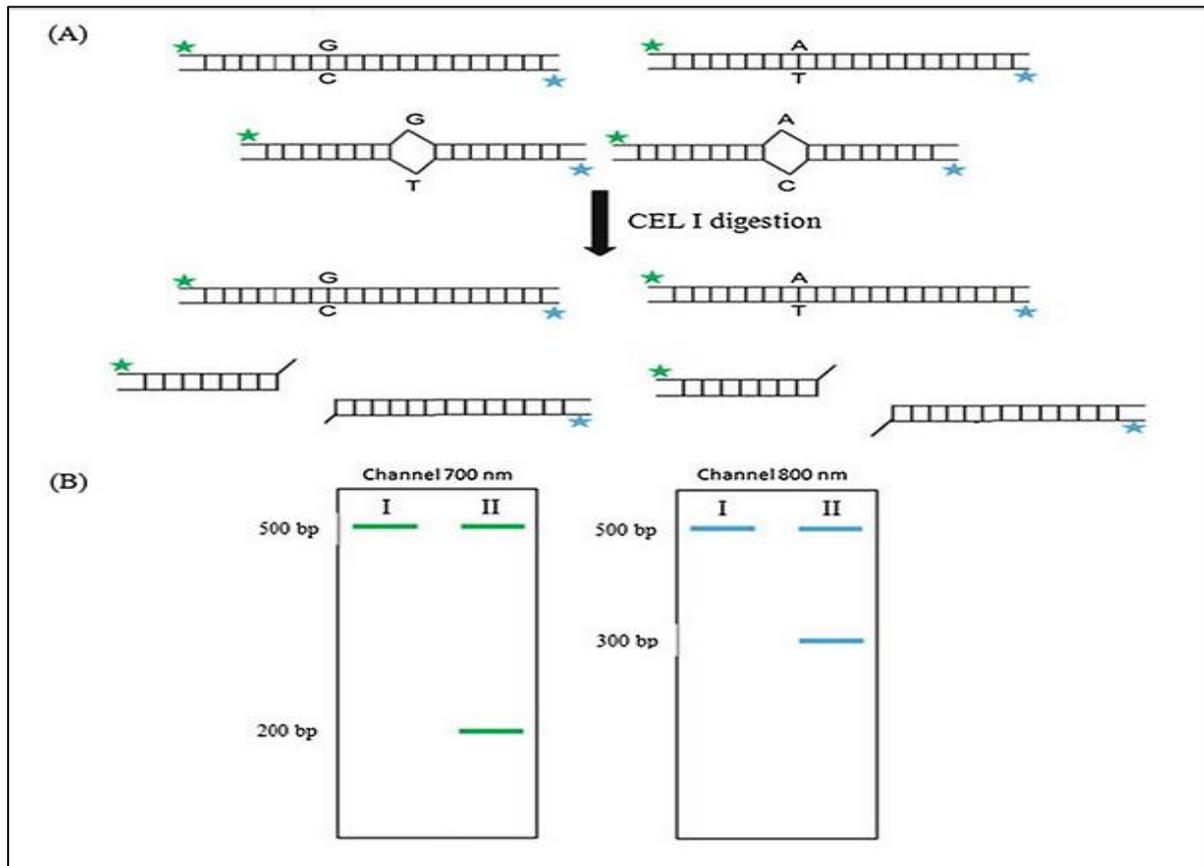


Fig. 7. (A) Schéma simplifié du clivage par mésappariement et (B) visualisation des produits sur un gel de polyacrylamide à l'aide d'un séquenceur LI-COR. L'astérisque bleu indique une amorce directe marquée avec IRDye 700; L'astérisque vert indique une amorce inverse marquée avec IRDye 800. I, un pool contenant de l'ADN sans mutation du gène amplifié ; II, un pool contenant de l'ADN avec une mutation du gène amplifié (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2017).

Le processus entier de TILLING a été développé, à moindre coût par le Laboratoire FAO/AIEA d'amélioration des plantes et de génétique (PBGL, Seibersdorf, Autriche), en plus des méthodes peu coûteuses d'extraction de l'ADN et une méthode rapide d'extraction de nucléases à simple brin pour le TILLING, avec visualisation sur gel agarose standard (Till *et al.*, 2015).

Bien que de nombreuses méthodes aient été décrites, la tendance est que le séquençage direct de l'ADN devient la plate-forme standard à partir de laquelle de nouvelles approches sont en cours de développement. L'utilisation du séquençage fournit donc des outils nouveaux et précis, ainsi que de nouvelles stratégies concomitantes, à la fois pour la détection des

mutations et pour la sélection assistée par marqueurs (Ingelbrecht *et al.*, 2018). Cependant, le dépistage moléculaire des mutations induites dans des gènes cibles connus permet la sélection génotypique de mutants candidats dans un programme de sélection par mutation. En effet, les plateformes de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont facilité la découverte à haut débit de mutations induites dans les génomes des plantes (Tsai *et al.*, 2011 ; Du *et al.*, 2014 ; Yuan *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2016 ; Gupta *et al.*, 2017 ; Datta *et al.*, 2018).

3.3.3. Sélection des mutants

L'amélioration des plantes par mutation implique les processus : d'induction de mutation, de détection de mutations, de fixation de mutations, de développement de lignées mutantes et de libération de nouveaux cultivars mutants (Ali Ghanim and Forster, 2014 ; Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2017). Les graines, avant le traitement mutagène, sont appelées M_0 et après le traitement, elles sont appelées M_1 . La première génération mutée est appelée M_1 . Les plantes qui sont produites directement à partir de graines (ou de gamètes) traitées avec un mutagène sont des plantes M_1 , la génération suivante est la M_2 , suivie de M_3 , M_4 , etc. Les graines qui se développent sur les plantes M_1 sont donc des graines M_2 qui se développent en plantes M_2 . Les embryons produits à partir de croisements, dans lesquels le pollen ou le sac embryonnaire a été traité avec un mutagène, représentent également la première génération mutée et sont donc appelés M_1 (Tab. 2). Le processus d'identification des individus avec un phénotype mutant inclut deux étapes principales : le criblage de mutants et la confirmation de mutants (ou vérification de mutants).

Le **criblage de mutants** est un processus de sélection des individus d'une grande population mutée qui répond au critère de sélection. Par exemple, les plantes M_2 qui fleurissent trois jours plus tôt que leurs parents de type sauvage sont criblées en tant que mutants potentiels à floraison précoce et les plantes sans symptôme de maladies peuvent être criblées en tant que mutants résistants aux maladies potentielles. Étant donné que la floraison dépend de facteurs à la fois génotypiques et environnementaux, ils ne peuvent être considérés que comme des «mutants putatifs», ce qui signifie qu'ils ne sont pas nécessairement de «vrais mutants». C'est le cas de nombreux caractères, y compris la résistance aux maladies, car la non-infection peut simplement résulter de l'absence du pathogène.

La **confirmation des mutants** est le processus de réévaluation des mutants putatifs dans des conditions reproduites et rigoureuses, en utilisant des tailles d'échantillons plus grandes (généralement les descendances d'individus putatifs sélectionnés, par exemple les lignées M_3 de plantes M_2 sélectionnées) (Forster and Shu, 2011).

Habituellement, après 5 à 10 générations de plantes qui se croisent elles-mêmes, des plantes stables sont produites et sont soumises à des essais variétaux sur plusieurs sites avant leur diffusion officielle. Le croisement n'est pas une condition obligatoire pour la dissémination variétale et de nombreux exemples peuvent être trouvés dans la base de données de l'AIEA sur les variétés mutantes où les plantes sont libérées directement après que les caractères nouveaux sont fixés et stables (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2017).

Tab. 2. Schéma sommaire d'une sélection par mutation selon Forster and Shu (2011).

Génération	Opérations
M_0 (M_0V_0)	Graines, pollen, parties de la plante ou cultures de tissu traitées par mutagènes physiques (rayonnement) ou chimiques.
M_1 (M_1V_1)	Cultures à partir des semences traitées (M_1) ou des propagules végétatives (M_1V_1).
M_2 (M_2V_2)	Population cultivée à partir de semences (M_2) ou de fragments végétatifs (M_2V_2) provenant de M_1 ou de M_1V_1 respectivement. La sélection des mutants peut commencer dès cette génération ou plus tard.
M_3 - M_8 (M_3V_3 - M_8V_8)	Continuation de la sélection, confirmation génétique, multiplication et stabilisation du comportement au champ des lignées mutantes.
Les deux ou trois générations suivantes	Études comparatives des lignées mutantes au cours de différentes années et à différents emplacements.
Les deux ou trois générations suivantes	Essais officiels avant l'homologation comme nouvelle variété.

Toutefois, avant de commencer un programme d'amélioration par mutation, les considérations suivantes doivent être prises en compte :

1. Les mutations sont principalement récessives et peuvent être sélectionnées dans la deuxième génération M_2 . Contrairement aux mutations récessives, les mutations dominantes se produisent dans de très petites fréquences et peuvent être sélectionnées en M_1 .

2. La sélection des caractères polygéniques doit commencer dans les descendance individuelles de plantes de M₃.
3. Les mutations sont bénéfiques avec des fréquences très basses (~ 0,1%), tandis que les traitements réduisent la germination, le taux de croissance, la vigueur et la fertilité du pollen et des ovules.
4. Les mutations sont induites de manière aléatoire et peuvent survenir dans n'importe quel gène. Cependant, certains gènes peuvent être plus induits que d'autres.
5. Les mutations peuvent être récurrentes. Le même gène dans une espèce de plante cultivée peut être induit à nouveau.
6. Les mutations ont généralement des effets pléiotropes dus à des gènes étroitement liés (Salimath *et al.*, 2007).

CHAPITRE 2

EVALUATION DE LA RADIOSENSIBILITÉ CHEZ LE POIS CHICHE DE TYPE KABULI (*Cicer arietinum* L.)

1. INTRODUCTION

Parmi les mutagènes physiques, les rayons gamma sont les mutagènes les plus couramment utilisés pour développer des variétés. La préférence pour l'utilisation des rayons gamma d'irradiation est probablement due, à la fois, à sa grande disponibilité et à sa polyvalence d'utilisation. La radiomutagenèse améliore d'une manière significative la fréquence d'apparition des mutations ; et peut ainsi être utilisée pour élargir la variabilité génétique qui sera intégrée dans de nombreux schémas de sélection et de création variétale (Guerin De Montgareuil, 1984). Un vaste programme d'amélioration du pois chiche par mutation a été initié par Kharkwal en Inde (1979). Depuis plusieurs mutants présentant des caractéristiques essentielles sur le plan agronomique ont été induits chez le pois chiche (Toker *et al.*, 2005). En effet, de nombreux caractères tels que l'augmentation du rendement et du taux de protéines, la maturité précoce, le type de plante dressé, la croissance déterminée, le port compact, la nodulation des racines ; et la résistance à l'antracnose, à la fusariose, à la pourriture des racines, aux nématodes ont été améliorés par l'application de la radiomutagenèse (Wani *et al.*, 2014).

Par ailleurs, dans les études de sélection par mutation, la détermination de la dose de rayonnement appropriée pour chaque cultivar est d'une importance primordiale. La détermination de la dose, qui entraîne une réduction de 50% de la germination des graines ou de la viabilité des plantules, connue sous le nom de DL_{50} , a été utilisée pour prédire avec précision la dose mutagène la plus effective et la plus efficace. La détermination de la dose mutagène, qui conduit à la réduction de la croissance moyenne des plantules de 50%, est également essentielle pour prédire une telle dose mutagène ; ceci est connu sous le nom de RD_{50} (Kodym *et al.*, 2012). Le pois chiche est connu pour être une espèce sensible au rayonnement ; il peut germer mais dépéri à un stade de développement avancé ou, dans d'autres cas, ne produit pas de semence. C'est pour cela que l'étude de la RD_{50} s'avère complémentaire à la DL_{50} chez le pois chiche. La DL_{50} donne donc une idée sur la dose optimale de mutagènes qui produit le maximum de mutations avec un minimum de risques (Wani *et al.*, 2014).

Toutefois, le processus de développement de populations de mutants, commence par la sélection du génotype cible, parent à muter, c'est-à-dire la population de graines M_0 à traiter. Lors du choix de la semence du génotype parental, le principal facteur à prendre en compte est l'absence de variabilité naturelle, pour le ou les caractères à introduire par mutation. La

variété choisie doit présenter une uniformité suffisante dans la plupart de caractéristiques agronomiques importantes (FAO/AIEA, 2018).

Ainsi, et afin d'augmenter la variabilité génétique pour l'amélioration du pois chiche, deux cultivars de type Kabuli (GP10 et Ghab 4) ont été traités avec différentes doses de rayons gamma en utilisant du cobalt 60. Ce chapitre porte sur l'évaluation de la radiosensibilité chez ces deux cultivars de pois chiche et l'estimation de la DL_{50} et de la RD_{50} .

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Deux cultivars de pois chiche de type Kabuli (*Cicer arietinum L.*) ont été utilisés dans cette étude (Fig. 8). La population GP10 sélectionnée par le feu Dr. Labdi M. (chercheur INRAA) dans le cadre d'un programme de sélection participative et la variété Ghab 4 qui est une sélection de FLIP 93-93C, développée par le Centre International de Recherche Agricole dans les Zones Arides (ICARDA) et qui a été procurée par le Centre National de Contrôle et Certification de plants et de semences (CNCC). Le choix de ces variétés s'est basé sur leur bonne adaptation et leur bonne qualité physique des grains (gros et rugueux : correspond au besoin du consommateur algérien) ainsi que leur homogénéité génétique, d'après les sources de son obtention, nécessaire pour une telle étude.



Fig. 8. Les deux cultivars de pois chiche Kabuli utilisés dans cette étude (Ghab 4 et GP10).

2.2. Présentation des conditions de l'étude

L'expérimentation de la radiosensibilité a été réalisée à la station expérimentale de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), station de Mahdi Boualam à Baraki, dans une serre, durant la période allant de Janvier à Juillet 2013.

Des graines saines et sèches (12-13% d'humidité) de chaque cultivar ont été traitées au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) avec différentes doses de rayons gamma : 150, 200, 250, 300, 350 et 400 Grays. La source de rayonnement gamma utilisée était le Cobalt-60. Le débit d'irradiation est de 12,45 Gy/min. Des graines non traitées avec des rayons gamma ont été utilisées comme témoin.

Deux essais avec le même dispositif expérimental ont été réalisés séparément dont un essai pour chaque cultivar. Le dispositif expérimental adopté est un bloc aléatoire complet à un seul facteur (dose d'irradiation), avec quatre blocs. Chaque bloc comprend vingt-quatre répétitions (graines) par dose. Le facteur dose est représenté par 7 niveaux qui sont :

1. Dose 0 : 0 Gray (Témoin)
2. Dose 1 : 150 Gray.
3. Dose 2 : 200 Gray.
4. Dose 3 : 250 Gray.
5. Dose 4 : 300 Gray.
6. Dose 5 : 350 Gray.
7. Dose 6 : 400 Gray.

Le choix de cette gamme de doses a été basé sur une recherche bibliographique poussée sur plusieurs travaux de radiomutagenèse réalisés chez le pois chiche ainsi que chez quelques autres légumineuses à grosses graines. La synthèse de ces travaux est donnée en annexe 2.

Après irradiation, 96 graines par dose ont été semées dans des fertils pots remplis avec environ 500 g de sable, soit un total de 672 graines pour chaque cultivar. Les fertils pots ont été placés dans des bacs en plastiques dans une serre (Fig. 9).

Le semis des graines irradiées et non irradiées (témoins), des deux cultivars GP10 et Ghab 4, a été réalisé respectivement le 03 janvier et le 01 avril 2013.



Fig. 9. Essai de radiosensibilité chez le pois chiche sous serre.

Afin d'éviter tout stress hydrique contraignant le développement normal des plants, les moments d'intervention et les fréquences d'irrigation correspondantes ont été déterminés suivant les besoins de la culture.

A partir de graines levées, dix plantules ont été arrachées aléatoirement par dose et par bloc, au 22^{ème} jour après le semis, correspondant au stade levée, au niveau des deux essais. Nous avons effectué la transplantation des plantes restantes, 45 jours après le semis dans des pots en plastique contenant 5 kg de quantité équivalente de terre, de sable et de terreaux. Ces plantes ont été suivies jusqu'à la maturité (Fig. 10).

2.3. Caractères étudiés

Dans l'objectif de déterminer la dose létale DL_{50} et la dose de réduction de croissance RD_{50} , au stade plantule (22 jours après le semis), plusieurs paramètres ont été mesurés sur les 10 plantules prélevées aléatoirement par traitement et par réplication : le taux de germination, la hauteur des plantules, le poids sec des racines et des pousses. Aussi, le nombre de fleurs a été compté au stade floraison sur les plants transplantés et le nombre de gousses par plante ainsi que le taux de survie ont été notés à la maturité.



Fig. 10. Essai de radiosensibilité chez le pois chiche sous serre après la transplantation.

2.4. Analyses statistiques des données

La dose létale de 50% (DL_{50}) et la dose de réduction de la croissance de 50% (RD_{50}) ont été estimées en utilisant une analyse de régression linéaire à l'aide du logiciel informatique Microsoft Excel 2013. Tous les paramètres mesurés ont été exprimés en pourcentage de l'échantillon témoin.

3. RÉSULTATS

3.1. Détermination de la dose létale DL_{50}

3.1.1. Taux de germination

Les résultats du taux de germination exprimé en pourcentage du témoin pour les différentes doses de rayons gamma sont présentés dans la figure 11. Ces résultats montrent que la germination a diminué avec l'augmentation de la concentration du mutagène, de manière significative, chez le cultivar Ghab 4. Ce résultat a été noté mais d'une façon moindre chez le cultivar GP10 ; sauf pour la dose de 250 Gy pour ce même cultivar et la dose 200 Gy chez le cultivar Ghab 4, où la germination était similaire aux témoins respectifs (100%). La dose de rayonnement gamma de 350 Gy était moins inhibitrice pour la germination chez les deux cultivars. Les valeurs de DL_{50} basées sur le taux de germination et calculées à partir de l'équation de régression linéaire étaient de 478 Gy pour le génotype GP10 et de 455 Gy pour Ghab 4 (Fig. 11).

3.1.2. Taux de survie

Les résultats du taux de survie à la maturité (en % par rapport au témoin) des deux cultivars de pois chiche exposés à différentes doses de rayons gamma présenté sur la figure 11 montrent une différence de sensibilité entre GP10 et Ghab 4, l'effet étant plus prononcé sur Ghab 4. Les résultats montrent qu'aucune plante ne survit à maturité à la dose de 400 Gy chez les deux cultivars. Le taux de survie pour le témoin des deux cultivars était de 100%.

Les valeurs de la DL_{50} , basées sur le taux de survie (à la maturité) et calculées à partir de l'équation de régression linéaire, étaient de 360 Gy pour le génotype GP10 et de 258 Gy pour le génotype Ghab 4 (Fig. 11).

3.2. Détermination de la dose de réduction de croissance RD_{50}

3.2.1. Hauteur des plantules

La dose d'irradiation a significativement affecté la hauteur des plantules. La hauteur des plantules (en % par rapport au témoin) des deux cultivars de pois chiche GP10 et Ghab 4 irradiés aux rayons gamma à une dose de 150 Gy était supérieure à celle du témoin ; mais à des doses d'irradiation supérieures à 200 Gy, la hauteur moyenne des plantules diminue progressivement avec l'augmentation de la dose (Fig. 11). Les valeurs RD_{50} , basées sur la hauteur moyenne des plantes (22 JAS) et calculées à partir de l'équation de régression linéaire,

étaient respectivement de 301 Gy et 325 Gy pour le génotype GP10 et Ghab 4 (Fig. 11). La hauteur des plantules des deux cultivars de pois chiche GP10 et Ghab 4 exposés à différentes doses de rayons gamma est illustrée par la figure 12.

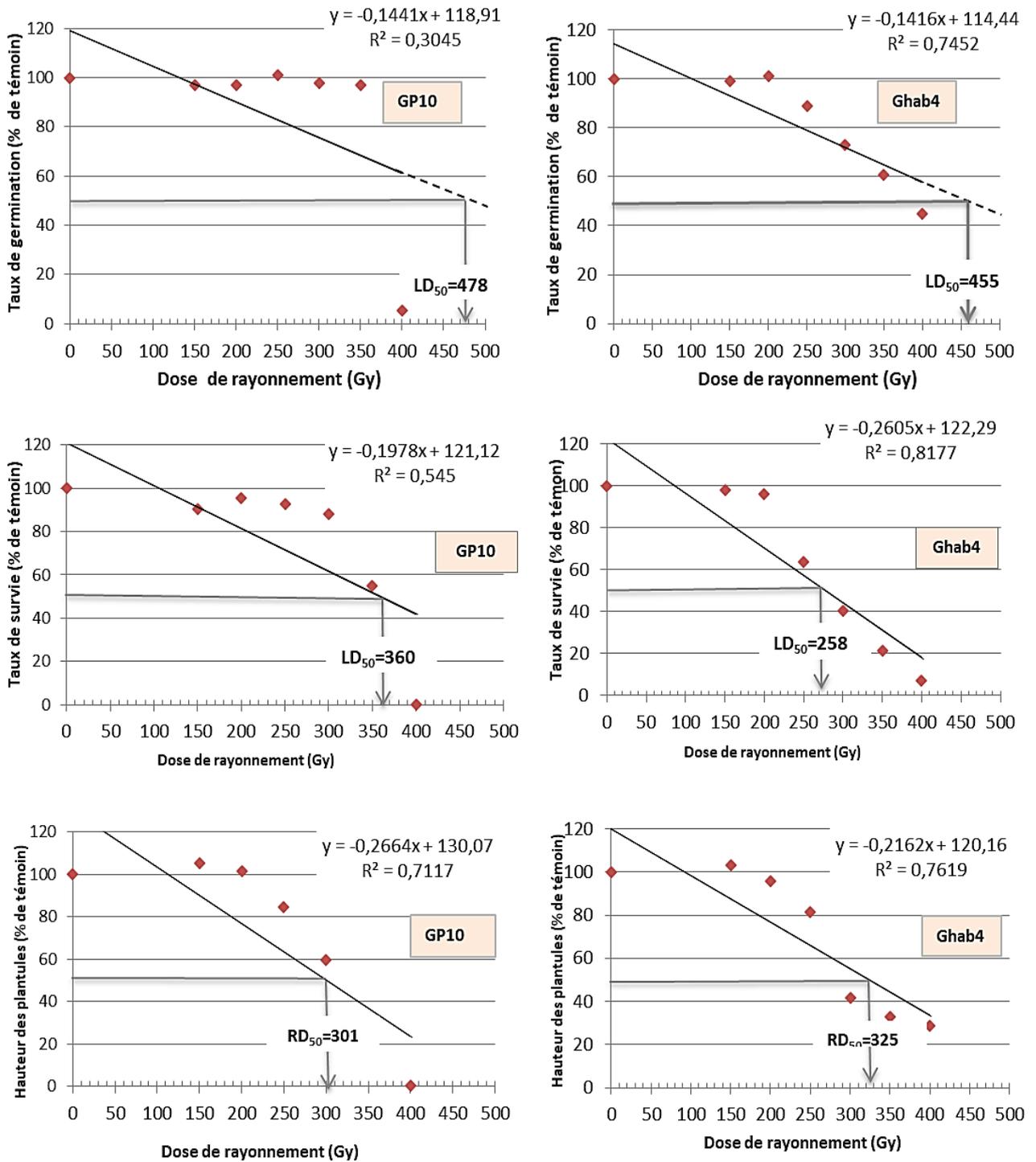


Fig. 11. Moyennes du taux de germination, du taux de survie, de la hauteur des plantules (% du témoin) et leurs équations de régressions pour les deux cultivars de pois chiche GP10 et Ghab 4 exposés à différentes doses de rayons gamma.



Fig. 12. Plantules des deux cultivars de pois chiche GP10 et Ghab 4 provenant de graines irradiées aux rayons gamma montrant la hauteur des plantules diminuant progressivement avec l'augmentation de la dose (c.v. : cultivar).

3.2.2. Poids sec des pousses et des racines

Les résultats du poids sec des pousses et des racines montrent une nette réduction des deux paramètres avec l'augmentation de la dose d'irradiation chez les deux cultivars de pois chiche, sauf pour la dose de 200 Gy chez le cultivar GP10 (Fig. 13). Par conséquent, les poids secs des pousses et des racines sont très fortement inversement corrélés avec les doses de rayonnement gamma.

La dose qui a entraîné une réduction de 50% du poids sec des pousses et des racines (22 JAS) était plus élevée chez GP10 que chez Ghab 4. Les valeurs RD_{50} , basées sur le poids sec des pousses, étaient respectivement de 293 Gy et de 274 Gy pour le génotype GP10 et Ghab 4 ; et celles basées sur le poids sec des racines étaient respectivement de 314 Gy et de 238 Gy pour le génotype GP10 et Ghab 4 (Fig. 13). A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que le cultivar GP10 est plus résistant aux radiations que le cultivar Ghab 4.

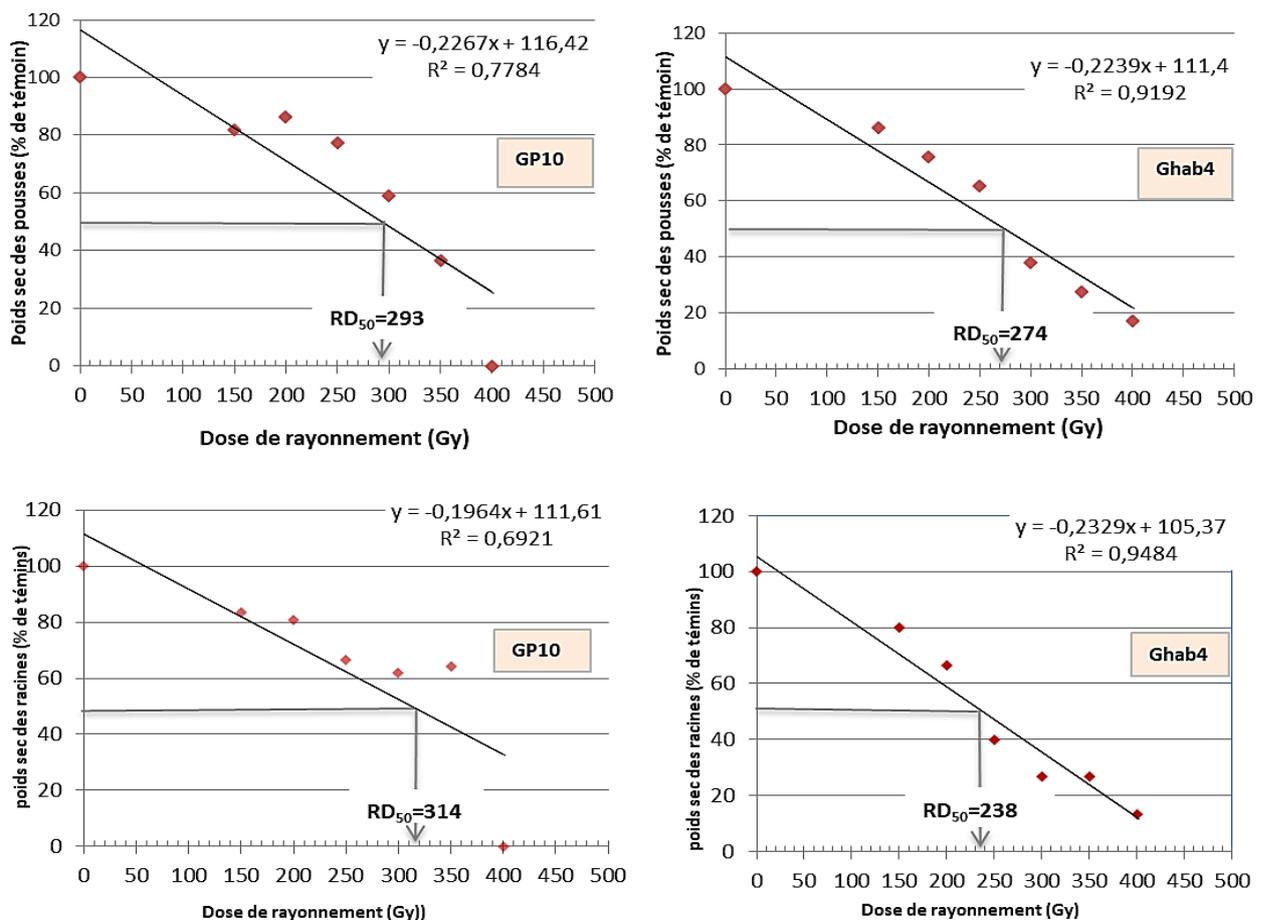


Fig. 13. Moyennes du poids sec des pousses et des racines (% de témoin) et leurs équations de régressions chez deux cultivars GP10 et Ghab 4 de pois chiche, exposés à différentes doses de rayons gamma.

3.2.3. Nombre de fleurs par plante

Le nombre de fleurs ou d'inflorescences par plante est l'un des paramètres utilisé pour estimer le degré de dommages physiques chez les plantes dans la génération M_1 (Kodym *et al.*, 2012). À l'exception de la dose de 200 Gy, le nombre de fleurs par plante a diminué avec l'augmentation de la dose d'irradiation des traitements mutagènes chez les deux cultivars par rapport au témoin non irradié (Fig. 14). La dose de rayonnement qui réduit le nombre de fleurs par plante de 50% était respectivement de 284 et 255 Gy pour le cultivar GP10 et Ghab 4.

3.2.4. Nombre de gousses par plante

Les données enregistrées sur le pourcentage du nombre de gousses par plante ont montré que la dose d'irradiation affectait significativement le nombre de gousses par plante. Par conséquent, ce caractère est très fortement inversement corrélé aux doses de rayonnement gamma. Le pourcentage de gousses le plus grand a été obtenu à 200 Gy chez les traitements des deux cultivars de pois chiche (GP10 et Ghab 4). Comme le montre la figure 14, la dose de rayonnement qui réduit le pourcentage du nombre de gousses par plante de 50% était respectivement de 210 et 243 Gy pour le cultivar GP10 et Ghab 4.

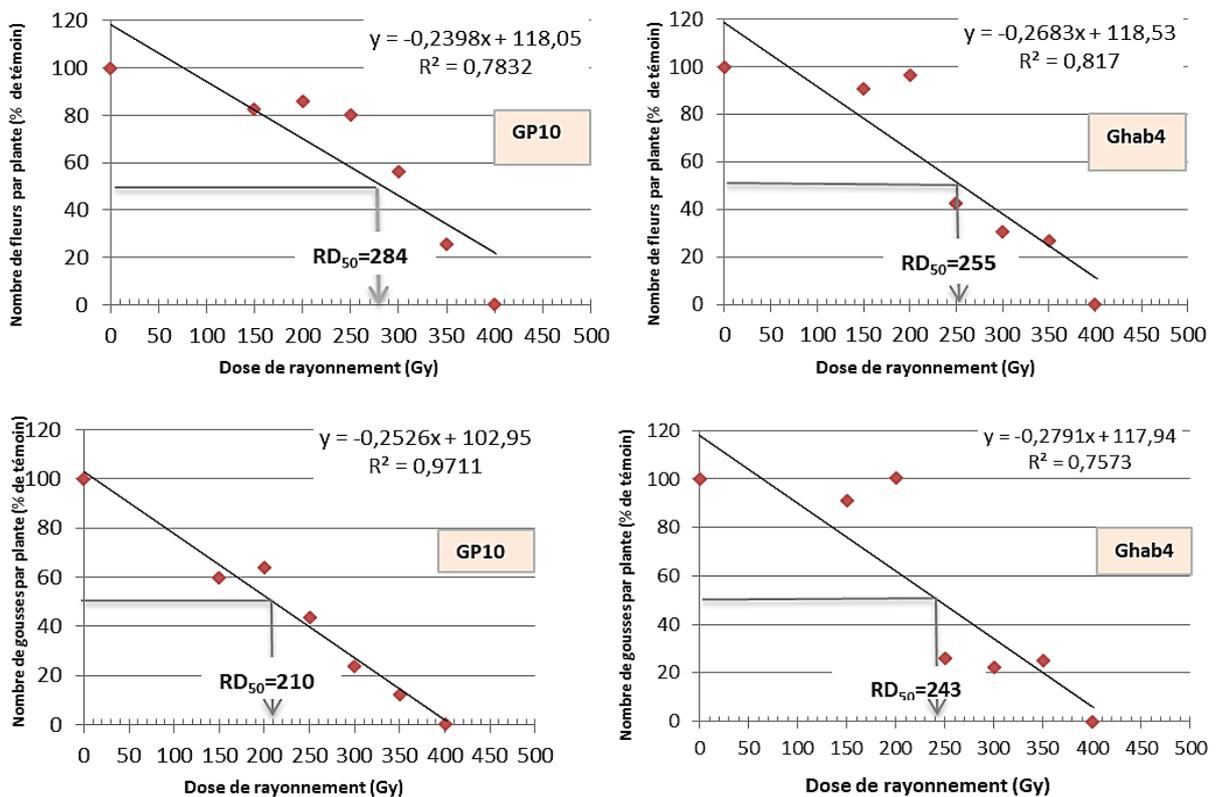


Fig. 14. Nombre de fleurs et de gousses moyen (% de témoin) et leurs équations de régressions chez les deux cultivars GP10 et Ghab 4 de pois chiche exposés à différentes doses de rayonnement gamma.

4. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette étude, relatifs aux taux de germination exprimés en pourcentage du témoin chez les deux cultivars de pois chiche et exposés à différentes doses de rayons gamma, concordent avec ceux obtenus par Qureshi *et al.* (2014). Un effet similaire sur la germination des graines à 250 Gy a été observé chez le génotype Kabuli (NCS 0503) de pois chiche exposé à des doses d'irradiation gamma allant de 50 à 300 Gy. Par ailleurs, à des doses plus faibles d'irradiation gamma allant de 10 à 110 Gy, Haq *et al.* (1992) ont signalé un effet insignifiant sur le taux de germination chez trois génotypes de pois chiche Kabuli (ILC482, ILC3279 et ILC6104). Ce résultat est également similaire à celui obtenu par Shah *et al.*, (2008) dans quatre autres génotypes de pois chiche de types Desi et Kabuli.

Cependant, la réduction du taux de germination avec des doses croissantes d'irradiation gamma a été indiquée chez le pois chiche par plusieurs auteurs ; Toker et Cagirgan (2004) chez cinq génotypes Kabuli irradiés avec 100 à 500 Gy, Hameed *et al.* (2008) chez les deux types Desi et Kabuli irradié avec 100 à 1 000 Gy, Brahmi *et al.* (2014) en utilisant des doses comprises entre 50 et 750 Gy chez un génotype de type Kabuli et Umavathi et Mullainathan (2015) en utilisant des doses allant de 200 à 600 Gy chez la variété Co-4. Tandis que, Hameed *et al.* (2008) ont rapporté chez le type Kabuli que le pourcentage final de germination diminuait considérablement après des doses élevées d'irradiation de 800 à 1000 Gy.

Concernant le taux de survie, la réduction du taux de survie des plants à maturité, avec des doses croissantes d'irradiation gamma, a été rapportée chez le pois chiche par Kozgar, (2012) et Brahmi *et al.*, (2014) ; chez le blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper), par Sagade et Apparao, (2011), aussi par Usharani and Ananda Kumar, (2016) ; et chez le haricot Snap (*Phaseolus vulgaris*) par Ellyfa *et al.*, (2007). Toutefois, la dose de 150 Gray a été déterminée par Brahmi *et al.*, (2014) comme étant la dose entraînant une réduction de 50% de la survie chez la variété Amdoun de pois chiche.

La hauteur des plantules, déterminée à un stade particulier peu après la germination, est généralement utilisée comme indicateur de la réponse du génotype à un mutagène (Kodym *et al.*, 2012). L'augmentation de la hauteur de la plante par rapport au témoin après la première dose d'irradiation (100 Gy) et la réduction de la hauteur des plantes avec l'augmentation des doses de rayons gamma ont également été rapportées par Toker et Cagirgan (2004). Ce dernier résultat concorde avec celui obtenu chez le pois chiche par Haq (1990) et Kozgar (2012), et chez le haricot Snap (*Phaseolus vulgaris*) par Ellyfa *et al.* (2007). Toutefois, ce résultat ne

concorde pas avec celui obtenu par Khan *et al.*, (2005) qui rapportent que la hauteur de la plante diminue de façon non significative avec l'irradiation gamma de 100 à 1100 Gy sauf à 500 Gy.

Pour ce qui est du poids sec des pousses et des racines, Canci *et al.* (2004) ont rapporté qu'il y a beaucoup de variation pour les caractères de croissance des racines et des pousses chez les mutants du pois chiche. Kozkar (2012), ayant utilisé des doses comprises entre 100 et 400 Gy sur deux variétés de pois chiches Pusa-256 (Desi) et BG-1053 (Kabuli), a signalé un impact négatif sur la longueur des racines et des pousses 10 jours après le semis. Aussi, Hameed *et al.* (2008) ayant testé 10 doses de rayons gamma allant de 100 à 1000 Gy, ont montré que la longueur des pousses et le poids frais des plantules diminuaient progressivement avec l'augmentation de la dose chez deux variétés de pois chiches Desi (97086) et Kabuli (90395). Par ailleurs, selon Shah *et al.* (2012), la RD₅₀ basée sur des caractères de longueur des pousses et des racines chez le pois chiche, est de 300 et 400 Gy pour la variété Dési (Pb. 2000) et de 500 et 600 Gy pour la variété de type Kabuli (Pb.1.).

Quant au nombre de gousses par plante, les résultats obtenus dans la présente étude ne concordent pas avec ceux de Khan *et al.* (2005) qui ont rapporté, chez trois génotypes de pois chiche (Noor 91, Punjab 91, C 141) traités à 400, 500 et 600 Gy, que le nombre de gousses par plante augmentait significativement avec l'irradiation gamma par rapport au témoin. Le même résultat a également été rapporté chez le haricot de jardin par Monica et Seetharaman, (2015) en utilisant des doses de 50 à 500 Gy.

Les doses efficaces des mutagènes variaient selon Wani *et al.*, (2014) d'un génotype à l'autre. Les rayons gamma sont les mutagènes les plus souvent utilisés pour modifier le (s) gène (s) dans les mutants de pois chiche libérés pour une production commerciale. La dose efficace variait de 100 à 600 Gy ; et 200 Gy était la dose la plus fréquemment utilisée pour obtenir des mutations bénéfiques d'après Salimath *et al.*, (2007).

5. CONCLUSION

L'induction de mutations par les rayonnements gamma au cobalt 60, chez deux cultivars de pois chiche de type Kabuli GP10 et Ghab 4, nous a permis d'évaluer l'effet de six doses d'irradiation (150, 200, 250, 300, 350 et 400 Gy) sur la germination, la survie, la croissance des plants et la reproduction au sein de la génération M₁. En effet, la radiosensibilité des deux cultivars a été déterminée à travers l'estimation de la DL₅₀ et la RD₅₀.

Les résultats obtenus ont montré un effet significatif du rayonnement sur les deux génotypes pour tous les paramètres étudiés. La plupart des caractères étudiés exprimés en pourcentage du témoin diminuent avec l'augmentation des doses. D'autre part, les résultats de cette étude ont montré une sensibilité différentielle entre GP10 et Ghab 4. Les doses n'ont pas affecté de la même façon les deux cultivars, l'effet du rayonnement gamma était plus important sur le cultivar Ghab 4.

La dose 400 Gy est une dose létale, elle entraîne la mortalité des plants à un taux de 100% à la fin de cycle chez les deux cultivars. Même si les graines ont germé et les plantules ont subsisté à des stades dépassant 30 jours avec des pourcentages près de 40 pour cent par rapport au témoin, elles n'ont pas pu grandir et survivre jusqu'à la fin du cycle.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent aussi que la dose 200 Gy a parfois un effet stimulateur (des valeurs supérieures au témoin) ; et parfois un effet moins inhibiteur (comparé aux autres doses 150 et 250 Gy) sur la plupart des caractères étudiés. A titre d'exemple, pour la variété Ghab 4, le nombre de gousses a dépassé celui du témoin sous l'effet de cette dose.

L'objectif de la présente étude étant de choisir la dose d'irradiation optimale (DL_{50}/RD_{50}) qui entraîne le moins de perte de graines tout en assurant leur germination pour donner des plantes M_2 . Les valeurs enregistrées de la DL_{50} basées sur le taux de germination étaient de 458 Gy pour le génotype GP10 et de 474 Gy pour le génotype Ghab 4. Tandis que, les valeurs de la DL_{50} basées sur le taux de survie, sont beaucoup plus faibles, elles étaient de 360 Gy pour le génotype GP10 et de 258 Gy pour le génotype Ghab 4.

Cependant, ces doses ont un effet néfaste sur les paramètres de reproduction d'où l'intérêt de la détermination de la dose qui réduit la croissance et/ou la production en gousses de la population M_1 de 50% (RD_{50}). Ainsi, les résultats relatifs à la détermination de la RD_{50} liés à la hauteur des plantules, au poids sec des racines et des pousses, au nombre de fleurs, au nombre de gousses par plante exprimés en pourcentage de l'échantillon témoin chez les deux cultivars de pois chiche, montrent des valeurs comprises entre 210 et 314 Gy pour le cultivar GP10 et entre 255 et 325 Gy pour le cultivar Ghab 4.

Il est généralement admis qu'un traitement donnant une réduction de croissance de 30 à 40% est susceptible de donner un rendement de mutation optimal dans les cultures (Roychowdhury and Tah, 2013). Dans la pratique, des doses mutagènes entraînant une létalité de 3 à 40% et une réduction de croissance de 30 à 40%, respectivement LD_{30}/LD_{40} et RD_{30}/RD_{40} , sont également utilisées dans des mutations induites visant à générer des populations mutantes

pour l'amélioration des cultures. Dans cette étude et pour assurer un minimum de production de semence de la population M₁, nous avons opté pour les doses optimales de 250 Gy et 280 Gy pour GP10 et Ghab 4 respectivement. Ces doses ont entraîné une réduction des paramètres de reproduction (nombre de gousse par plant) de 40%, et semblent plus appropriées car elles permettent d'induire des mutations avec un moindre effet indésirable sur la survie, la croissance et la reproduction des plants.

CHAPITRE 3

VARIABILITE GENETIQUE AU SEIN DE
LA GENERATION M₂ DE POIS CHICHE
(*Cicer arietinum* L.) INDUITE PAR
RAYONS GAMMA

1. INTRODUCTION

Les mutations induites, depuis leur première application dans les années vingt, sont restées un puissant moyen de générer rapidement une nouvelle diversité génétique. Chez le pois chiche, ces mutations induites ont un grand potentiel d'amélioration de la variabilité génétique grâce à une manipulation efficace des populations mutagénisées. Ainsi, des résultats encourageants, concernant l'induction d'une variabilité quantitative utile chez cette espèce, ont été signalés par plusieurs auteurs (Haq, 1990 ; Toker and Cagirgan, 2004 ; Wani, 2011 ; Kozkar, 2014 ; Wani *et al.*, 2014). Par ailleurs, de nombreux travaux sur les populations traitées par les agents mutagènes ont montré qu'une sélection efficace des caractères polygéniques devrait être effectuée chez les premières générations à partir de la M₂ (Shakoor and Haq, 1980 ; Kharkwal, 1983 ; Sheeba *et al.*, 2003 ; Kozkar, 2014).

Ainsi, pour établir un programme de sélection efficace, les estimations de paramètres génétiques tels que le coefficient de variabilité phénotypique et génotypique (PCV, GCV), l'héritabilité (H^2) et le gain génétique (GA) de divers caractères quantitatifs sont essentiels. Les estimations du GCV et de l'héritabilité indiquent le degré de stabilité face aux fluctuations de l'environnement et le potentiel de transmissibilité d'un trait de génération en génération (Kaul et Garg, 1979 ; Sakin et Yildirim, 2004 ; Khan et Wani, 2005 ; Bhogal *et al.*, 2013 ; Wani *et al.*, 2014). Le gain génétique confère le degré de stabilité et de progrès génétique d'un trait particulier soumis à une sélection appropriée et a donc beaucoup d'impact sur les cultures auto-pollinisées comme le pois chiche. L'héritabilité associée au gain génétique est plus fiable pour envisager la sélection que l'héritabilité seule (Johnson *et al.* 1955), en raison du fait que les estimations de l'héritabilité sont sujettes à certaines erreurs d'estimation et à certaines interactions génotype-environnement (Lin *et al.*, 1979).

Par ailleurs, dans le cadre d'un programme d'amélioration par mutations, il est impératif d'étudier les coefficients de corrélation, en plus de l'estimation de la variabilité génétique entre le rendement et les caractères contribuant au rendement (Aastveit et Gaul, 1967). Le rendement est un caractère complexe associé à de nombreuses composantes interdépendantes. En règle générale, les coefficients de corrélation montrent les relations entre les caractères indépendants et le degré de relation linéaire entre ces caractères (Ciftci *et al.*, 2004). Par conséquent, les coefficients de corrélation simples ne sont pas toujours efficaces pour déterminer les relations réelles entre les traits (Hardwick and Andrews, 1980 ; Toker and Cagirgan, 2004). Cependant, une analyse en "Path" est nécessaire pour clarifier profondément

les relations entre les caractères et aide à rendre la sélection plus efficace (Kozkar, 2014). Le coefficient de l'analyse en "Path" sépare les effets directs des effets indirects (Dixet and Dubey, 1984).

Afin d'étudier l'effet de l'irradiation sur la génération M₂, des comparaisons entre les familles M₂ et la variété témoin (non irradiée) doivent être effectuées. La détermination des familles M₂, significativement supérieures ou inférieures, selon la nature du caractère, au parent, permet de sélectionner des génotypes améliorés. Le travail présenté dans ce chapitre, a été mené pour évaluer la variabilité génétique induite par les rayons gamma au sein de la génération M₂. En effet, les objectifs sont d'une part, la sélection à partir d'une génération très précoce de mutants présentant une amélioration agronomique et d'autre part, la détermination des caractères agronomiques efficaces et distinctifs pour la continuité de la sélection au cours des générations suivantes.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal et dispositif expérimental

2.1.1. Générations M₁

Afin de produire la génération M₁, des graines saines et sèches (12-13% d'humidité) de la variété Ghab 4 ont été traitées avec des rayons gamma (Cobalt-60) au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA). La dose optimale de 280 Grays a été appliquée sur 9 000 graines M₀. Les graines non traitées ont été utilisées comme témoin.

La variété Ghab 4 de type Kabuli est une sélection de FLIP 93-93C. Elle a été développée à partir d'un croisement à trois voies FLIP 85-122C / FLIP 82-150C // FLIP 86-77C par le Centre International de Recherche Agricole dans les Zones Arides (ICARDA) d'Alep en Syrie (Malhotra *et al.*, 2005).

L'essai de la génération M₁ a été mis en place le 5 janvier 2014, en randomisation totale, en plein champ et conduit en pluvial. La distance de plantation était de 30 cm x 20 cm avec une superficie totale de 700 m² (Annexe 3). A partir de cette génération (M₁), 1500 plants ont été récoltés séparément après maturité physiologique complète. La récolte s'est étalée du 08 au 12 juin 2014 (Fig. 15).

2.1.2. Générations M_2

A partir des plants M_1 , seulement les graines qui ont été récoltées en quantité suffisante ont été semées en familles M_2 ; ce qui correspondait à 135 familles M_2 . Des graines de la variété Ghab 4, non traitées avec les rayons gamma, ont été utilisées comme témoin (Fig. 15).

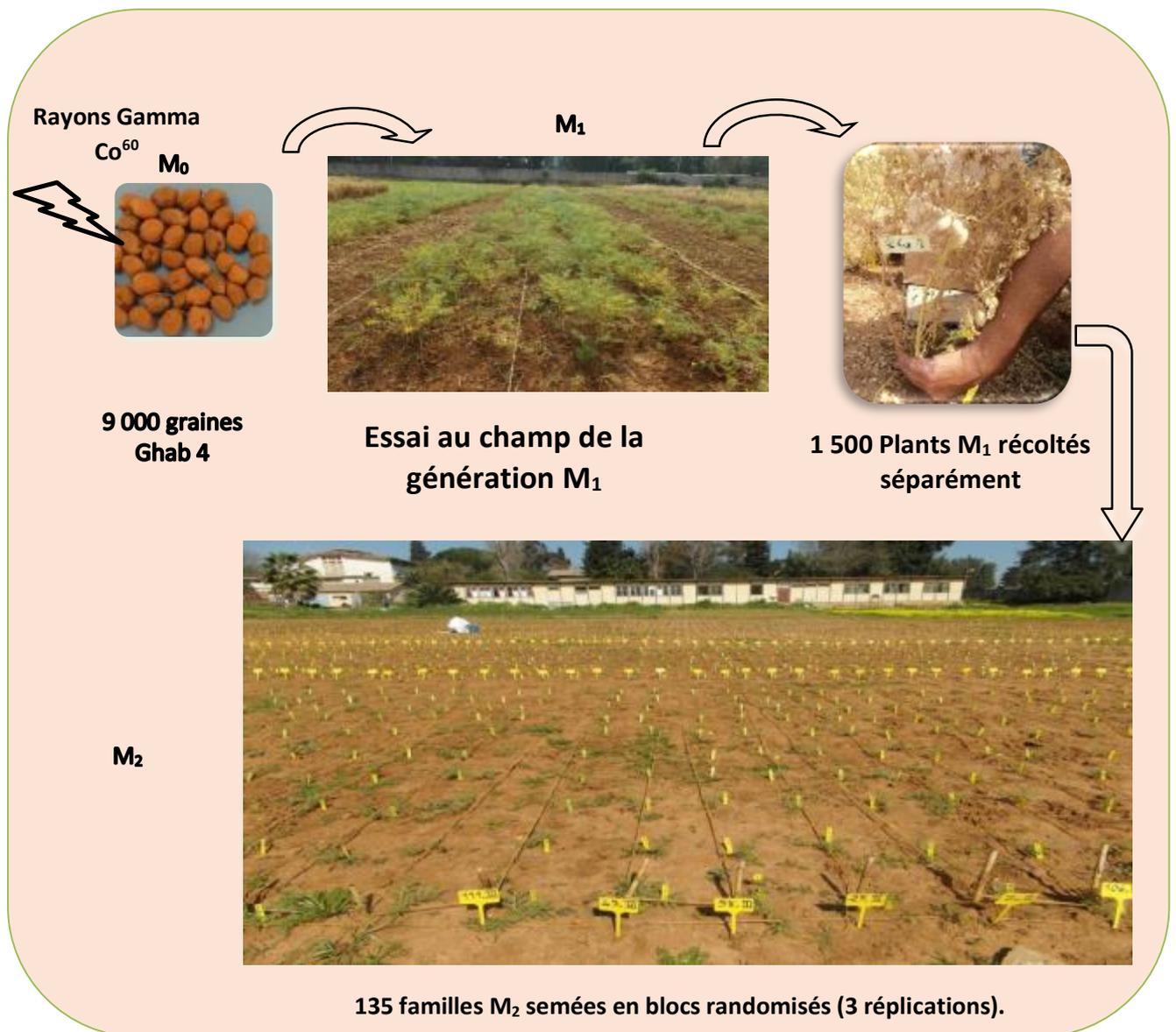


Fig. 15. Différentes étapes de création de la population M_1 et M_2 .

Le dispositif expérimental adopté pour la génération M_2 est un bloc aléatoire complet à raison de 3 répétitions. Chaque bloc comprend 135 familles M_2 et le témoin. Pour chaque traitement, 30 graines ont été semées le 06 janvier 2015 avec un espacement de 50 cm \times 35 cm. Une ligne

de témoin a été semée après chaque dix lignes (au total 14 lignes de témoin par bloc). La superficie totale de l'essai est de 884 m² (Annexes 4, 5 et 6).

L'étiquetage des 135 familles et de tous les plants (plus de 4 000 plants) a été effectué au stade plantule (Fig. 15). La récolte des plants a été réalisée après maturité physiologique complète. Elle s'est étalée du 23 mai jusqu'au 15 juin 2015.

2.2. Conditions des essais

Les essais des générations M₁ et M₂ ont été réalisés au niveau de la station expérimentale de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'El Harrach à Alger (ENSA) durant la période allant de janvier à juin pour les deux années 2014 et 2015.

Les relevés climatiques montrent que les températures moyennes mensuelles durant l'année 2014 sont comprises entre un minimum de 12,7°C (mars) et un maximum de 19,3°C (mai) et entre un minimum de 9,38°C (janvier) et un maximum de 18,82°C (mai) durant l'année 2015 (Tab. 3). Toutes ces températures semblent favorables à un bon développement de la plante.

Les précipitations totales, au cours de la période des essais de janvier à mai pour les deux années 2014 et 2015, étaient respectivement de 204,3 mm et de 303,6 mm. La moyenne maximale enregistrée était de 88mm en mars 2014 et en janvier 2015, elle était de 98,9 mm. La moyenne minimale, durant les deux années, a été enregistrée en mois d'avril (0 mm).

Tab. 3. Données des moyennes mensuelles des températures et précipitations (2014-2015).

Année Mois	2014		2015	
	Température (°C)	Précipitation (mm)	Température (°C)	Précipitation (mm)
Janvier	12,9	66,60	9,38	98,90
Février	14,0	46,70	9,58	80,00
Mars	12,7	88,00	14,85	96,30
Avril	17,5	0,00	17,66	0,00
Mai	19,3	3,00	18,82	28,40

Source : Station météorologique de l'ENSA (2014-2015)

Avant la mise en place des essais, nous avons effectué des analyses du sol.

Les résultats des analyses physico-chimiques du sol (Tab. 4.) par bloc montrent que la parcelle des essais était plus ou moins homogène avec des coefficients de variation qui varient de 0,86 à 26,18 %. La texture est limono-argileuse. Le pH varie entre 7,60 et 7,73. La conductivité électrique varie de 0,69 à 0,82 dS/m. Le sol est considéré comme non salé avec un taux de

salinité inférieure à 2dS/m selon les normes d'USSL (1954). Les taux de calcaire varient de 0,72 à 1,2 % ; donc c'est un sol non calcaire selon les normes proposées par Geppain Baize (1988).

Les teneurs en matières organiques varient de 3,44 à 3,70 %. Le sol est donc bien pourvu en matières organiques par rapport aux teneurs en argile. Ce sol est pauvre en azote total avec des teneurs qui varient entre 0,058 et 0,075 %. Les teneurs du phosphore assimilable varient de 9,79 à 10,97 ppm. Selon les normes d'Olsen citées par Hanotiaux (1985), la parcelle est pauvre en phosphore assimilable.

Tab. 4. Caractéristiques physico-chimiques du sol

Les analyses physico-chimiques	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	pH	CE (dS/m)	MO (%)	C (%)	Calcaire total (%)	Azote total (%)	P ₂ O ₅ (ppm)
Bloc 1	39,67	36,00	20,90	7,73	0,82	3,68	2,14	0,88	0,075	10,34
Bloc 2	40,33	35,17	18,00	7,60	0,71	3,70	2,15	0,72	0,066	9,79
Bloc 3	43,33	32,43	17,70	7,67	0,69	3,44	2,00	1,2	0,058	10,97
Coefficient de variation (%)	4,75	5,40	9,36	0,86	9,45	4,09	4,09	26,18	12,82	5,68

2.3. Caractères étudiés

2.3.1. Mutations de la chlorophylle

Les mutations de la chlorophylle sont considérées comme des indicateurs de mutabilité dans la génération M₂. L'évaluation de leur fréquence au sein de la génération M₂ se fait à partir du stade jeune plante jusqu'au stade maturité des plants (Bolbhat Sadashiv *et al.*, 2012). Dans la présente étude, les plants de la génération M₂ ont été criblés pour déterminer la fréquence et le spectre de ces mutations chlorophylliennes. Pour cela, nous avons opté pour la classification modifiée de Gustafson (1940), Lamprechet (1960) et de Kharkwal (1998) qui ont rapporté les types suivants :

- a. Albina : ces mutants sont caractérisés par l'absence totale de chlorophylle ou des caroténoïdes, possédant une première paire de feuilles très petite ; ils peuvent survivre pendant 7 à 10 jours.
- b. Xantha : les jeunes plants de ces mutants sont uniformément colorés en jaune avec l'absence totale de la chlorophylle.

c. Chlorina : les jeunes plants de ces mutants présentent une couleur vert clair ou vert pâle et ils peuvent survivre jusqu'à maturité.

d. Viridis : ces mutants présentent une couleur verte normale et ils peuvent survivre jusqu'à maturité. Les plantes poussent lentement, elles présentent une hauteur réduite et un faible rendement en grains.

e. Autres : autre que les quatre types (albina, xantha, chlorina et viridis).

Le nombre de plants et le pourcentage de chaque type de mutations chlorophylliennes ont été estimés.

2.3.2. Fertilité du pollen

L'étude de la fertilité du pollen dans une population traitée avec un mutagène, constitue un indice fiable pour déterminer l'efficacité d'un mutagène. La fertilité ou « viabilité » du pollen est déterminée en utilisant le test de coloration par l'Aceto-carminé à 1 ou 2%. Ce test repose sur la souillabilité des grains de pollen ; les grains de pollen souillés présentant une couleur rouge foncée uniforme sont considérés comme étant fertiles, les autres sont comptés comme stériles (ICRISAT, 2006 ; Qureshi *et al.*, 2009).

La fertilité du pollen a été déterminée au stade plein floraison pour trente-cinq familles M₂ prises aux hasards. Pour chaque famille, les fleurs ont été collectées à partir de trois différentes plantes choisies aléatoirement. Pour chaque plante, trois lames ont été préparées et les grains de pollen fraîchement déhiscent des anthères sont souillés avec de l'Acétocarminé à 1% (Annexe 7). Les lames ont été observées sous microscope optique et dix champs par lame sélectionnés de manière aléatoire, ont été observés avec un grossissement de 40x10. Les grains de pollen colorés ont été enregistrés fertiles ou viables, et les grains de pollen non colorés ou très légèrement colorés sont considérés comme stériles ou non-viables (Fig. 16.).

Le pourcentage de grains de pollen fertiles a été calculé en divisant le nombre de grains de pollen fertiles par le nombre total de grains compté dans le champ de vision.

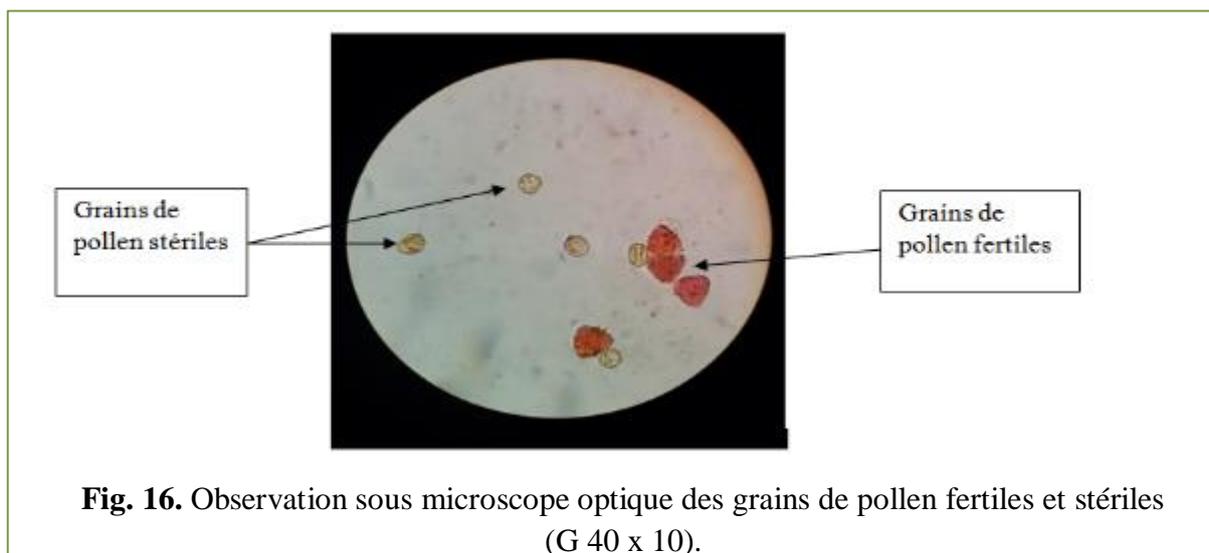


Fig. 16. Observation sous microscope optique des grains de pollen fertiles et stériles (G 40 x 10).

2.3.3. Caractères quantitatifs

Afin d'étudier la variabilité phénotypique au sein de la génération M₂, un certain nombre de caractères quantitatifs a été retenu. Les caractères quantitatifs étudiés sont les caractères liés : à la phénologie (début floraison, la maturité), à la morphologie de la partie végétative (hauteur du plant, hauteur de la première gousse, nombre de branches primaires par plant), au rendement (nombre de graines par gousse, nombre total de gousses par plant, nombre total de graines par plant, rendement en grains et poids de cent graines). Les observations des divers caractères étudiés ont été enregistrées sur 4 050 plants de la génération M₂, correspondant à 30 plants par famille sur un total de 135 familles (Tab. 5.) (Annexe 7).

Tab. 5. Liste des caractères quantitatifs étudiés et leur méthode d'évaluation.

Caractère	Abréviation	Méthode d'évaluation
Jours à la floraison	JF (jours)	Nombre de jours entre le semis et le stade où 50% des plantes ont commencé à fleurir.
Jours à la maturité	JM (jours)	Nombre de jours entre le semis et le stade où plus de 90% des gousses ont atteint leur maturité et sont devenues jaunes.
Hauteur de la première gousse	HPG (cm)	Hauteur de la base de la plante à la première gousse.
Hauteur du plant	HP (cm)	Hauteur de la base de la plante à l'extrémité de la dernière feuille.
Nombre de branches primaires	NBP	Nombre total de branches primaires dans une plante.
Nombre de graines /gousse	NGGS	Nombre de graines dans une gousse.
Nombre total de gousses/plant	GSPP	Nombre total de gousses par plant.
Nombre total de graines /plant	GPP	Nombre total de graines par plant
Rendement en grains	RG (g/plant)	Poids total des graines produites par plant.
Poids de cent graines	PCG (g)	Cent graines au hasard ont été comptées puis pesées.

2.3.4. Caractère qualitatif : port des plants

Pour les notations relatives au port des plants (PRT) nous avons utilisé l'échelle proposée par l'ICRISAT (1993) qui comprend cinq types de port : (1) érigé, (2) semi érigé, (3) semi étalé, (4) étalé et (5) rampant (Fig. 17). Ce paramètre a été noté au stade du remplissage des gousses. Il est à noter que le témoin non irradié présente un port de type (3) semi étalé.

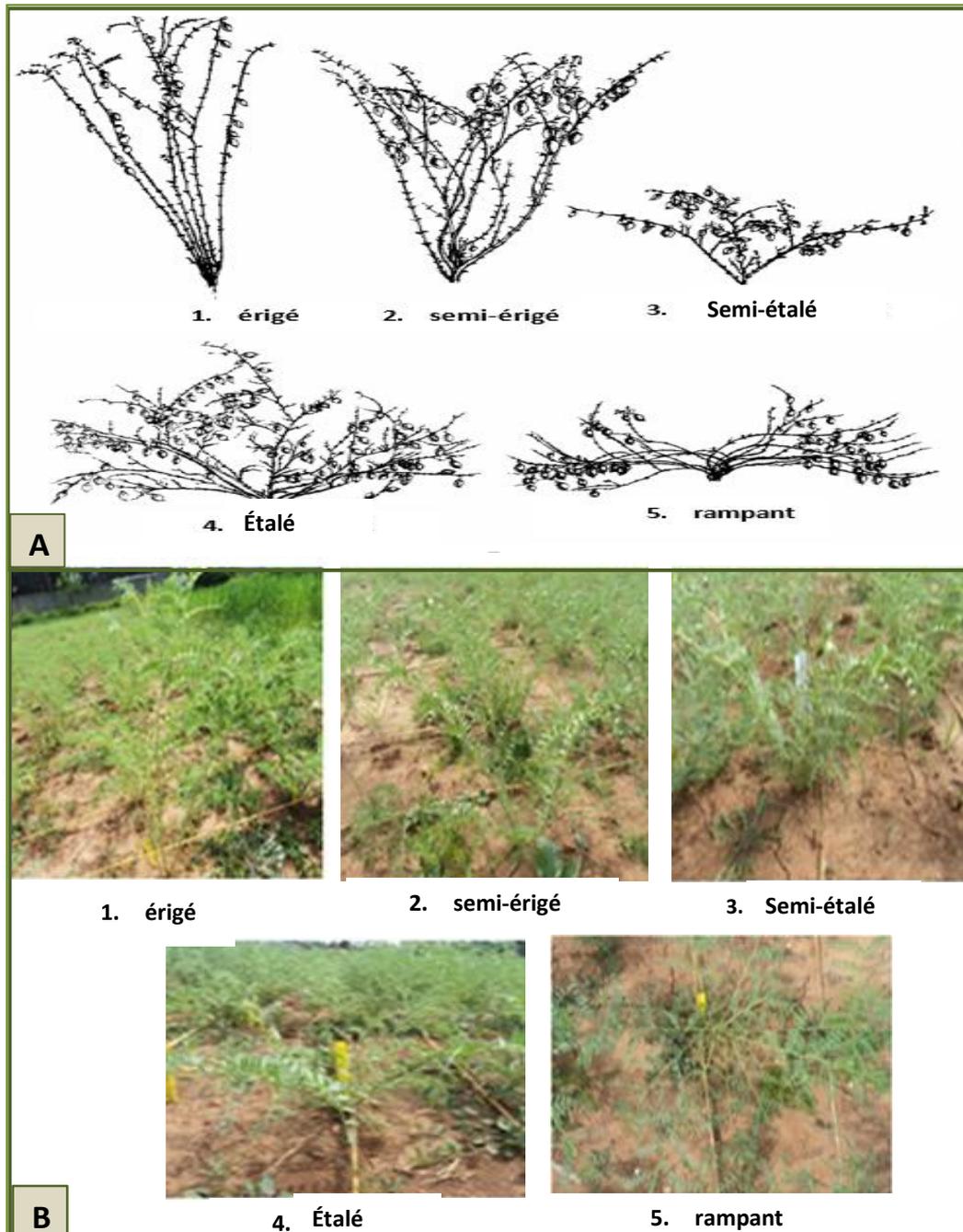


Fig. 17. Les cinq différents types de port : (A) Représentation schématique selon le descripteur de pois chiche ICRISAT (1993), (B) photos correspondantes des cinq types de port sur terrain.

2.4. Analyses statistiques des données

Les données ont été recueillies et analysées statistiquement pour évaluer l'étendue de la variabilité génétique induite pour les dix caractères agronomiques étudiés.

L'analyse de la variance a été réalisée en utilisant la version 12.1 du logiciel Genstat (VSN International Ltd. 2009). Les coefficients de variation génotypique et phénotypique (GCV, PCV), l'héritabilité au sens large (H²) et le gain génétique attendu en pourcentage de la moyenne (GA%) ont été calculés à l'aide des équations suivantes :

Variance génotypique (σ^2g)

$$\sigma^2g = (MSG - MSE) / r.$$

Lorsque MSG est le carré moyen des génotypes, MSE est le carré moyen de l'erreur, et r est le nombre de réplifications.

Variance phénotypique (σ^2p)

$$\sigma^2p = \sigma^2g + \sigma^2e.$$

Où σ^2g est la variance génotypique et σ^2e est le carré moyen de l'erreur.

Variance d'erreur (σ^2e)

$$\sigma^2e = MSE.$$

Coefficient de variation phénotypique et génotypique PCV et GCV

Les estimations du coefficient de variation phénotypique et génotypique ont été calculées suivant Singh et Choudhary (1985) comme suit :

$$PCV = \sqrt{\sigma^2p} / (\bar{X}) \times 100.$$

$$GCV = \sqrt{\sigma^2g} / (\bar{X}) \times 100.$$

Où σ^2p est la variance phénotypique, σ^2g est la variance génotypique et \bar{X} est la moyenne du caractère. Les valeurs du GCV et du PCV ont été classées comme faibles (0-10%), modérées (10-20%) et élevées (20% et plus) d'après Sivasubramanian et Madhava Menon (1973).

Estimation de l'héritabilité au sens large (H²%)

$$H^2\% = \sigma^2g / \sigma^2p \times 100.$$

Le pourcentage d'héritabilité a été classé comme faible (0-30%), modéré (30-60%) et élevé ($\geq 60\%$) selon Robinson *et al.* (1949).

Gain génétique attendu et estimé (GA)

$$GA = k \sigma p H^2.$$

Gain génétique attendu en pourcentage de la moyenne (GA%)

$$GA (\%) = GA / (\bar{X}) \times 100.$$

Le gain génétique attendu a été calculé en utilisant la méthode d'Assefa *et al.* (1999) et l'intensité de la sélection (k) était supposée être de 5% ; où $k = 2,06$, une constante, σ_p est l'écart type phénotypique et H^2 est l'héritabilité au sens large.

Le gain génétique attendu en pourcentage de la moyenne a été classé comme faible (0-10%), modéré (10-20%) et élevé (> 20%) selon (Johnson *et al.*, 1955).

Les coefficients de corrélation de Pearson (r) ont été calculés pour tous les caractères mesurés en utilisant IBM SPSS pour Windows version 20 (2011). L'analyse des coefficients "Path" permet un examen critique des effets directs et indirects spécifiques des caractères et mesure l'importance relative de chacun d'entre eux dans la détermination du rendement final. Dans la présente étude, nous avons utilisé le rendement en grains comme variable dépendante. Cette analyse a été effectuée à l'aide du logiciel IBM SPSS AMOS Windows Version 24 (2016).

Pour déterminer l'affinité génétique des familles de pois chiche M₂ et les regrouper, une analyse de regroupement (clustering analysis) a été réalisée avec le logiciel statistique R avec les modules eclodist, stats et clv en utilisant la matrice de distance de Mahalanobis dans la méthode d'agrégation hiérarchique Ward2 (Murtagh et Legendre, 2014).

Afin d'identifier les familles mutantes significativement supérieures au parent, les tests de Dunnett et de Fisher (LSD) ont été utilisés avec le logiciel Windows SPSS AMOS Windows Version 24 (2016) et le logiciel Genstat version 12.1 (VSN International Ltd, 2009) respectivement.

3. RÉSULTATS

3.1. Spectre et fréquence des mutations de la chlorophylle dans la génération M₂

Cinq différents types de mutants de la chlorophylle ont été observés dans la génération M₂ de pois chiche. Le spectre de mutations de la chlorophylle comprenait quatre types : albina, xantha, chlorina, viridis (Fig. 18.) et quelques autres chimères (feuilles avec bordure jaune, deux ou trois types de mutations sur un même plant...) (Fig. 19.). Les deux types chlorina et viridis ont survécu jusqu'à la maturité tandis que les deux types albina et xantha sont morts au stade plantule.

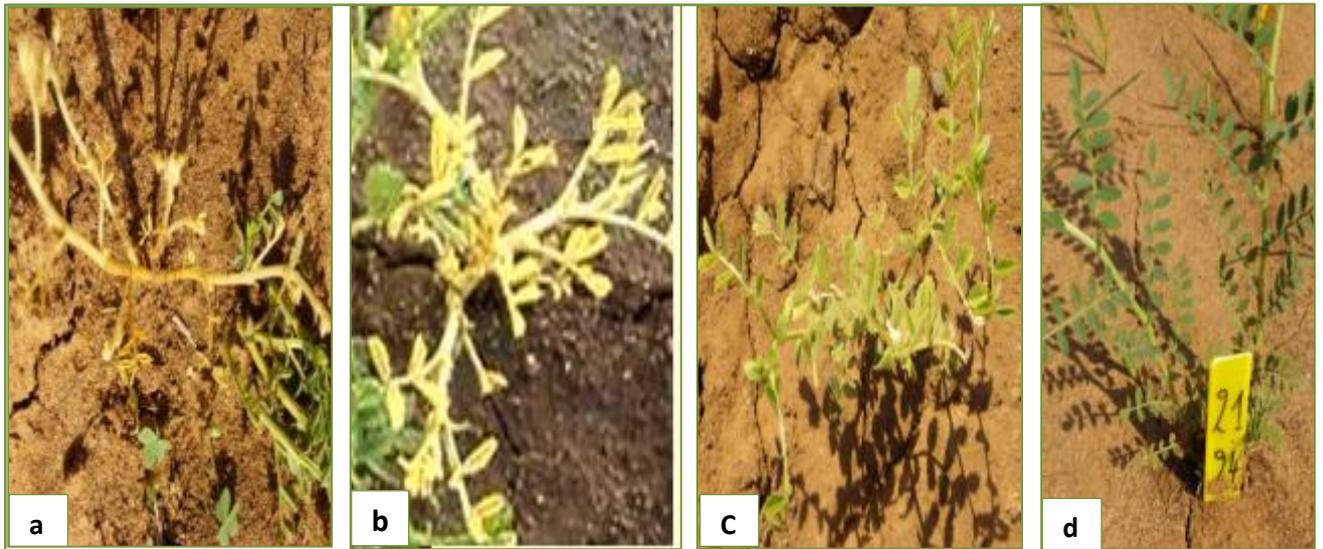


Fig. 18. Les différents types de mutations chlorophylliennes ; (a) albina, (b) xantha, (c) chlorina, et (d) viridis.

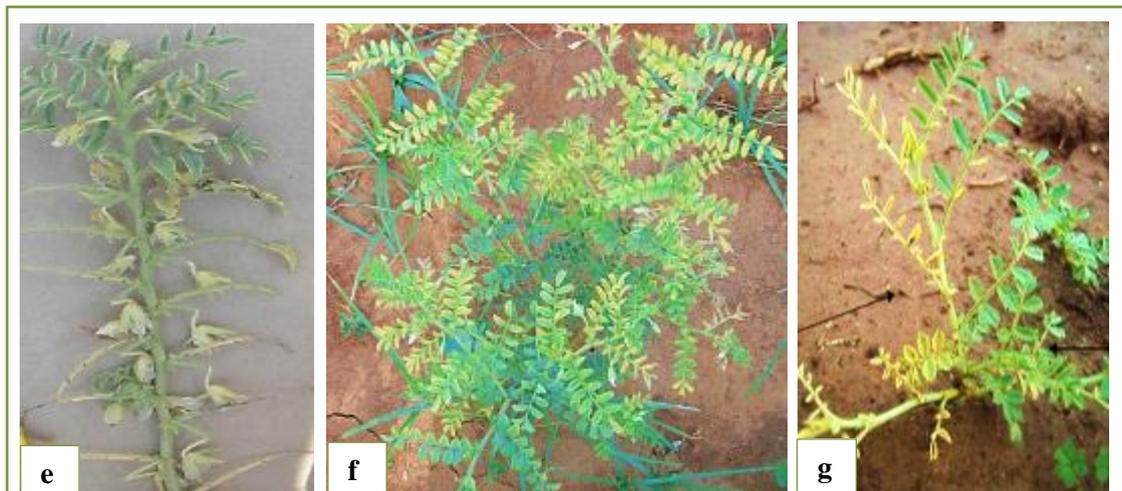


Fig. 19. Autres mutations chlorophylliennes ; (e) et (f) feuilles avec bordure jaune, (g) un plant avec une tige de type chlorina et une tige de type viridis.

Les résultats du spectre et de la fréquence des mutations de la chlorophylle (nombre de plants et pourcentage) dans la génération M₂ de pois chiche sont présentés dans le tableau 6. Parmi les cinq types de mutations de la chlorophylle, le type albina représente le pourcentage le plus faible (0,07 %). Le pourcentage des mutants chlorina, xantha, viridis et autres était de 0,72%, 1,78%, 2,15% et 7,14% respectivement.

Tab. 6. Spectre et fréquence des mutations de la chlorophylle dans la génération M₂ de pois chiche.

Spectre de mutations	Nombre de plants	Pourcentage
Albina	3	0,07
Chlorina	29	0,72
Xantha	72	1,78
Viridis	87	2,15
Autres	289	7,14
Total	480	11,85

3.2. Fertilité du pollen

Les résultats obtenus du taux de fertilité du pollen au sein de la génération M₂ de pois chiche montrent une variabilité entre les familles pour ce paramètre. Les moyennes des taux de fertilité pour les trente-cinq familles évaluées sont comprises entre un minimum de 69,85% et un maximum de 99,89%. Les taux les plus faibles ont été obtenus chez les familles GH14, GH118 et GH103 avec des valeurs de 69,85%, 70,96% et 80,02% respectivement et les plus élevés ont été obtenus chez les familles GH43, GH51, GH54 et GH 46 avec des taux de 99,56%, 99,56%, 99,65% et 99,89% respectivement (Tab. 07). Les observations des grains de pollen, sous microscope optique à différents grossissements sont illustrées par la figure 20.

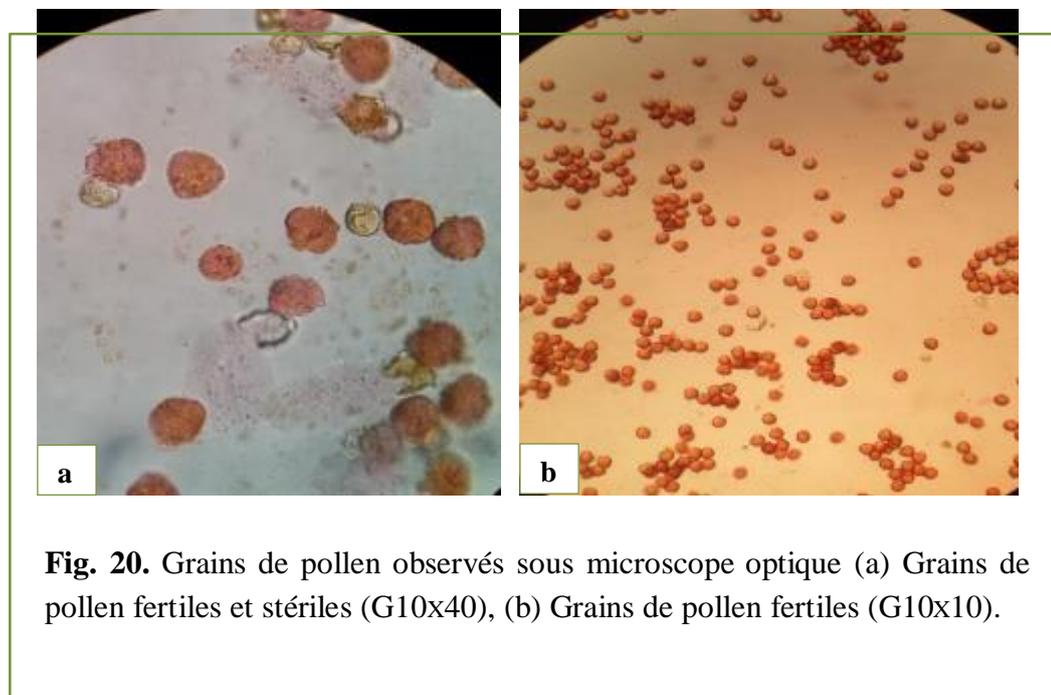


Fig. 20. Grains de pollen observés sous microscope optique (a) Grains de pollen fertiles et stériles (G10x40), (b) Grains de pollen fertiles (G10x10).

Tab. 7. Taux de fertilité du pollen par famille.

Familles	Taux de fertilité du pollen%	Familles	Taux de fertilité du pollen%
GH 14	69,85	GH 86	96,61
GH 118	70,96	GH 131	96,69
GH 103	80,02	GH 126	96,81
GH 30	84,21	GH 27	96,88
GH 130	84,63	GH 3	97,10
GH 79	86,14	GH 2	97,14
GH 64	86,38	GH 89	97,18
GH 1	86,88	GH 16	97,21
GH 32	87,70	GH 77	97,29
GH 39	88,59	GH 18	97,38
GH 22	88,76	GH 81	97,55
GH 76	89,06	GH 100	97,59
GH 61	89,35	GH 57	97,59
GH 25	89,42	GH 129	97,60
GH 67	91,40	GH 28	97,72
GH 112	93,07	GH 9	97,96
GH 37	93,52	GH 124	98,06
GH 47	93,66	GH 122	98,20
GH 93	93,78	GH 4	98,54
GH 69	94,35	GH 113	98,56
GH 42	94,75	GH 62	98,93
GH 78	94,76	GH 67	99,06
GH 90	94,87	GH 99	99,23
GH 5	95,54	GH 43	99,56
GH 120	96,12	GH 51	99,56
GH 66	96,12	GH 54	99,65
		GH 46	99,89

3.3. Variation génétique entre les familles

L'analyse des données montre que le coefficient de variation maximal (CV%) a été observé pour le nombre total de graines/plant et le rendement en grains (58,2% et 58,1% respectivement) suivi du nombre total de gousses / plant (55,3%), nombre de branches primaires (31%), poids de 100 graines (24,1%), hauteur de la première gousse (19,3%) et nombre de graines / gousse (18,4%). Alors que le coefficient de variation pour tous les autres caractères morphologiques était inférieur à 15%. Le coefficient de variation le plus faible a été enregistré pour le nombre de jours à la floraison (2,7%). L'analyse de la variance a montré une différence très hautement significative entre les familles pour tous les caractères étudiés. Les valeurs minimales et maximales pour chaque caractère indiquent un large intervalle de différence entre les génotypes (Tab. 8.).

Tab. 8. Estimation des paramètres génétiques de divers caractères quantitatifs dans la génération M₂ du pois chiche de type Kabuli.

Caractère	Moyenne	Intervalle	MSG	MSE	σ^2_g	σ^2_p	GCV	PCV	H ² %	GA	GA %	CV%
JF (Jours)	98,96	95,1-101,4	28,82***	7,072	7,25	14,32	2,72	3,82	51	3,95	3,99	2,7
JM (Jours)	144,7	139-149,2	115,66***	20,25	31,80	52,05	3,90	4,99	61	9,08	6,28	3,1
HPG (cm)	24,74	17,2-29,1	96,09***	22,69	24,47	47,16	19,99	27,76	52	7,34	29,67	19,3
HP (cm)	54,97	44,2-59,7	185,58***	40,58	48,33	88,91	12,65	17,15	54	10,56	19,21	11,6
NBP	3,12	2,2-3,9	2,67***	0,92	0,58	1,50	24,48	39,30	39	0,98	31,41	31,0
NGPGS	0,99	0,8-1,3	0,11***	0,033	0,03	0,06	16,18	24,47	44	0,22	22,05	18,4
GSPP	53,64	31,9-87,8	3 076,50***	857,40	739,70	1597,10	50,70	74,50	46	38,13	71,08	55,3
GPP	54,35	30,1-87,2	3 546,00***	974,70	857,10	1831,80	53,87	78,75	47	41,25	75,90	58,2
RG (g/plant)	18,33	9,5-28,3	401,80***	110,40	97,13	207,53	53,77	78,59	47	13,89	75,78	58,1
PCG (g)	33,54	21,3-39,9	198,99***	65,45	44,51	109,96	19,89	31,27	40	8,74	26,07	24,1

*** Significatif à 0,001 niveau de probabilité. MSG= Carré moyen du génotype. MSE=Carré moyen d'erreur. σ^2_g =Variance génotypique. σ^2_p =Variance phénotypique. GCV=Coefficient de Variation Génétique. PCV=Coefficient de Variation Phénotypique. H²= Héritabilité au sens large. GA= Gain génétique attendu à 5% de la moyenne. CV=Coefficient de Variation.

3.4. Valeur de sélection des caractères

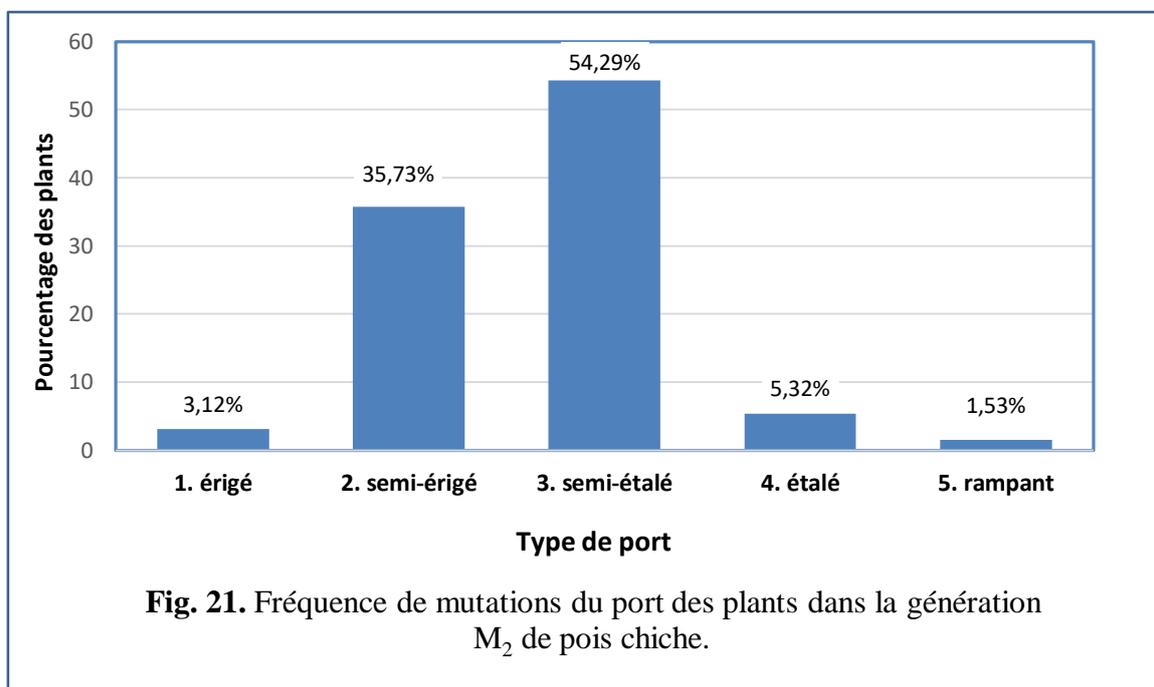
Nous avons observé que les valeurs estimées des paramètres génétiques, correspondant à divers caractères quantitatifs dans la génération M₂, ont varié d'un caractère à un autre. Il est révélé que les plus grandes variances génotypiques et phénotypiques étaient pour le nombre de graines par plant, suivi du nombre de gousses par plant.

Les estimations du Coefficient de Variation Phénotypique (PCV) dans tous les caractères étaient plus élevées que les estimations du Coefficient de Variation Génétique (GCV) correspondant. Les estimations les plus élevées de GCV (> 20%) ont été enregistrées pour le nombre de graines par plant et le rendement en grains (53,87% et 53,77% respectivement) suivies du nombre de gousses par plant (50,70%) et du nombre de branches primaires (24,48%). Néanmoins, les plus petits GCV étaient pour le nombre de jours à la floraison (2,72%) ; alors que l'ordre de classification des caractères obtenu est le même pour les valeurs PCV. Aussi, les valeurs les plus élevées de PCV (> 20%) étaient pour le nombre de graines par plant et le rendement en grains (78,75% et 78,59% respectivement), suivis du nombre de gousses par plant (74,50%), du nombre de branches primaires et du poids de cent graines (39,30% et 31,27% respectivement). Le plus petit PCV était pour le nombre de jours à la floraison (3,82%).

Le même résultat a été obtenu pour le gain génétique attendu exprimé en pourcentage de la moyenne. Les estimations les plus élevées du gain génétique attendu (> 30%) ont été enregistrées pour le nombre de graines par plant et le rendement en grains (75,90% et 75,78% respectivement), suivis du nombre de gousses par plant (71,08%). La valeur la plus faible pour le gain génétique attendu était pour le nombre de jours à la floraison (3,99%). Les valeurs les plus élevées de l'héritabilité au sens large (> 60%) ont été enregistrées pour le nombre de jours à la maturité (61%). Des valeurs modérées, comprises entre 39 et 54%, ont été notées pour tous les autres caractères étudiés (Tab. 8). Trois caractères quantitatifs, à savoir, le rendement en grain, le nombre de gousses par plant et le nombre de graines par plant ont été enregistrés avec un PCV élevé (> 70%) et un GCV élevé (> 50%), associé à une héritabilité modérée (46-47%) et un gain génétique attendu élevé soit plus de 70%. La variabilité génétique accrue pour ces caractères offre une grande possibilité de sélection ultérieure.

3.5. Fréquence des mutations du port des plants

Dans la génération M_2 de pois chiche, cinq types de mutation de port ont été observés : érigé, semi-érigé, semi-étalé, étalé et rampant. Les résultats de la fréquence de ces mutations, représentés par la figure 21, montrent que la fréquence la plus élevée a été enregistrée pour le type de port semi-étalé, similaire à celui du témoin, avec 54,29% (soit 1948 plants), suivie par le type semi-érigé avec 35,73% (soit 1282 plants). Tandis que pour les types étalé et érigé, des fréquences de 5,32% (soit 191 plants) et de 3,12% (soit 112 plants) ont été enregistrées respectivement. La fréquence la plus faible a été enregistrée pour le type de port rampant avec 1,53%, soit 55 plants seulement.



3.6. Relation entre les caractères

Les coefficients de corrélation entre les caractères morphologiques et le rendement et ses composantes ont montré que le rendement en grains était hautement significatif et positivement corrélé avec le nombre de gousses et de graines par plant (Tab. 9). Ces deux derniers caractères ont une corrélation positive avec la hauteur du plant, le nombre de branches primaires, le nombre de graines par gousse et une corrélation négative avec le nombre de jours à la floraison, le nombre de jours à la maturité et la hauteur de la première gousse. Des corrélations positives du rendement en grains ont également été observées pour la hauteur des plants, le nombre de graines par gousse, le poids de 100 graines et le nombre de branches primaires. D'autre part, le rendement en grains a une corrélation négative avec le

nombre de jours à la floraison et à la maturité et la hauteur de la première gousse. Une autre corrélation négative importante a été observée entre la hauteur du plant et le nombre de jours à la floraison (Tab. 9).

Tab. 9. Coefficients de corrélation entre les caractères quantitatifs dans la génération M₂ de pois chiche.

	JF	JM	HP	HPG	NBP	NGPGS	GSPP	GPP	RG	PCG
JF	1									
JM	0,312**	1								
HP	-0,227**	-0,031	1							
HPG	0,085**	0,299**	0,236**	1						
NBP	-0,193**	0,035	0,275**	0,119**	1					
NGPGS	-0,042*	-0,160**	0,149**	-0,124**	-0,152**	1				
GSPP	-0,306**	-0,324**	0,515**	-0,266**	0,223**	0,242**	1			
GPP	-0,290**	-0,347**	0,495**	-0,277**	0,164**	0,399**	0,962**	1		
RG	-0,294**	-0,328**	0,519**	-0,265**	0,150**	0,356**	0,930**	0,946**	1	
PCG	-0,033	-0,008	0,137**	-0,018	-0,02	0,211**	0,065**	0,02	0,241**	1

* et ** indiquent la signification des valeurs à P <0,05 et 0,01 respectivement selon la corrélation de Pearson.

Le diagramme "Path" (Pathdiagrams) montrant les relations entre le rendement en grains et leurs composantes est présenté par la figure 22. Les effets directs, indirects et totaux des différents caractères sur le rendement en grains sont présentés au tableau 10. L'analyse "Path" a montré que le nombre total de graines a un effet direct positif ($p = 1,07$) suivi du poids de cent graines ($p = 0,23$). La hauteur du plant a montré un effet direct positif négligeable sur le rendement en grains par plant ($p = 0,03$). La hauteur du plant, a eu un effet indirect positif important ($p = 0,55$) sur le nombre total en grains par plant. Le nombre de graines par gousse et le nombre total de gousses par plant ont contribué avec des effets directs négatifs (avec la même valeur pour les deux caractères $p = -0,11$) sur le rendement en grains. Alors que, le nombre de jours à la floraison, la hauteur de la première gousse et le nombre de branches primaires ont montré des effets directs négatifs et négligeables sur le rendement en grains ($p = -0,01$, $p = -0,01$ et $p = -0,02$ respectivement).

En ce qui concerne les effets indirects sur le rendement en grains par plant (Tab. 10), nous avons constaté que le nombre total des gousses par plant présentait un effet indirect positif maximal ($p = 1,04$) suivi de la hauteur des plants ($p = 0,55$), du nombre de graines par gousse ($0,47$), de la hauteur de la première gousse ($0,38$), du nombre de branches primaires ($p = 0,18$) et du poids de cent graines ($p = 0,01$). Alors que, le nombre de jours à la floraison ($p = -0,35$), le nombre de jours à la maturité ($p = -0,40$) et le nombre total de graines par plant ($p = -0,13$) ont montré un effet indirect négatif sur le rendement en grains.

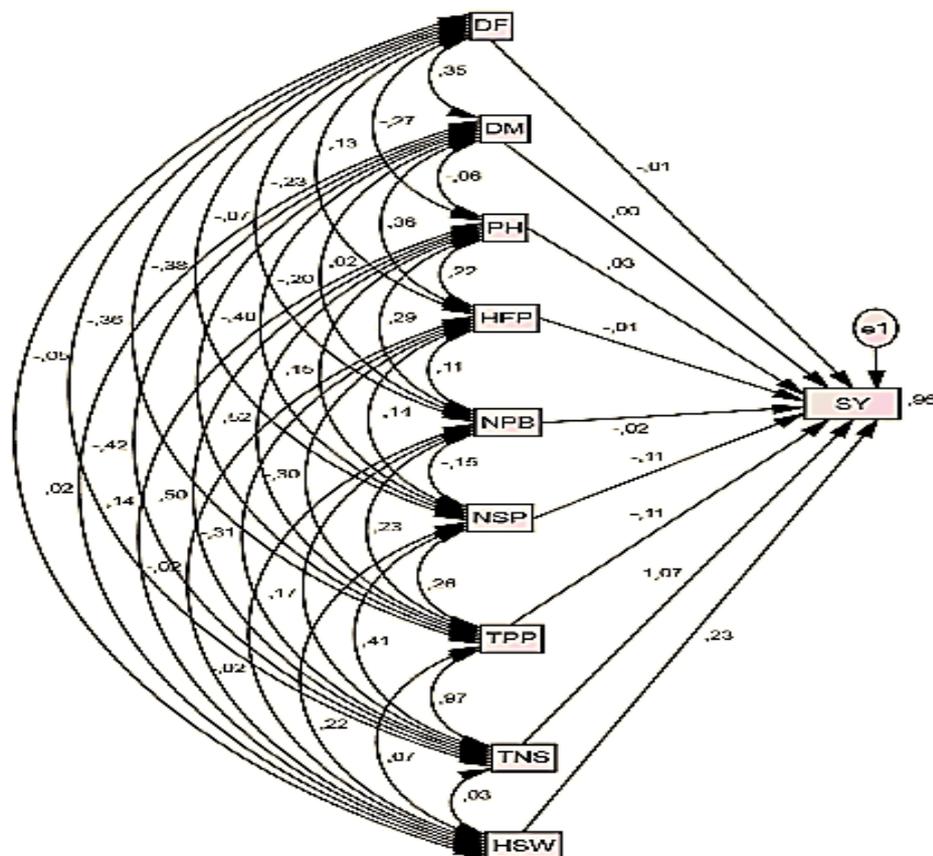


Fig. 22. Path diagramme représentant les relations entre les différents caractères et le rendement en grains dans la génération M₂ de pois chiche.

SY= Rendement en grain (**RG**), **DF**= Jours jusqu'à la floraison (**JF**), **DM**= Jours jusqu'à la maturité (**JM**), **PH**= hauteur du plant (**HP**), **HFP**= Hauteur de la première gousse (**HPG**), **NPB**= Nombre de branches primaires par plant (**NBP**), **NSP**= Nombre de graines par gousse (**NGPGS**), **TPP**= Nombre total de gousses par plant (**GSPP**), **TNS**= Nombre total de graines par plant (**GPP**), **HSW**=Poids de 100 graines **PCG**.

Tab. 10. Analyse "Path" montrant l'effet direct et indirect de différents caractères sur le rendement en grains dans la génération M₂ de pois chiche de type Kabuli.

Caractère	Effet indirect sur RG									Effets totaux		Corrélation totale avec RG
	JF	JM	HP	HPG	NBP	NGPGS	GSPP	GPP	PCG	Direct	Indirect	
JF		0,000	-0,008	-0,001	0,005	0,008	0,042	-0,385	-0,012	-0,01	-0,35	-0,36
JM	-0,0035		-0,002	-0,004	0,000	0,022	0,044	-0,449	-0,005	0,00	-0,40	-0,40
HP	0,0027	0,000		-0,002	-0,006	-0,017	-0,057	0,599	0,032	0,03	0,55	0,59
HPG	-0,0013	0,000	0,007		-0,002	0,015	0,033	0,332	-0,005	-0,01	0,38	0,37
NBP	0,0023	0,000	0,009	-0,001		0,017	-0,025	0,182	-0,005	-0,02	0,18	0,16
NGPGS	0,0007	0,000	0,005	0,001	0,003		-0,029	0,439	0,051	-0,11	0,47	0,37
GSPP	0,0038	0,000	0,016	0,003	-0,005	-0,029		1,038	0,016	-0,11	1,04	0,93
GPP	0,0036	0,000	0,015	-0,003	-0,003	-0,045	-0,107		0,007	1,07	-0,13	0,94
PCG	0,0005	0,000	0,004	0,000	0,000	-0,024	-0,008	0,032		0,23	0,01	0,24

3.7. Structure de la population M₂

L'analyse de Clustering de la performance phénotypique, basée sur dix caractères quantitatifs en utilisant la distance de Mahalanobis dans la méthode de classification par agglomération hiérarchique de Ward, a regroupé les 135 familles M₂ de pois chiche en neuf groupes (Fig. 23). Parmi les 9 groupes (clusters), le groupe II renferme le plus grand nombre de familles (36), suivi des groupes V et IV qui comptent respectivement 28 et 23 familles. Les groupes IX et I renferment respectivement 13 et 12 familles. Les groupes III et VI regroupent chacun 11 familles, alors que les groupes VII et VIII ne contiennent qu'une seule famille chacun. Le témoin appartient au cluster VI.

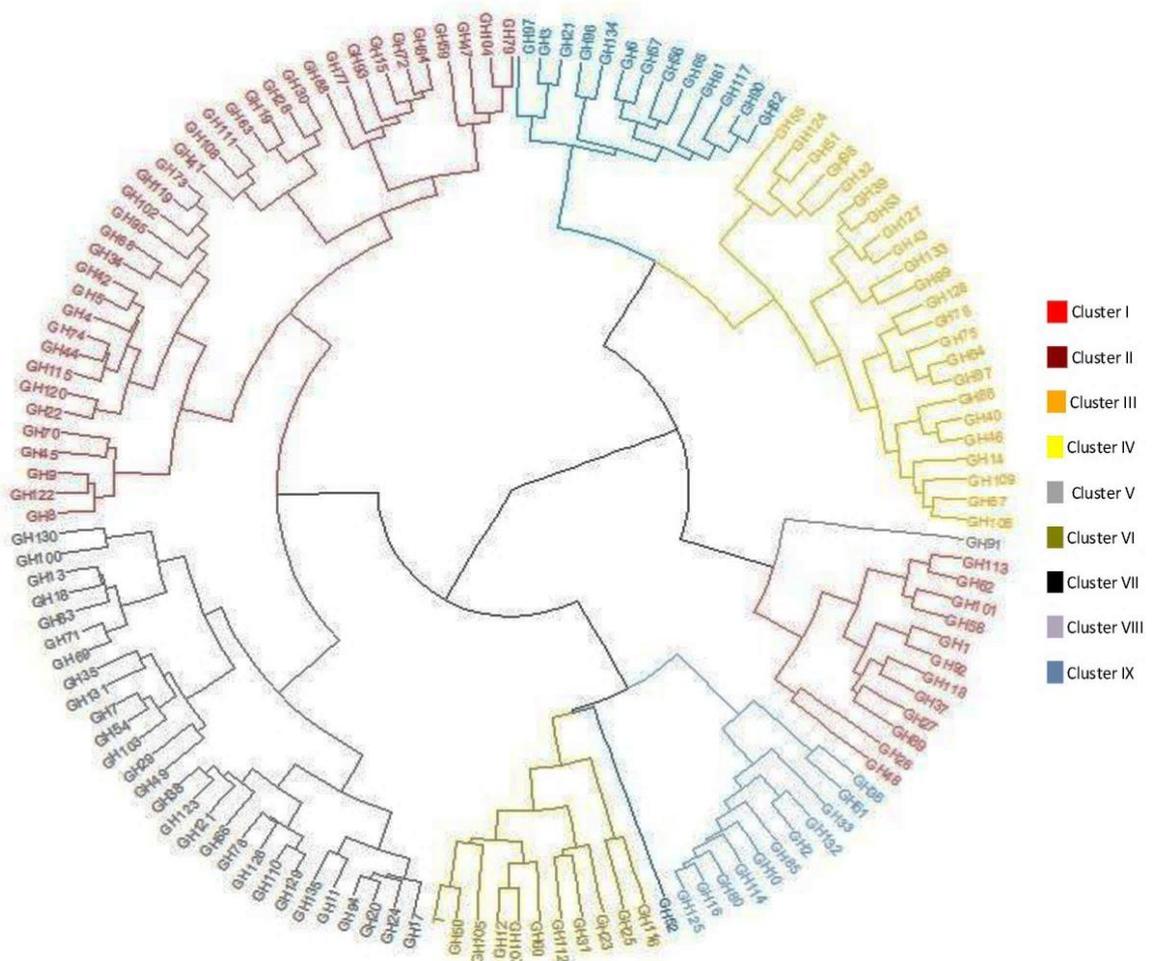


Fig. 23. Phénogramme montrant le groupement hiérarchique de 135 familles de pois chiche M₂. La distance de Mahalanobis utilisée pour la classification basée sur dix caractères quantitatifs.

La moyenne des clusters pour chaque caractère est présentée dans le tableau 11. Les résultats ont montré que la valeur moyenne la plus élevée pour le début floraison (100 jours) et la maturité (147 jours) a été observée dans le groupe IX, tandis que la valeur moyenne la plus petite pour ces caractères était observée dans le groupe VIII (95 jours et 140 jours respectivement). Le groupe II présentait les valeurs moyennes les plus élevées pour le nombre de branches primaires (3,29) et la hauteur des plants (56,25 cm), cependant les valeurs moyennes les plus faibles ont été observées dans le groupe VIII (2,46 et 44,21 cm respectivement). Le groupe VI présentait les valeurs moyennes les plus élevées pour le nombre total de gousses (71,30) et de graines par plant (73,69) et le rendement en grains par plant (23,22 g). Les valeurs moyennes les plus faibles pour le nombre total de gousses (40,36) et de graines par plant (40,77) ont été trouvées dans le groupe IX, alors que pour le rendement en grains par plant elles ont été observées dans le groupe VIII (13,74 g) suivi par le groupe IX (13,89 g). Les résultats globaux indiquent que les valeurs moyennes maximales pour la plupart des caractères contribuant au rendement ont été observées dans le groupe VI.

Tab. 11. Moyennes des Cluster des 135 familles de pois chiche M₂ pour les différents caractères quantitatifs.

Caractère	Cluster I	Cluster II	Cluster III	Cluster IV	Cluster V	Cluster* VI	Cluster VII	Cluster VIII	Cluster IX
JF (jours)	98,59	98,31	98,68	98,94	99,13	97,52	99,93	95,14	100,02
JM (jours)	143,63	144,16	142,92	145,45	145,93	142,17	146,15	140,28	147,12
HP (cm)	51,33	56,25	55,88	53,94	56,02	55,09	55,28	44,21	53,52
HPG (cm)	22,86	24,91	24,39	25,14	25,58	22,54	27,48	19,58	26,36
NBP	2,92	3,29	2,63	3,26	3,03	3,21	3,28	2,46	3,06
NGPGS	0,97	0,98	1,05	0,95	0,99	1,04	1,32	0,78	1,00
GSPP	51,75	59,02	59,50	43,10	51,75	71,30	50,96	49,63	40,36
GPP	52,16	59,10	62,76	42,97	51,63	73,96	72,72	46,83	40,77
RG (g/plant)	16,87	20,23	22,22	14,16	18,17	23,22	17,36	13,74	13,89
PCG (g)	32,71	33,98	35,19	31,79	35,19	31,87	21,33	26,71	34,16

* Le témoin est représenté dans ce cluster

3.8. Sélection de mutants prometteurs M₂

Les résultats du test de Dunnett pour les dix caractères quantitatifs étudiés sont énumérés dans le tableau 12. Ces données indiquent une variabilité entre les familles étudiées. Pour les dix caractères, il y avait des familles avec des valeurs moyennes significativement différentes du témoin Ghab 4. Selon le test de Dunnett, 37 familles M₂ supérieures au témoin ont été déterminées pour 5 caractères agronomiques (le nombre de jours à la floraison, le nombre de jours à la maturité, la hauteur de la première gousse (cm), le nombre de branches primaires et le nombre de graines par gousse).

Compte tenu du nombre de jours à la floraison et du nombre de jours à la maturité, dix-huit et treize familles, respectivement, ont présenté des valeurs moyennes supérieures à celles du témoin. Une seule famille a montré des valeurs moyennes inférieures au témoin, tandis que les autres sont restées dans la même classe du témoin.

Pour le caractère hauteur de la première gousse, quatre familles M₂ ont montré des moyennes au-dessus du témoin. Pour le nombre de branches primaires et le nombre de graines par gousse, une famille de mutants a montré une performance supérieure par rapport au témoin. Cependant, pour les caractères suivants : le nombre total de gousses par plant, le nombre total de graines par plant, le rendement en grain et le poids de cent graines, aucune différence positive ou significative n'a été identifiée par rapport au cultivar parental avec le test de Dunnett.

Par contre, les groupements de moyennes, selon l'analyse du test de Fisher (LSD) pour ces caractères, ont montré des différences significatives. Compte tenu du nombre total de gousses par plant, neuf familles ont présenté des valeurs moyennes supérieures à celles du témoin. Pour le nombre total de graines par plant et le rendement en grain, quatre familles (GH105, GH50, GH112 et GH60) et deux familles (GH105 et GH50), respectivement, ont montré des moyennes au-dessus du témoin. Enfin, trente familles présentaient un poids de cent graines qui est supérieur à celui du témoin. Pour la hauteur du plant, selon l'analyse du test de Fisher (LSD), sept familles (GH108, GH50, GH66, GH38, GH111, GH28 et GH41) ont présenté des valeurs moyennes supérieures à celles du témoin.

Tab. 12. Comparaison des moyennes avec celles du témoin (test de Dunnett) des 135 familles M₂.

Caractère	Nombre de familles inférieures	Nombre de familles supérieures
Jours à la floraison (Jours)	1	18
Jours à la maturité (Jours)	1	13
Hauteur du plant (cm)	22	0
Hauteur de la première gousse	2	4
Nombre de branches primaires	0	1
Nombre de graines/gousse	8	1
Nombre total de gousses/plant	23	0
Nombre total de graines/plant	36	0
Rendement en grains (g)	55	0
Poids de cent graines (g)	4	0

4. Discussion

La variabilité génétique est une condition préalable pour la sélection de génotypes supérieurs dans n'importe quelle culture. Cependant, des milliers d'années de sélection humaine ont conduit à la perte de variations alléliques potentiellement importantes. Les stratégies qui visent à augmenter la variation génétique au sein d'une espèce cultivée peuvent améliorer considérablement l'efficacité du processus de sélection. Contrairement aux croisements colossaux, la mutagenèse peut être appliquée directement au cultivar élite sans traîner de liaison indésirable. Dans cette étude, nous avons utilisé l'irradiation gamma sur le pois chiche. Le succès de cette approche repose sur l'application d'une dose d'irradiation qui induit une variation suffisante tout en maintenant la fertilité. La variation peut être mesurée phénotypiquement et génotypiquement, alors que l'analyse génotypique permet des estimations précises de la variation de l'ADN. L'analyse phénotypique fournit des données importantes sur l'expression des caractères utiles et leur héritabilité.

4.1. Mutations chlorophylliennes

Les mutations chlorophylliennes sont utilisées comme marqueurs pour l'évaluation de l'action des facteurs mutagènes sur les gènes dans les études d'induction de mutations (Gaul, 1964). Le spectre et la fréquence des mutants de la chlorophylle s'observent facilement dans la population M₂ et ils sont utilisés comme principal indice d'efficacité des mutagènes (Sarwar and Haq, 2005). En conséquence, l'effet mutagène se traduit par la ségrégation des mutants

de la chlorophylle. Les chimères déficientes en chlorophylle de la génération M₁ et leur ségrégation dans la génération M₂ sont souvent observées dans une population mutagénisée (Kozkar, 2014).

Plusieurs auteurs ont signalé l'apparition de différents types de mutations chlorophylliennes dans la génération M₂, telles que : albina, xantha, chlorina, viridis,... etc, après traitement avec divers agents mutagènes chez différentes espèces. Ainsi, les résultats de la présente étude montrent que la dose de 280 Gy s'est révélée efficace pour induire des mutations chlorophylliennes de type albina, xantha, chlorina et viridis.

Parmi les travaux sur les mutations de la chlorophylle induites chez les légumineuses, nous indiquons ceux de Haq (1990) ; Khan *et al.* (2005) ; Shah *et al.* (2006) ; Kozkar (2014) ; Kashid et More (2015) ; Bara *et al.* (2017), sur le pois chiche, ceux de Reddy *et al.* (1993) et Paul et Singh (2002) sur les lentilles, ceux de Wani (2011) ; Mishra *et al.* (2013) sur le haricot mungo et ceux de John (1999) et Girija et Dhanavel (2009) sur le niébé.

Les fréquences des mutations chlorophylliennes, rapportées par plusieurs auteurs et dans différentes cultures avec différents mutagènes, se sont révélées être très différentes. Aussi, les mutagènes chimiques induisent une fréquence plus élevée que les radiations pour ces mutations (Sharma et Sharma, 1981 ; Tripathi et Dubey, 1992 ; Kharkwal, 1998 ; Singh *et al.*, 2000 ; Karthika et Subbalakshmi, 2006 ; Lal *et al.*, 2009).

Nos résultats concordent avec ceux de Haq (1990) pour les mêmes quatre types de mutations de la chlorophylle obtenus (albina, xantha, chlorina, et viridis) ; de même pour le nombre plus faible qui a été signalé chez le type albina.

Dans notre étude, les fréquences obtenues de ces mutations chlorophylliennes, ont été classées comme suit : viridis>xantha>chlorina>albina. Ce même ordre a été noté par Shah *et al.* (2006) dans la génération M₂ de quatre génotypes de pois chiche ; alors qu'un ordre différent (xantha>chlorina>viridis>albina) a été signalé par Haq (1990) chez trois génotypes de pois chiche.

Concernant les pourcentages signalés pour ces mutations, les valeurs obtenues dans cette étude (comme le montre le tableau 6) sont plus importantes que celles obtenues par Shah *et al.* (2006) chez la variété (Pb1) de type Kabuli, ou des pourcentages de 0,43 et 0,47% de type viridis, de 0,47 et 0,56% de type xantha, de 0,23 et 0,36% de type chlorina, et de 0 et 0,02%

pour le type albina, ont été signalés avec l'utilisation des doses de 200 et 300 Gy respectivement.

Hemavathy et Ravindran (2005) ont constaté que la présence du type albina était moins importante que celles des types chlorina et xantha dans la population de Vigna mungo traitée aux rayons gamma. Ainsi, ces résultats concordent avec ceux obtenus dans notre étude chez le pois chiche. Par ailleurs, Mishra *et al.* (2013) ont constaté un taux plus élevé en chlorina (2,15% et 2,28%), suivi du type viridis, puis xantha et enfin le type albina sur le haricot mungo traité avec des doses de 200 à 600 Gy.

4.2. Fertilité du pollen

Plusieurs travaux ont montré que les rayons gamma entraînaient une réduction de la fertilité du pollen. Dans la présente étude, différents taux de fertilité du pollen ont été observés dans la génération M₂ de pois chiche traité par les rayons gamma. Ils sont compris entre un minimum de 69,85% et un maximum de 99,8%. De ce fait, nous pouvons conclure que la dose utilisée a eu un effet négatif sur la fertilité du pollen. Toutefois, des taux compris entre 78,72% et 94,44% ont été obtenus, chez le pois chiche de type Kabuli (Var. BG-1053), par Kozkar (2014) avec l'utilisation des doses de rayons gamma comprises entre 100 et 400 Gy respectivement. Par ailleurs, des études sur différentes espèces ont montré que la baisse de la fertilité du pollen était corrélée aux aberrations méiotiques (Gaul, 1970 ; Patil, 1992; Dhamayanthi et Reddy, 2000 ; Kumar et Singh, 2003).

4.3. Variabilité et performance des mutants supérieurs pour la reproduction

L'analyse de la variance de notre population mutante a montré une différence très hautement significative entre les familles pour tous les caractères étudiés. Le maximum de variabilité a été observé pour le nombre de gousses par plant, le nombre de graines par plant et le rendement en grains, pour lesquelles le coefficient de variation était très élevé. Chez le pois chiche, plusieurs chercheurs ont signalé une variabilité génétique accrue pour différents caractères agronomiques dans des populations traitées par mutagène (Nerker et Mote, 1978 ; Barshile *et al.*, 2009 ; Wani *et al.*, 2014).

La valeur de l'héritabilité dépend de l'ampleur de toutes les composantes de la variance et un changement dans l'une des valeurs de la variance peut l'affecter (Kozkar, 2014). D'autre part, selon Johnson *et al.* (1955), les estimations de l'héritabilité avec le progrès génétique (gain génétique attendu) sont généralement plus utiles que la valeur de l'héritabilité seule pour

prédire les effets résultants pour la sélection des meilleurs génotypes. Dans notre population, les estimations du coefficient de variation phénotypique étaient plus élevées que celles du coefficient de variation génotypique pour tous les caractères quantitatifs étudiés ; indiquant ainsi que la variation apparente était non seulement génétique mais également influencée par l'environnement de développement dans l'expression des caractères.

Malik *et al.* (1988) ; Arshad *et al.* (2004) ; Saki *et al.* (2009) et Barshile et Apparao (2009) ont rapporté des résultats similaires chez le pois chiche. Roychowdhury *et al.* (2012) chez le haricot mungo (*Vigna radiata* L.) et Usharani et Anonda Kumar (2016) chez le gramme noir (*Vigna mungo* L. Hepper) ont aussi noté des résultats similaires dans la génération M₂. Le gain génétique élevé, exprimé en pourcentage de la moyenne pour le rendement en grains par plant et le nombre de gousses par plant observé dans la présente étude, a également été signalé par Raval (2001) ; Parshuram *et al.* (2003) et Vaghela *et al.* (2009).

Une héritabilité élevée avec un gain génétique modéré, observés dans la population mutante, indiquent que les caractères étaient régis par une interaction génétique additive. Il est intéressant de considérer que les caractères importants pour la reproduction peuvent être dus à la mutation de plus d'un locus. En outre, des estimations élevées des composantes génétiques (GCV, PCV, H² et GA), notées dans cette étude pour le rendement en grains, le nombre de gousses et de graines par plant, ont également été restituées par Adhikari et Pandey (1982) ; Arora, (1991) ; Wani et Khan, (2006) ; Yimram *et al.* (2009) ; Degefa *et al.* (2014) et Raturi *et al.* (2015) chez deux légumineuses (pois chiche et haricot mungo).

4.4. Meilleurs caractères pour une sélection efficace

La relation positive et significative entre le nombre de gousses et de graines par plant et le rendement en grains indique l'importance de ces caractères pour déterminer le rendement en grains. Des corrélations positives similaires ont été rapportées par Hassan *et al.* (2005). Le résultat concernant les corrélations positives du rendement en grain observées avec la hauteur du plant, le nombre de graines par gousse, le poids de cent graines et le nombre de branches primaires complètent les constatations de Malik *et al.* (1987) ; de Khan *et al.* (1989) ; de Arshad *et al.* (2004) et de Islam *et al.* (2008). L'étude de Mallu *et al.* (2015) sur le pois chiche a montré la même corrélation négative obtenue dans cette étude du rendement en grain avec le nombre de jours jusqu'à 50% de floraison. Nos résultats concernant l'analyse "Path" pour le nombre total de graines par plante, le poids de cent graines et la hauteur des plants sont en accord avec les résultats de Hassan *et al.* (2005) sur des lignées de pois chiche mutantes, sauf

pour la hauteur du plant qui a eu un effet indirect positif maximal par le biais du poids de cent graines et non pas par le nombre total de graines par plante. Khan et Qureshi (2001) ont indiqué que le poids de cent graines avait un effet positif direct sur le rendement en grains par plant. Cependant, l'effet direct et positif le plus élevé du nombre de graines par plant sur le rendement en grains confirme les résultats de Samad *et al.* (2014) chez le pois chiche.

L'analyse de corrélation a montré par conséquent une relation positive et significative entre le nombre de gousses par plant et le rendement en grains ; mais l'analyse "Path" a montré que son effet direct était négatif. Ainsi, la relation positive était en raison de ses effets indirects positifs via le nombre de graines par plant. Ces résultats observés dans cette étude ont été également rapportés par Hassan *et al.* (2005). Alors que la corrélation associée à l'analyse des coefficients "Path" a révélé que le nombre de graines par plant avait une relation directe avec le rendement en grains. Cette étude suggère que pour améliorer le rendement en grains, la sélection du nombre de gousses par plant et du nombre de graines par plant donnera des résultats positifs. L'analyse de groupement hiérarchique basée sur dix caractères quantitatifs montre un haut niveau de diversité entre les familles de pois chiche M₂. Un cluster (Cluster VI) parmi neuf présentait les valeurs moyennes les plus élevées pour le nombre total de gousses et de graines par plant et le rendement en grains par plant.

Parmi les divers caractères étudiés chez le pois chiche, les plus importants dans les programmes de sélection sont le rendement en grains, la hauteur des plants et de la première gousse et le poids des grains. Cependant, l'utilisation de types érigés faciliterait la récolte, à la fois manuellement et mécaniquement (Patil, 2013). Selon Chaturvedi *et al.* (2016), le développement des variétés de pois chiches pour leur aptitude à la récolte mécanique est l'une des stratégies potentielles pour réduire le coût de la culture. Le résultat obtenu dans la présente étude, pour la hauteur du plant est en accord avec celui obtenu par Luz *et al.* (2016), chez des familles de mutants de riz, qui ont rapporté que parmi les caractères, la hauteur du plant était la plus affectée par le mutagène. Cependant, la réduction de la hauteur des plants a également été rapportée par Khan *et al.* (2005), Wani (2011) et Kozgar (2014) chez des familles de mutants de pois chiche.

Toutefois, le développement de variétés à haut rendement couplées à un port approprié est essentiel chez le pois chiche (Wani *et al.*, 2011). Plusieurs travaux ont montré l'effet des agents mutagènes sur le port des plants chez plusieurs légumineuses à grains et chez le pois chiche (Kharkwal *et al.*, 1988 ; Haq, 1990 ; Ahmad and Godward, 1993 ; Solanki and Sharma, 1999 ; Kharkwal, 1999 ; Qureshi *et al.*, 2004 ; Shah *et al.*, 2005 ; Kozkar, 2014 ; Laskar *et*

al., 2015, Raina *et al.*, 2017). Les résultats de la présente étude montrent que la dose utilisée s'est révélée efficace pour induire des mutations de port de types ; érigé, semi-érigé, semi-étalé, étalé et rampant. Selon Wani *et al.* (2011), la fréquence des mutants morphologiques, y compris le type de port, différait selon les traitements mutagènes et les variétés utilisés. Ainsi, le type de plante dressée (ou érigée) avec un meilleur rendement sont recherchés dans une population de mutants. En effet, l'un des objectifs de notre travail est d'obtenir des plants avec des ports érigés afin de minimiser les pertes lors de la récolte. Dans cette population M₂ de pois chiche, 112 plants mutants avec un port de type érigé ont été induits.

5. Conclusion

Une population mutante de 4 050 plants M₂ représentant 135 familles a été produite à partir du traitement des graines de pois chiche de la variété Ghab 4 avec une irradiation gamma de 280 Grays. Des observations et des mesures phénotypiques ont été faites sur cette population pour déterminer l'effet du traitement d'irradiation et l'évaluation de la variabilité génétique au sein de cette génération M₂.

Les résultats obtenus ont montré une variation très hautement significative pour les caractères liés à la phénologie (floraison et maturité), à la morphologie de la partie végétative (hauteur du plant, hauteur de la première gousse, nombre de branches primaires par plante) et au rendement (nombre de graines par gousse, nombre total de gousses par plant, nombre total de graines par plant, rendement en grains et poids de cent graines). D'autre part, la dose de 280 Grays s'est révélée efficace pour induire des mutations chlorophylliennes de type : albina, xantha, chlorina, et viridis et des mutations de port de types : érigé, semi-érigé, semi-étalé, étalé et rampant.

Les estimations les plus élevées des paramètres génétiques (coefficient de variation génotypique et phénotypique, héritabilité au sens large et gain génétique) ont été enregistrées pour le nombre de graines par plant et le rendement en graines. Le rendement en grains était hautement significatif et positivement corrélé avec le nombre de gousses et de graines par plant. L'analyse "Path" a montré que le nombre total de graines par plant avait un effet direct positif le plus élevé, suivi par le poids de cent graines. Un groupe sur neuf présentait les valeurs moyennes les plus élevées pour le nombre total de gousses et de graines par plant et le rendement en graines par plant. Selon le test de Dunnett, 37 familles M₂ supérieures au témoin ont été déterminées pour cinq caractères agronomiques.

CHAPITRE 4

ÉVALUATION MOLÉCULAIRE DE LA POPULATION M₂ PAR L'UTILISATION DU Low-Cost TILLING

1. INTRODUCTION

Récemment, les techniques de mutation ont également été intégrées à d'autres technologies moléculaires, telles que les techniques de marquage moléculaire ou de criblage de mutation à haut débit, et elles deviennent de plus en plus puissantes et efficaces pour la sélection variétale (Wani *et al.*, 2014). Ainsi, il a été démontré que l'utilisation de la méthode de génétique inverse, TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes), dans l'évaluation rapide de stocks de mutants pour une séquence génomique spécifique peut être très utile pour étudier la variabilité génétique au niveau moléculaire (Kozkar, 2014). C'est une méthode qui permet l'identification dirigée des mutations dans un gène très spécifique. Le TILLING combine une mutagenèse traditionnelle suivie d'une découverte de mutations à haut débit (Colbert *et al.*, 2001 ; Ranalli, 2012). Il constitue un outil efficace de dépistage précoce de mutations dans les gènes d'intérêt d'une population. Le TILLING permet aux généticiens d'analyser la fonction des gènes et d'associer un génotype à un phénotype. Il est généralement utilisé en association avec la mutagenèse chimique, mais il a été démontré qu'il peut également être utilisé pour le screening des populations mutantes irradiées avec les rayons gamma (Sato *et al.*, 2006) et aussi pour la découverte du polymorphisme nucléotidique naturel (Ecotilling) (Comai *et al.*, 2004). Cependant, cela nécessite des équipements spécialisés, des produits chimiques spécifiques et coûteux.

Des techniques peu coûteuses, faciles et non toxiques ont été développées par le laboratoire d'amélioration des plantes et de génétique FAO/AIEA (PBGL Seibersdorf, Autriche), convenant à la plupart des laboratoires ; y compris ceux des pays en développement (Huynh *et al.*, 2013). Ces techniques comprennent des approches pour l'extraction d'ADN génomique et l'extraction de nucléases monocaténares et des tests de clivage en mésappariement enzymatique à base de gel d'agarose pour la découverte de mutations (Hofinger *et al.*, 2017 ; Huynh *et al.*, 2017).

Ainsi, ce chapitre porte sur une évaluation de l'efficacité du TILLING à faible coût pour découvrir des mutations dans la génération M₂ de pois chiche. Les efforts ont été concentrés sur les gènes impliqués dans la résistance aux deux maladies importantes du pois chiche ; *Aschochyta blight* (AB) et *Fusarium wilt* (FW), ainsi que les gènes responsables de la floraison précoce.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Quatre-vingt-un échantillons de mutants putatifs de pois chiche M_2 ont été choisis pour des expériences d'optimisation pour les essais de TILLING à faible coût. La variété Ghab 4 de type Kabuli non muté et trois différents génotypes de pois chiche de type Desi ont été utilisés comme échantillons de contrôle (Fig. 24, Fig. 25).



Fig. 24. Plantules de mutants putatifs de pois chiche M_2 et le parent cultivés dans la serre PBGL.

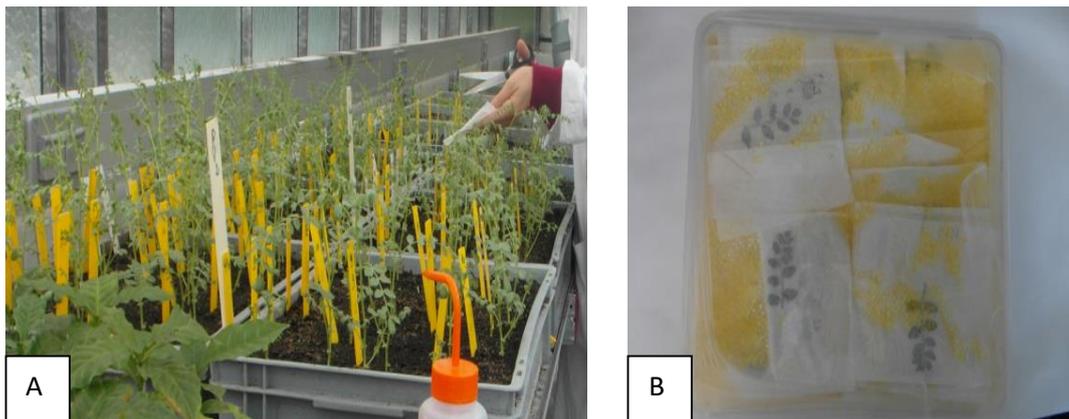


Fig. 25. (A) Collecte des feuilles de pois chiche, (B) Feuilles de pois chiche placées dans des enveloppes et stockées dans une boîte contenant du gel de silice pour l'extraction d'ADN.

2.2. Extraction de l'ADN génomique

Deux différents protocoles ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique des feuilles de pois chiche ; le protocole d'extraction d'ADN à faible coût développé par PBGL (Till *et al.*, 2015) et le kit commercial Qiagen. Concernant le protocole d'extraction de l'ADN génomique à faible coût, les feuilles ont été recueillies et placées dans des enveloppes puis stockées dans une boîte contenant du gel de silice (avec indicateur de couleur). Le tissu a été broyé en utilisant un vortex standard et des billes en carbure de tungstène. Les principales étapes de ce protocole impliquent la lyse du matériel végétal, la liaison de l'ADN à la poudre de silice (silice Celite 545) en présence d'un tampon chaotrope, le lavage de l'ADN lié et enfin l'élution de l'ADN de la poudre de silice (Annexe 9).

Quant au kit commercial Qiagen, les feuilles ont été recueillies et placées dans des tubes de 2 ml et congelées rapidement dans de l'azote liquide, soit immédiatement utilisées pour l'isolement de l'ADN, soit conservées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Les feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide en utilisant un Qiagen TissueLyser II (10 secondes à une fréquence de 1/30) et l'extraction de l'ADN a été réalisée conformément aux instructions du Qiagen Plant Mini Kit (Annexe 10).

2.3. Quantification et normalisation de l'ADN génomique

L'ADN génomique extrait a été quantifié en utilisant un gel d'agarose à 1% avec des standards d'ADN lambda et un spectrophotomètre NanoDrop 1000.

2.3.1. Sur gel agarose

Une bonne estimation de la quantité d'ADN peut être obtenue en utilisant une électrophorèse sur gel où l'ADN extrait et une série de dilution d'un ADN standard sont visualisés sur un gel d'agarose 1%. Après coloration à l'éthidium de bromure, le gel est exposé à la lumière UV. Les concentrations d'ADN inconnues peuvent être estimées par la comparaison de l'intensité des bandes de l'ADN extrait avec les bandes des ADN standards. Cependant, il faut être extrêmement prudent pour mettre la même quantité d'ADN et des standards dans les puits. Sans cela, nous ne pouvons pas comparer nos échantillons avec précision.

2.3.2. Avec l'utilisation du spectromètre Nanodrop

Des mesures de la concentration de l'ADN peuvent être obtenues directement par la mesure de l'absorbance avec l'utilisation d'un spectromètre Nanodrop connecté à un ordinateur comportant un logiciel spécifique. La quantification est basée sur le trajet optique de 1 mm avec l'utilisation de 1 μ l d'échantillon de l'ADN sans dilution préalable. A la fin d'une série de mesures, les résultats sont obtenus dans un fichier enregistré automatiquement dans l'ordinateur.

2.3.3. Normalisation de la concentration de l'ADN génomique

Les échantillons d'ADN génomique ont été ensuite normalisés à une concentration commune en utilisant les résultats obtenus à partir de l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec des étalons (standards) d'ADN lambda et par lecture sur Spectrophotomètre NanoDrop 1000. La normalisation de l'ADN est nécessaire pour rassembler les échantillons pour le TILLING, de telle sorte que chaque échantillon dans un pool est également représenté dans l'étape d'amplification PCR en aval.

2.4. Recherche sur la base de données de gènes candidats impliqués dans la résistance à l'antracnose, à la fusariose et à la floraison précoce chez le pois chiche.

Les amorces ont été conçues avec l'utilisation de la base de données NCBI et du programme Primer3. Les programmes Web CODDLE (Codons Optimized to Discover Deleterious Lesions) ; <http://www.proweb.org/input/> et Primer3 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

2.5. Test d'amorces et TILLING à faible coût

Le TILLING à faible coût avec l'utilisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose standard a été adapté pour le pois chiche. Les deux principales étapes du processus sont : l'amplification PCR qui utilise des amorces géniques spécifiques avec l'ADN génomique matriciel provenant de plantes M_2 et de parents, suivie d'un clivage enzymatique des mésappariements et d'une visualisation sur gel d'agarose des produits de mésappariement enzymatique (Till *et al.*, 2015).

2.5.1. Test d'amorces par amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Différentes concentrations d'ADN ont été testées (0,1, 0,5, 1, 5 et 10 ng/ μ L) et une concentration de 1 ng/ μ L a été choisie pour les dosages ultérieurs. Le mélange de PCR suivant a été utilisé : 82,5 μ L H₂O, 15 μ L de tampon 10x Ex Taq, 12 μ L de mélange dNTP (2,5 mM), 1,5 μ L d'amorce L (10 μ M), 1,5 μ L d'amorce R (10 μ M), 0,38 μ L TaKaRa HS taq (5 U/ μ L). Un volume de 7,5 μ L d'ADN mix et 22,5 μ L de mélange de PCR a été utilisé.

Les conditions de thermocyclage étaient: 95 ° C pendant 2 minutes; boucle 1 pendant 8 cycles (94 ° C pendant 20 s, 73 ° C pendant 30 s, réduire la température de 1 ° C par cycle, passer à 72 ° C à 0,5 ° C/s, 72 ° C pendant 1 min) ; boucle 2 pendant 45 cycles (94 ° C pendant 20 s, 65 ° C pendant 30 s, rampe jusqu'à 72 ° C à 0,5 ° C/s, 72 ° C pendant 1 min) ; 72 ° C pendant 5 minutes; 99 ° C pendant 10 minutes; boucle 3 pendant 70 cycles (70 ° C pendant 20 s, réduire la température de 0,3 ° C par cycle); maintenir à 8 ° C.

2.5.2. TILLING à faible coût

Pour évaluer les performances de différentes combinaisons d'amorces, 5 μ L des produits de PCR ont été séparés sur une électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Dix microlitres des produits de PCR ont été utilisés pour le clivage enzymatique de mésappariements en utilisant du CJE (extrait de jus de céleri) brut contenant la nucléase CELI (nucléase extracellulaire purifiée à partir du céleri et coupe spécifiquement les mésappariements, les délétions et les boucles). Différentes concentrations enzymatiques ont été testées et les conditions suivantes de réaction de digestion ont été utilisées pour des dosages ultérieurs : 10 μ L de produit PCR, 14 μ L H₂O, 4 μ L de tampon (CJE) et 2 μ L de CJE nucléase ont été mélangés et incubés 15 min à 45 °C. Les digestions ont été arrêtées en refroidissant la réaction à 8 °C et en ajoutant 10 μ L d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) 0,25 M (pH = 8,0). Dix microlitres de la réaction finale ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% coloré au bromure d'éthidium.

2.6. Validation des séquences des résultats obtenus avec l'utilisation de TILLING à faible coût

Des réactions de séquençage de Sanger ont été menées pour évaluer les résultats obtenus dans les essais de clivage de mésappariements enzymatique. Une amplification et une vérification

du produit PCR ont été effectuées avant le séquençage pour assurer une production suffisante d'un seul amplicon.

Les réactions PCR ont ensuite été purifiées en utilisant l'une des deux méthodes suivantes : la méthode enzymatique (exonucléase I pour éliminer l'excédent d'amorce et de la phosphatase alcaline Shrimp pour éliminer les phosphates des dNTPs) ou la méthode du kit Qiagen (kit de purification PCR). Les échantillons ont ensuite été quantifiés par fluorimétrie (Qubit 2.0) et envoyés à un laboratoire de séquençage commercial (LGC Genomics2 : <https://shop.lgcgenomics.com/>) (Annexe 11).

3. RÉSULTATS

3.1. Développement de TILLING à faible coût pour la découverte de mutations chez le pois chiche

Une étape importante dans le développement de TILLING à faible coût est la production d'ADN génomique de haut poids moléculaire et de quantité suffisante pour les dosages prévus. Nous avons d'abord cherché à tester le poids moléculaire de l'ADN génomique produit en utilisant un protocole d'extraction à faible coût par rapport à un kit commercial Qiagen. L'analyse du gel d'agarose a montré que les deux méthodes produisent une seule bande de poids moléculaire élevé (Fig. 26. (A)). La concentration de l'ADN génomique a ensuite été estimée en utilisant l'analyse de gel d'agarose par comparaison avec des ADN standards (étalons) de concentration connue (Fig. 26. (B)). Nous concluons que les deux méthodes d'extraction produisent un ADN génomique de qualité et de quantité suffisante pour un TILLING.

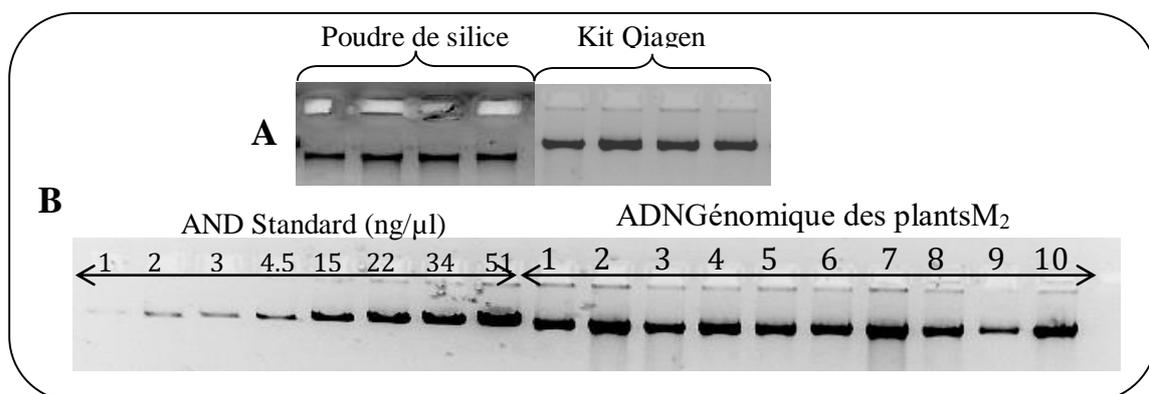


Fig. 26. (A) Comparaison qualitative de l'ADN génomique isolé en utilisant deux protocoles différents (protocole d'extraction d'ADN à faible coût avec de la poudre de silice et le protocole du kit commercial Qiagen) par électrophorèse sur gel d'agarose. (B) Vérification quantitative et qualitative de l'ADN obtenu à l'aide des ADN standards et de visualisation d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

3.2. Recherche dans la base de données de gènes candidats impliqués dans la résistance à l'antracnose, à la fusariose et à la floraison précoce chez le pois chiche

Des séquences de gènes candidats ont été obtenues à partir de la base de données NCBI. La conception des amorces a été réalisée en utilisant l'outil "CODDLE" pour choisir les régions de gènes optimales pour le TILLING. Cet outil intègre le logiciel Primer3 pour la conception d'amorces. Douze paires d'amorces ont été conçues (Tab. 13) pour les gènes cibles.

Tab. 13. Noms et séquences des amorces de pois chiche et les tailles du produit PCR.

Référence	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Taille du produit PCR (bp)
A1	ca_erlp_1F	TCAATTCAAGTCCTCGATCTGCATCC	1399
	ca_erlp_1R	GCACATTGCCGACTTTCAACATCGT	
A2	ca_erlp_2F	CGGTCCTTCCCCTCTTCCCTCTCT	1424
	ca_erlp_2R	GAGACTGCTGCAACGCTCGGTTCT	
A3	ca_erlp_3F	GGAGGGCCTAAGCTTCAACATGTGC	1385
	ca_erlp_3R	GGCCAGTTAGGGCCATTGAACTTCC	
A4	ca_erlp2_1F	ATGCTTTTTGGGGTTAGGTGGGTGT	1486
	ca_erlp2_1R	GGAACGGTGCTTCATAGCGGTTACCT	
A5	ca_erlp2_2F	CGGTCCTTCCCCTCTTCCCTCTCT	1446
	ca_erlp2_2R	CTGGCCATCATTGCGTTCTTCTGAG	
A6	ca_erlp2_3F	GGGTCCATTTTTCGAATCAGGTTGG	1453
	ca_erlp2_3R	AGCAGCTTCCCTCAACATGGAATGG	
A7	ca_efg_1F	GAGTATCCGCATCCACCAAGGCAAC	1306
	ca_efg_1R	TGTCGCTCCCAAGTCCTAACATCCTG	
A8	ca_efg2_2F	TGCACGATGACCCCTGGATGTATGGT	1177
	ca_efg2_2R	GGCGACTGATTGAAACACCAGGGACC	
A9	ca_must2_1F	GGAATCAATCCAACCCAAACCGAAA	1478
	ca_must2_1R	CGACTGCAGCATTGGTTTCTTCGAG	
A10	ca_must2_2F	TGCATCTATGATTCAGGCTGCATTTGA	1500
	ca_must2_2R	GTCCGGGAAGAACGAAACGCATGTA	
A11	ca_must2_3F	AAATGACGAGTTGCAGCGAGCAAGA	1482
	ca_must2_3R	GTGTTGCAGCAAGGTCTTCCACCAC	
A12	ca_must2_4F	GCTGCTCCTTCAAGAGGGTTTGTTC	1002
	ca_must2_4R	CTTGGGTTTGAGGGGGTGTGGAAT	

3.3. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Les paires d'amorces choisies ont été ensuite testées pour leur capacité de produire un produit d'amplification unique du poids moléculaire attendu. La vérification des douze paires d'amorces pour les régions géniques impliquées dans la résistance à l'antracnose, à la fusariose et à la floraison précoce chez le pois chiche, a été réalisée avec l'ADN obtenu à partir de mutants putatifs M₂ et du parent Ghab 4. Quatre concentrations différentes d'ADN génomique (0,1, 0,5, 1, 5 et 10 ng/μL) ont été évaluées. Après amplification, les réactions de PCR ont été visualisées sur le gel d'agarose à 1% (Fig. 27, Fig. 28). A partir de ces tests, 10 paires d'amorces ont été choisies pour des tests de TILLING (Tab. 14).

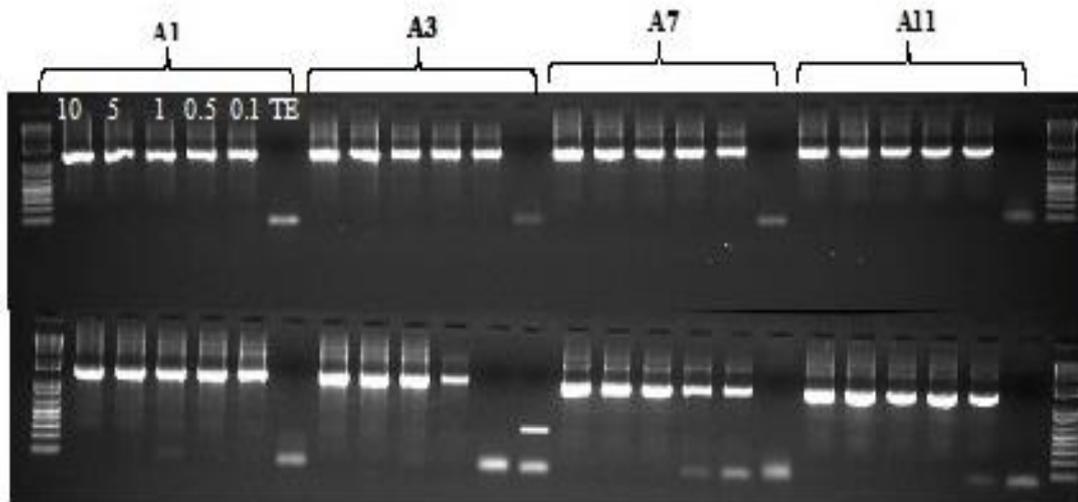


Fig.27. Évaluation en gel d'agarose du test PCR des amorces (4 amorces A1, A3, A7, A11) avec 5 concentrations différentes d'ADN génomique 10, 5, 1, 0,5, 0,1 ng/μL et le témoin TE, ADN du parent Ghab 4 (peigne 1), et l'ADN des plants M₂ (peigne 2).

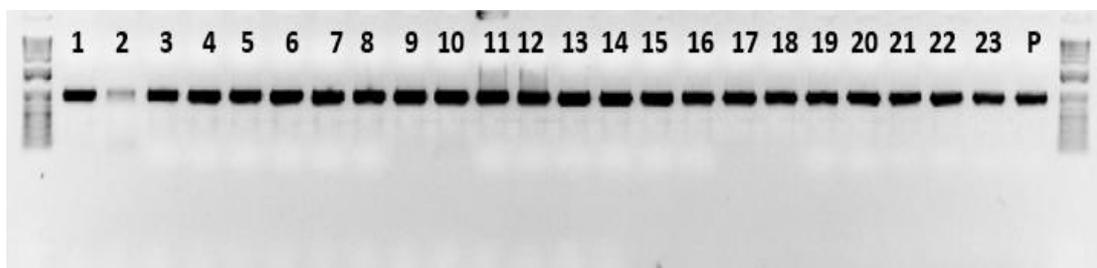


Fig. 28. Évaluation en gel d'agarose du test PCR de l'amorce A8 (*ca_efg2_2*) avec l'AND des plants M₂ (1 au 23) et du parent Ghab 4 (P).

Tab. 14. Résultat du criblage d'amorces avec l'ADN génomique de la variété Ghab 4 du pois chiche et de quelques échantillons M₂.

Référence	Nom d'amorce	Amplification
A1	ca_erp_1	+
A2	ca_erp_2	+
A3	ca_erp_3	+
A4	ca_erp2_1	-
A5	ca_erp2_2	+
A6	ca_erp2_3	-
A7	ca_efg_1	+
A8	ca_efg2_2	+
A9	ca_must2_1	+
A10	ca_must2_2	+
A11	ca_must2_3	+
A12	ca_must2_4	+

Les dosages de TILLING à faible coût utilisent un mélange d'enzymes brut qui reconnaît et coupe l'ADN hétéroduplex formé par dénaturation et hybridation de produits PCR de séquences différentes. En tant que tel, le test ne détectera pas les mutations homozygotes si le criblage de plants M₂ n'est pas associé à celui du témoin. De ce fait, une quantité égale d'ADN génomique parental (non muté) est mélangée avec chaque échantillon avant l'amplification par PCR. De cette façon, les mutations homozygotes et hétérozygotes peuvent être détectées. Les dosages de TILLING ont été réalisés avec les 10 amorces sélectionnées et les 81 M₂ ADN génomiques mélangés avec le type parental. Les produits de digestion enzymatique ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1,5%.

Aucune variation nucléotidique n'a été observée dans ces dosages (Fig. 29). Pour s'assurer que le manque de récupération des mutations n'était pas dû à l'échec du test, nous avons réalisé une expérience avec des mélanges du génotype Desi du Bangladesh et du parent Ghab 4, dans l'objectif de vérifier que des SNP naturels seraient présents. Cela sert de contrôle positif pour le test. En effet, cette expérience a montré un haut niveau de polymorphisme dans le mélange (Fig. 30). La variation des nucléotides observée a été validée par séquençage de Sanger. Nous concluons que le TILLING à faible coût convient au pois chiche et que le stock de semences utilisé pour la mutagenèse de Ghab 4 est hautement homozygote. Nous concluons également que la fréquence des petites mutations induites est probablement inférieure à une mutation par

million de paires de bases (13 599 unique pb criblés x 81 échantillons et 13 599 pb correspond à la taille totale des 10 amorces qui ont été amplifiées).

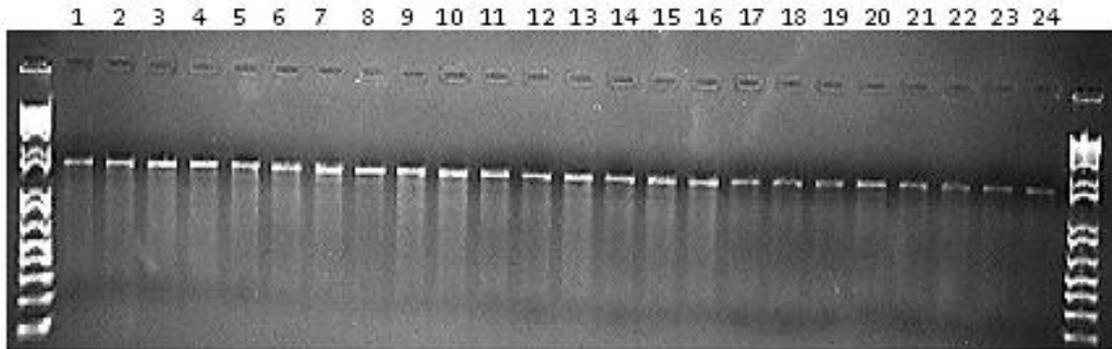


Fig. 29. Évaluation sur gel d'agarose de la digestion enzymatique en utilisant l'amorce A2 (ca_erlp_2) avec l'ADN des plants M_2 (de 1 à 24).

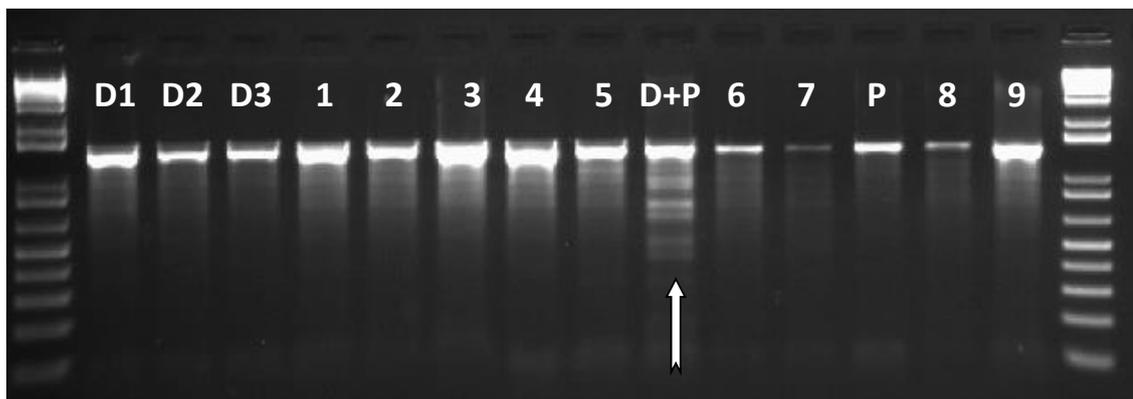


Fig. 30. Évaluation sur gel d'agarose de la digestion enzymatique en utilisant des amorces A3 (ca_erlp_3) avec un mélange d'ADN génomique, et d'ADN des échantillons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 des plants M_2 avec le parent Ghab 4, D1: génotype Desi n°1, D2: génotype Desi n° 2, D3: génotype Desi n°3, P: Ghab 4, D + P: trois génotypes Desi avec le parent Ghab 4.

4. DISCUSSION

Des tests de biologie moléculaire peuvent être incorporés dans des étapes distinctes du processus de sélection de mutation pour améliorer son efficacité (Jankowicz-Cieslak et Till, 2015). Le criblage de la génération M_2 est utilisé pour évaluer l'efficacité de l'induction de mutations et également comme outil de génétique inverse pour cibler les mutations dans des gènes spécifiques. Un test idéal serait capable de récupérer tous les types de variations induites, y compris les SNP (Polymorphisme mono-nucléotidique), les

petits et grands indels (insertions/délétions), la variation du nombre de copies et les réarrangements chromosomiques. Cela peut être accompli, mais il nécessite une combinaison de séquençage du génome entier en lecture courte et en lecture longue à une profondeur de couverture qui est le coût exagéré pour de nombreux laboratoires.

Une approche alternative consiste à utiliser des tests à faible coût qui permettent une évaluation rapide de la population mutante. La première étape de tout test moléculaire, utilisant l'ADN génomique, est l'extraction d'ADN de haute qualité. Nous montrons dans ce travail, qu'une extraction d'ADN génomique à faible coût et non toxique convient au pois chiche. Ceci est avantageux pour d'autres méthodes car le matériel végétal (les feuilles) est recueilli à température ambiante et séché en utilisant du gel de silice réutilisable. Ainsi, le coût et le danger de l'azote liquide et le besoin de congélateurs à -80 °C alimentés en continu sont évités. En outre, le dosage n'utilise pas de séparation de phase organique et ainsi les produits chimiques toxiques sont évités. Enfin, le coût du test peut être réduit de près de 10 fois par rapport à certains kits commerciaux, et l'ADN peut être produit pour moins de 20 cents US par échantillon (Huynh *et al.*, 2013).

En outre, nous montrons que la nucléase auto-extraite et l'électrophorèse sur gel d'agarose sont appropriées pour la découverte de la variation des nucléotides chez le pois chiche. Les polymorphismes nucléotidiques ont été facilement identifiés dans des mélanges de divers génotypes de pois chiche. Cela fournit un contrôle positif utile lors du criblage des mutations induites, car la fréquence des mutations induites devrait être faible et leur récupération sera rare. En effet, lors du criblage de 81 échantillons avec 10 paires d'amorces, nous n'avons trouvé aucune preuve de variation induite de petits nucléotides. Nous concluons que les graines utilisées pour la mutagenèse étaient hautement homogènes et homozygotes. Le matériel de départ pour la reproduction par mutation et la génétique inverse est idéalement isogénique. Ainsi, le test TILLING à faible coût que nous avons développé permet de contrôler efficacement le stock de semences utilisé pour la mutagenèse. Ce travail fournit également des informations importantes sur l'induction de mutations. Dans ce test, nous avons criblé environ un million de paires de bases, et nous estimons donc que la petite fréquence de mutation est inférieure à 1 pour 1 million de paires de bases.

Les données les plus importants sur la fréquence de mutation proviennent d'expériences de TILLING basées sur la mutagenèse chimique. Les mutagènes chimiques tels que l'EMS (éthylméthyl sulfonate) sont connus pour induire principalement des mutations ponctuelles. Nous nous attendons à ce que les mutations de SNP puissent s'accumuler à

des niveaux plus élevés que les autres types de mutation, car un pourcentage élevé de mutations de SNP n'aura aucun effet négatif sur la fonction du gène. Les densités de mutation rapportées chez les espèces diploïdes ont varié entre une mutation par 150 kb et plus de une mutation pour un million de paires de bases (Till *et al.*, 2018). Chez le pois chiche, la fréquence de mutation a été estimée par la plateforme TILLING à travers l'analyse de 768 descendances M₂ (obtenues avec 0.2% de mutagène EMS) en utilisant 20 cibles comprenant des séquences d'ADN génomique et d'ADNc (complémentaire). La fréquence des mutations déterminées était de 1 pour 165 kb. Cette fréquence est environ 1,6 fois plus élevée que dans *Arabidopsis* (Muehlbauer et Rajesh, 2008).

Le spectre des mutations induites par l'irradiation gamma est cependant plus diversifié. Les progrès récents dans le séquençage de nouvelles générations permettent une mesure plus complète des événements de mutations induits par les rayons gamma. Par exemple, les grands événements d'insertion et de délétion prédominent chez le maïs et le peuplier irradiés aux rayons gamma, tandis que l'irradiation des graines de riz entraîne une abondance de SNP et de petites variations d'indels (Yuan *et al.*, 2014 ; Henry *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2016). Le test TILLING à faible coût que nous décrivons présente un biais de détermination en ce sens que seules les mutations ponctuelles et les petites insertions et délétions (jusqu'à environ 50 nt) (Till, 2014) seront efficacement récupérées. En utilisant des tests similaires, Sato *et al.* (2006) ont estimé le taux de mutations induit par les rayons gamma chez le riz à une mutation par 6.190 kb. Alors que, selon Hwang *et al.* (2016), le nombre moyen de mutations par gène était de 1/492 kb chez des lignées M₂ irradiées de riz et le pourcentage de sites de mutation par séquence totale était de 0,67.

Il est probable que moins de mutations s'accumuleraient dans des combinaisons de génotypes et de dosages où prédomine l'induction de grands indels. Cela est dû aux gènes essentiels qui seraient rapidement éliminés menant à la létalité. Sur la base des données actuelles, cela rend l'évaluation des populations irradiées aux rayons gamma plus difficile par rapport aux populations chimiquement mutagénisées. Certaines combinaisons de dosage et de génotype peuvent produire une fréquence plus élevée ou plus faible de petites mutations. Dans ce contexte, notre densité observée inférieure à une petite mutation par million de paires de bases correspond aux observations pour les cultures irradiées aux rayons gamma. Il reste possible que notre population recèle des variations plus importantes qui ne peuvent être observées par le TILLING à faible coût. Une approche de séquençage du génome entier à faible couverture LCWGS (Low-Coverage Whole Genome

Sequencing) peut être appliquée pour découvrir et cataloguer une telle variation dans les plantes (Henry *et al.*, 2015 ; Datta *et al.*, 2018). Au fur et à mesure que les prix de séquençage baissent, cette approche devient réalisable pour plus de laboratoires. LCWGS, cependant, ne convient pas pour des appels SNP précis, et donc une approche de double criblage avec le TILLING à faible coût peut être envisagée pour caractériser les populations futures.

5. CONCLUSION

Les approches décrites dans ce chapitre fournissent des alternatives rapides et peu coûteuses pour la préparation des échantillons, pour l'extraction d'ADN génomique et pour la détection des mutations. Ainsi, ces protocoles peuvent fournir un ADN avec un poids moléculaire élevé et une quantité suffisante pour diverses applications moléculaires, telles que le TILLING et même pour les divers marqueurs moléculaires.

En effet, lors du criblage de 81 échantillons de la génération M₂ de pois chiche avec 10 paires d'amorces, nous n'avons trouvé aucune preuve de variation induite des petits nucléotides, ni polymorphisme naturel. Il a été conclu que le matériel végétal utilisé pour la mutagenèse était très homogène. Ainsi, aucune mutation n'a été découverte dans ce petit sous-ensemble de matériel de mutagenèse. Néanmoins, des mutants M₂ supplémentaires pourraient être analysés par cette technique.

Cette puissante technique de la génétique inverse ; TILLING, a introduit la possibilité de rechercher des mutations au niveau de l'ADN avant d'évaluer le phénotype. Nous avons démontré que la nucléase auto-extraite et l'électrophorèse sur gel d'agarose conviennent à la détection de la variation de nucléotides chez le pois chiche. Les polymorphismes nucléotidiques ont été facilement identifiés dans des mélanges de divers génotypes de pois chiche.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le pois chiche étant une espèce autogame, la variabilité génétique existante naturellement n'est pas suffisante pour obtenir l'amélioration souhaitée. Toutefois, cette espèce possède une base génétique étroite (Varshney *et al.*, 2010). Alternativement, l'induction de mutations artificielles avec l'application de mutagènes est un moyen très efficace pour élargir considérablement la variabilité génétique de cette espèce dans un court laps de temps. Néanmoins, les techniques moléculaires de génétique inverse ont permis de grandes avancées dans les études d'amélioration par mutation induite.

La présente étude visait l'induction de la variabilité génétique par radio-mutagenèse (rayons gamma) pour l'amélioration génétique de pois chiche. Pour cela, nous avons d'abord commencé par une évaluation de la radiosensibilité de deux cultivars de pois chiche de type Kabuli, GP10 et Ghab 4 aux différentes doses de rayons gamma (150, 200, 250, 300, 350 et 400 Grays) et en utilisant du cobalt 60, en vue d'estimer la DL_{50} et la RD_{50} chez ces deux cultivars.

Par la suite, et afin d'identifier les génotypes qui présentent une amélioration agronomique d'une part, et de déterminer les caractères agronomiques efficaces et distinctifs pour la continuité de la sélection au cours des générations suivantes d'autre part, nous avons évalué la variabilité génétique induite par les rayons gamma au sein de la génération M_2 . Enfin, dans la dernière partie de ce travail de recherche, nous avons évalué l'efficacité de l'utilisation de l'approche de la génétique inverse, le TILLING à faible coût pour découvrir des mutations dans la génération M_2 avec l'utilisation de gènes d'intérêt impliqués dans les principales maladies de pois chiche, *Aschochyta blight* (AB) et *Fusarium wilt* (FW), ainsi que les gènes impliqués dans la floraison précoce.

Ce travail nous a permis donc d'étudier la radiosensibilité (DL_{50}/RD_{50}) de deux cultivars de pois chiche de type kabuli GP10 et Ghab 4. D'une manière générale, cette étude a montré que ces deux cultivars sont sensibles aux traitements mutagènes appliqués. La majorité des caractères étudiés (exprimé en pourcentage du témoin) diminuent avec l'augmentation des doses. Cependant, une sensibilité différentielle entre GP10 et Ghab 4 a été constatée ; les doses n'ont pas affecté de la même façon les deux cultivars, l'effet du rayonnement gamma était plus important sur le cultivar Ghab 4. Les résultats relatifs à la détermination de la RD_{50} (exprimés en pourcentage du témoin) chez les deux cultivars de pois chiche, montrent des

valeurs comprises entre 210 et 314 Grays pour le cultivar GP10 et entre 255 et 325 Grays pour le cultivar Ghab 4. La dose 400 Grays est une dose létale pour les deux cultivars. De ce fait, la dose de traitement gamma recommandée pour une mutation induite efficace chez ces deux cultivars ne devrait pas dépasser la valeur 400 Grays.

L'induction de mutation par rayonnement gamma chez le pois chiche offre donc une source de variation génétique non négligeable. Ainsi, une population mutante de 4 050 plantes M₂ représentant 135 familles a été produite à partir du traitement des graines de pois chiche de la variété Ghab 4 avec une irradiation gamma de 280 Grays.

Nous pouvons conclure qu'une nouvelle variation a été induite chez le pois chiche par le traitement de l'irradiation des graines à travers des observations phénotypiques. L'évaluation de cette variabilité génétique induite au sein de la génération M₂ démontre une différence très significative entre les familles pour tous les caractères agronomiques étudiés. Le maximum de variabilité a été observé pour les composantes du rendement, nombre de gousses par plant, nombre de graines par plant et rendement en grains, pour lesquelles le coefficient de variation était très élevé. Cette variation était non seulement génétique mais aussi influencée par l'environnement. Les estimations les plus élevées des paramètres génétiques (coefficient de variation génotypique et phénotypique, l'héritabilité au sens large et le gain génétique) ont été enregistrées pour le nombre de graines par plant et le rendement en grains.

Il est important de déterminer les meilleurs caractères pour une sélection efficace. Le rendement en grains était hautement significatif et positivement corrélé avec le nombre de gousses et de graines par plant. L'analyse en "Path" a prouvé que le nombre total de graines par plant avait un effet direct positif le plus élevé, suivi par le poids de cent graines. Ainsi, cette étude suggère que pour améliorer le rendement en grains, la sélection du nombre de gousses par plant et du nombre de graines par plant donnerait des résultats positifs.

Le test de comparaison multiple Dunnett a révélé une supériorité de trente-sept familles par rapport au témoin, pour cinq caractères agronomiques. Par ailleurs, l'analyse de groupement hiérarchique basée sur dix caractères quantitatifs, confirme un haut niveau de diversité phénotypique entre les 135 familles. Le dépistage phénotypique de cette population de mutants a permis d'identifier neuf génotypes performants par rapport au témoin pour les caractères suivants : la hauteur de la première gousse, le nombre de jours à la floraison, le nombre total des gousses et des graines par plant, et le rendement en grains par plant. Le port de ces génotypes varie entre érigé, semi-érigé et semi-étalé.

Les expériences menées pour l'évaluation moléculaire de la population M₂ par l'utilisation du TILLING à faible coût ont montré que le stock de semences utilisé pour la mutagenèse est homogène et que les petites mutations ne prédominent pas au dosage utilisé. À travers ces expériences, nous avons montré également qu'une extraction d'ADN génomique peu coûteuse et non toxique convient au pois chiche. Nous avons démontré aussi que la nucléase auto-extraite et l'électrophorèse sur gel d'agarose conviennent à la détection de la variation de nucléotides chez le pois chiche. De ce fait, nous avons adapté ces techniques de découverte de mutation à faible coût pour le pois chiche et nous avons aussi montré qu'elles conviennent à la récupération de petites variations de nucléotides. Ces techniques ne sont pas utilisées uniquement pour la détection de mutations induites, mais elles peuvent aussi être utilisées pour l'étude du polymorphisme naturel (EcoTILLING).

Des ADN de plusieurs centaines de plants M₂ des différentes familles ont été extraits en vue de poursuivre dans des recherches ultérieures le screening moléculaire avec l'utilisation du TILLING à faible coût.

Les mutants putatifs identifiés dans la génération M₂ peuvent être évalués dans les générations futures pour la stabilité des caractères et, après des essais sur plusieurs sites, ils peuvent être sélectionnés en tant que nouvelles variétés fixées. Par ailleurs, ce matériel végétal peut être introduit dans des programmes d'amélioration par le biais des croisements.

Toutefois, cette variabilité génétique induite peut être efficacement exploitée non seulement pour l'amélioration du pois chiche en termes de rendement, mais aussi en vue de la sélection de mutants de pois chiche résistants aux contraintes abiotiques et biotiques (déficit hydrique et maladies). Dans cette optique, un travail est en cours portant sur l'évaluation des génotypes performants M₃ de pois chiche pour leur efficacité d'utilisation de l'eau et de l'azote avec l'utilisation de l'azote isotopique ¹⁵N.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aastveit K., Gaul, H. (1967). Variation and selection of micro mutants. *Rad Bot.* 1: 353-361.
2. Acquaah, G. (2012). Principles of plant genetics and breeding, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford. John Wiley & Sons, Ltd. Ed. 739p.
3. Adhikari, G., and Pandey, M. P. (1982). Genetic variability in some quantitative characters and scope for improvement in chickpea. *International Chickpea Newsletter.* 7, 4-5.
4. Agriculture and Agri-Food Canada. (2006). Canada: pulse and special crops outlook. *Bi-weekly Bulletin* (April 28), 1–2.
5. Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M. and Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation derived varieties. *Euphytica.* 135, 187-204.
6. Ahmad, S. and Godward, M.B.E. (1993). Gamma radiation induced mutations in *Cicer arietinum* L. *Acta Botanica Indica* 21:1-8.
7. Ali Ghanim, A.M. and Forster, B. P. (2014). Techniques for acceleration of mutation breeding in crop plants. *Mutagenesis and High-throughput Screening CORNET Projects Lehr- Conference of the Association of Plant Breeders and Seed Merchants in Austria*, p7. ISBN: 978-3-902849-00-7.
8. Annicchiarico, P. (2002). ‘Genotype × environment interaction. Challenges and opportunities for plant breeding and cultivar recommendations’. Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO, Rome, Italy- Plant Production and Protection Paper No. 174.
9. Anthelme, B., Ben Ali, S., Iordache, C., (1978). Contribution à l’étude de la valeur nutritive des variétés de légumes secs cultivés en Algérie. Vol VIII - n°1. Extrait de : *Annales de l’INA*, 63-74.
10. Arora, P. P. (1991). Genetic variability and its relevance in chickpea. *International Chickpea Newsletter.* 25, 9-10.
11. Arshad, M., Bakhsh, A., and Ghafoor, A. (2004). Path coefficient analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under rainfed conditions. *Pak. J. Bot.* 36(1), 75-81.
12. Assefa, K., Ketema, S., Tefera, H., *et al.* (1999). Diversity among germplasm lines of the Ethiopian cereal tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter], *Euphytica.* vol. 106. N°. 1, 87–97.

13. Baize, D., (1988). Guide des analyses courantes en pédologie. Ed. INRA, Paris., 171 P.
14. Bamouh, A., Noufiri, H., Zeggaf, T. et Moutawakil, H. (2002). Développement et application d'un modèle de simulation du bilan hydrique (AGROSIM) à la prévision des rendements de la fève et du pois chiche en zone semi-aride marocaine. Proceedings de la Conférence Internationale ; Politiques d'irrigation : Considérations micro et macroéconomiques. Agadir, Maroc: 638-665.
15. Bara, B. M., Chaurasia, A.K. and Verma, P. (2017). Gamma rays effect on frequency and spectrum of chlorophyll mutation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry; 6(3): 590-591.
16. Barshile, J. D. and Apparao, Q. B. J. (2009). Genetic Improvement of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Using Induced Mutations. Y, Shu (ed.). Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 91-94.
17. Barshile, J. D., Auti, S. G. and Apparao, B. J. (2009). Genetic enhancement of chickpea through induced mutagenesis. J. Food Legumes 22(1), 26-29.
18. Bhogal, N.S., Chauhan, J.S., Singh, M., Singh, K.H., Meena, M.L., Meena, D.R. (2013) Genetic variability for micro and macronutrients in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) under two environments. Indian J Genet 73(2): 177–181
19. Bolbhat Sadashiv, N., Bhoge Vikram, D. and Dhupal Kondiram, N. (2012). Induced mutations in Horsegram (*Macrotyloma Uniflorum* (Lam.) Verdc): Chlorophyll mutations, mutagenic efficiency and effectiveness. Int. J. Life Sci. and Pharma Res., 2(4): 159- 168.
20. Bouharmont, J. (1995). Création variétale et amélioration des plantes. In Agronomie modern- Bases physiologiques et agronomiques de la production végétales. Ed. Hatier, pp.313-337.
21. Bovina, R., Talamè, V., Salvi, S., Sanguineti, M-C. and Tuberosa, R. (2012). Discovery of Chemically Induced Mutations by TILLING In: Shu, Q.Y., Forster, B.P. and Nakagawa, H., Eds., Plant Mutation Breeding and Biotechnology, Joint FAO/IAEA Division of nuclear Techniques in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency, Vienna, C21,257-268. <http://dx.doi.org/10.1079/9781780640853.0169>.
22. Brahmi, I., Mabrouk, Y., Charaabi, K., Delavault, P., Simier, P. and Belhadj, O. (2014). Induced mutagenesis through gamma radiation in chickpea (*Cicer arietinum* L.):

- developmental changes and improved resistance to the parasitic weed *Orobanche foetida* Poir. International Journal of Advanced Research, Volume 2, Issue 11: 670-684.
23. Canci, H., Cagirgan, M.I. and Toker, C. (2004). Genotypic Variations for Root and Shoot Growth at Seedling Stage in Chickpea Mutants. International Chickpea and Pigeonpea Newsletter. ICRISAT, ICPN, 11: 11-13.
24. Chaturvedi, S.K., Singh, N.P., Mishra, N., Gaur, P.M. and Varshney, R.K. (2016). Tailoring Chickpea Varieties for Amenability to Machine Harvesting. Presented at Joint Pan-African Grain Legume and World Cowpea Conference. Livingstone, Zambia. 28 February to 4 March 2016.
25. Ciftci, V., Togay, N., Togay, Y. and Dogan, Y. (2004). Determining relationships among yield and some yield components using path coefficient analysis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Asian Journal of Plant Sciences. 3(5), 632-635.
26. Colbert, T., Till, B.J., Tompa, R. *et al.* (2001). Highthroughput screening for induced point mutations. Plant Physiol. 126: 480-484.
27. Coles, S., Maxted, N. and van der Maesen, L.J.G. (1998). Identification aids for *Cicer* (Leguminosae, *Cicereae*) taxa. Edinburgh Journal of Botany. 55, 243–265.
28. Comai, L., Young, K. Till, B. J., Reynolds, S.H., Greene, E. A., Codomo, C. A., Enns, L. C., Johnson, J. E., Burtner, C., Odden, A. R. *et al.* (2004). Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. Plant J. 37:778-786.
29. Conrad, L.J., Kikuchi, K., Brutnell, T.P. (2008). Transposon tagging in cereal crops. In: The handbook of plant functional genomics. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 267–290.
30. Cubero, J.I. (1987). Morphology of chickpea. In The chickpea (Saxena. M.C. and Singh. K.B. eds.). Wallingford. Oxon. UK: CAB International, 35- 66.
31. Datta, S., Jankowicz-Cieslak, J., Nielen, S., Ingelbrecht, I., and Till, B.J. (2018). Induction and recovery of copy number variation in banana through gamma irradiation and low coverage whole genome sequencing. Plant Biotechnol. J.pp. 1-10.
32. Degefa, I., Petros, Y., and Andargie, M. (2014). Genetic variability, heritability and genetic advance in Mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) accessions. Plant Science Today. 1(2), 94-98.

33. Demarly, Y. (1977). Génétique et amélioration des plantes. Ed. Masson, Paris, 287p.
34. Deshayes, A. et Cornu, A. (1980). La mutagenèse expérimentale chez les végétaux supérieurs : Devenir de la cellule mutée et nature des événements génétique induits. In La multiplication végétative de plantes supérieures. Ed. BORDAS, Paris, pp. 233-258.
35. Dhamayanthi, K. P. M., and Reddy, V. R. K. (2000). Cytogenetic effects of gamma rays and ethylmethane sulphonate in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Cytologia* 65, 129-133.
36. Dixet, P. and Dubey, D.K. (1984). Path analysis in lentil (*Lens culinaris* Med.). *Lens Newsletter*, 11: 15-17.
37. DSASI, (2013-2017). Statistiques agricoles "Serie B". Direction des statistiques agricoles et systèmes d'information (DSASI). Sous-direction des statistiques. Ministère de l'agriculture, du Developent rural et de la Pêche.
38. Du, Y., Li, W., Yu, L., Chen, G., Liu, Q., Luo, S., Shu, Q., Zhou, L. (2014). Mutagenic effects of carbon-ion irradiation on dry *Arabidopsis thaliana* seeds. *Mutation research* 759:28-36. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.07.018
39. Ellyfa, K., Ahmed, O.H., Shaharudin, S. and Abdul Rahman, D. (2007). Gamma Radiosensitivity Study on Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*). *International Journal of Agricultural Research*, 2: 844-848.
40. Fabre, C. (2008). Pois chiche. Fiche Technique, Chambre d'Agriculture de l'Hérault .7p.
41. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2010). *Agricultural production year book/* or <http://faostat.fao.org>
42. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2015). *Agricultural production year book/* or <http://faostat.fao.org>
43. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2016). *Agricultural production year book/* or <http://faostat.fao.org>
44. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2017). *Agricultural production year book/* or <http://faostat.fao.org>
45. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2018). *Agricultural production year book/* or <http://faostat.fao.org>

46. FAO/IAEA. (2018). Manual on Mutation Breeding - Third edition. Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P. and Jankuloski, L. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 301 pp.
47. Fiorani, F., Schurr, U. (2013). Future scenarios for plant phenotyping. *Annu Rev. Plant Biol* 64:267–291.
48. Forster, B.P., Shu, Q.Y. (2011). Plant mutagenesis in crop Improvement: basic terms and application. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (eds) *Plant mutation breeding and biotechnology*. Guttenberg Press, Malta, pp. 9–20.
49. Fossati, A. (1972). Mutagenèse et amélioration du blé tendre. *Rev. Suisse agro.* vol 4, n°5, pp, 168-172.
50. Gady, A., Hermans, F., Van de Wal, M., van Loo, E.N., Visser, R., Bachem, C. (2009). Implementation of two high throughput techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods* 5:13.
51. Gaul, H. (1964). Mutations in plant breeding. *Radiation Botany* 4: 155–232.
52. Gaul, H. (1970). Mutagen effects observed in first generation. In: *Manual on Mutation Breeding*, Technical Report Series No. 119, 85-98. FAO/IAEA. Vienna.
53. Gaur, P. M., Thudi M., Samineni, S., Varshney, R. K. (2014). Advances in Chickpea Genomics. *Legumes in the Omic Era*. Editors: Gupta. Sanjeev. Nadarajan. Nagasamy. Gupta. DebjyotiSen (Eds.), 73-94.
54. Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Knights, E.J., Warkentin, T.O., Acikgoz. N., Yadav, S.S., Kumar, J. (2007). Breeding Achievements. In *Chickpea Breeding and Management*. adav. S.S., Redden. B., Chen. W., Sharma. B., Eds. CABI: Wallingford. UK, 391-416.
55. Gaur, P.M.; Gowda, C.L.L.; Knights, E.J.; Warkentin, T.O.; Acikgoz, N.; Yadav, S.S.; Kumar, J. (2007). Breeding Achievements. In *Chickpea Breeding and Management*; adav, S.S., Redden, B., Chen, W., Sharma, B., Eds.; CABI: Wallingford, UK; pp. 391–416.
56. Gauthier, J. (1991). *Notion d'agriculture*. Ed. Gauthier, Paris, 272p.
57. Geneves, L., (1988). *Aide-mémoire de biologie moléculaire*. Dunod Université, Paris, 135p.

58. Girija, M., and Dhanavel, D. (2009). Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, ethylmethane sulphonate and their combined treatments in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Global J. Mol. Sci.* 4(2), 68-75.
59. Guerin De Montgareuil, P., (1984). *Radioagronomie in Echos*. Groupe CEA, France, p.p. 56-57.
60. Gulfishan, M., Bhat, T. A., and Oves, M. (2015). *Mutants as a Genetic Resource for Future Crop Improvement*. Springer International Publishing Switzerland 201. J.M. Al-Khayri et al. (eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. (4) pp: 95-112.
61. Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Reed, G.H., Pryor, R.J., Chen, J., Wittwer, C.T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 49:396–406.
62. Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Reed, G.H., Pryor, R.J., Chen, J., Wittwer, C.T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 49:396–406
63. Gupta, P., Reddaiah, B., Salava, H., Upadhyaya, P., Tyagi, K., Sarma, S., Datta, S., Malhotra, B., Thomas, S., Sunkum, A., Devulapalli, S., Till, B.J., Sreelakshmi, Y. & Sharma, R. (2017). Next-generation sequencing (NGS)-based identification of induced mutations in a doubly mutagenized tomato (*Solanum lycopersicum*) population. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 92(3): 495–508. <https://doi.org/10.1111/tpj.13654>
64. Gustafsson, A., (1940). A mutation system of chlorophyll apparatus. *Lund. Univ. Arsskr. N.F. Avd.*, 36: 1–40.
65. Hamadache, A. (2014). *Grandes cultures, principaux itinéraires techniques des principales espèces de grandes cultures pluviales cultivées en Algérie et en Afrique du nord (agriculture conventionnelle), tome 2 : légumineuses alimentaires (Pois chiche- Fève- Lentille)*. 188p.
66. Hameed, A., Shah, T.M., Atta, B.M. (2008). Gamma irradiation effects on seed germination and growth, protein content, peroxidase and protease activity, lipid peroxidation in desi and kabuli chickpea, *Pakistan Journal of Botany*, 40 (3), 1033-1041.

67. Haq, M. A. (2009). Development of Mutant Varieties of Crop Plants at NIAB and the Impact on Agricultural Production in Pakistan. Q.Y. Shu (ed.) Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp.61-64.
68. Haq, M.A, Singh, K.B., Abidin, Z. and Ahmad. (1992). Mutation studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). I. Mutagen sensitivity. Pak. J. M.S. Agric. Sci., 29(4): 429-438.
69. Haq, M.A. (1990). Genetic and physiologic studies on induced mutants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Ph.D. Thesis, University of Punjab Lahore, Pakistan. 196p.
70. Haq, M.A., Sadiq, M. and Hassan, M. (1986). Improvement of chickpea through induced mutants. Proc. FAO/IAEA Workshop on improvement of grain legumes production by using induced mutations, Pullman, Washington. (USA). pp. 1-5.
71. Haq, M.A., Singh, K.B., Abidin, Z. and Ahmad, M.S. (1994). Mutations studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.) III. Selection of mutants in M2 generation. Pak. J. Agr. Sci. 31(1), 13-22.
72. Hardwick, R.C. and Andrews, D.J. (1980). Genetics and environmental variation in crop yield of estimating the interdependence of components of yield. – Euphytica, 20: 177-188.
73. Hassan, M., Atta, B.M., Shah, T.M., Haq, M.A., Syed. H. and Alam, S.S. (2005). Correlation and path coefficient studies in induced mutants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pak. J. Bot. 37(2), 293-298.
74. Helbaek, H. (1970). The plant husbandry at Hacilar. In: Mellaart, J. (ed.) Excavation at Hacilar. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, pp. 189–244.
75. Hemavathy, A. T., and Ravindran, G. R., (2005). Mutagenic effects of gamma rays on frequency and spectrum of chlorophyll mutations in urdbean (*Vigna mungo* (L.) Hepper). Madras Agric. J. 92(4-6), 325-327.
76. Henry, I.M., Zinkgraf, M.S., Groover, A.T., and Comai, L. (2015). A System for Dosage-Based Functional Genomics in Poplar. The Plant Cell Online tpc.15.00349. 27(9): 2370–2383.
77. Herve Y., (1976). Introduction à l'amélioration des plantes. Ed. E.N.S.A., Renne, 67P.

78. Hestekin, C.N., Barron, A.E. (2006). The potential of electrophoretic mobility shift assays for clinical mutation detection. *Electrophoresis* 19:3805–3815.
79. Hirochika, H. (2001). Contribution of the Tos17 retro transposon to rice functional genomics. *Curr Opin Plant Biol* 4(2):118–122.
80. Hofinger, B.J., Huynh, O.A., Jankowicz-Cieslak, J., and Till, B.J. (2017). A Protocol for Benchtop Extraction of Single-Strand-Specific Nucleases for Mutation Discovery. In *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*, (Springer, Cham), pp. 241–251.
81. Hunter, C.T., Suzuki, M., Saunders, J., Wu, S., Tasi, A., McCarty, D.R., Koch, K.E. (2014). Phenotype to genotype using forward-genetic Mu-seq for identification and functional classification of maize mutants. *Front Plant Sci* 4:545.
82. Huynh, O.A., Hofinger, B.J., Beshir, M.M., Jankowicz-Cieslak, J., Guo, H., Forster, B.P., Till, B.J. (2013). Do-it-yourself molecular biology for plant breeding: low-cost tools for developing countries. *Plant Genetics and Breeding Technologies; Plant Diseases and Resistance Mechanisms: Proceedings*, February 18-20, Vienna, Austria. Medimond - Monduzzi Editore international Proceedings Division, Pianoro, Italy, pp. 33-36.
83. Huynh, O.A., Jankowicz-Cieslak, J., Saraye, B., Hofinger, B., and Till, B.J. (2017). Low-Cost Methods for DNA Extraction and Quantification. In *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*, J. Jankowicz-Cieslak, T.H. Tai, J. Kumlehn, and B.J. Till, eds. (Springer International Publishing), pp. 227–239.
84. Hwang, J. E., Jang, D.S., Lee, K. J., Ahn, J. W., Kim, S. H., Kang, S.Y., Kim, D. S. and Kim, J.B. (2016). Identification of gamma ray irradiation-induced mutations in membrane transport genes in a rice population by TILLING. *Genes Genet. Syst.* 91, 245–256.
85. ICRISAT. (1993). Descriptors for Chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy; International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India and International Center for Agriculture Research in the Dry Areas.
86. ICRISAT. (2006). International Chickpea and Pigeonpea Newsletter No. 13. Documentation. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 47p.
87. Ingelbrecht, I., Jankowicz-Cieslak, J., Mukhtar Ali Ghanim, A., Anwar Y., Forster, B.P., and Till, B.J. (2018). DNA Marker And Genotyping Applications For Mutation Breeding.

- Specific Techniques For Increasing Efficiency Of Mutation Breeding. FAO/IAEA Manual on Mutation Breeding - Third edition. Spencer-Lopes, M.M., Forster, B.P. and Jankuloski, L. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. Ch 8. pp. 249-266.
- 88.** Islam, M.M., Ismail, M.R., Ashrafuzzaman, M., Shamsuzzaman, K.M. and Islam, M.M. (2008). Evaluation of chickpea lines/mutants for growth and yield attributes. *Int. J. Agri. Biol.* 10, 493–498.
- 89.** ITGC. (2011). La lentille et le pois chiche pour une conduite mécanisée. EL Harrach, Alger 27p.
- 90.** ITGC. (2018). Programme des activités d'obtention de matériel végétal de base des grandes cultures. Campagne agricole 2017/2018. Département d'obtention de matériel végétal de base. Institut Technique des Grandes Cultures. Ministère de l'Agriculture, du Développement rural et de la Pêche. 30 p.
- 91.** Jain, H.K., Kharkwal, M.C. (2004). *Plant breeding: Mendelian to molecular approaches.* Springer, Dordrecht.
- 92.** Jain, S. M., and Maluszynski, M. (2004). Induced mutations and biotechnology on improving crops. In: A. Mujib, M. Cho, S. Predieri, and S. Banerjee (Eds.): *In vitro applications in crop improvement: Recent Progress Science Publishers.* IBH, Oxford. India, pp. 169-202.
- 93.** Jakowitsch, J., Mette, M.F., van der Winden, J. *et al.* (1999). Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci* 96(23):13241–13246
- 94.** Jankowicz-Cieslak, J. and Till, B.J. (2017). Chemical mutagenesis and chimera dissolution in vegetatively propagated banana. In *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding.* International Atomic Energy Agency. J. Jankowicz-Cieslak et al. (eds.). pp. 39-54. DOI 10.1007/978-3-319-45021-6_3
- 95.** Jankowicz-Cieslak, J., Huynh, O.A., Bado, S., Matijevic, M., Till, B.J. (2011). Reverse genetics by TILLING expands through the plant kingdom. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23(4): 290–300.
- 96.** Jankowicz-Cieslak, J., and Till, B.J. (2015). Forward and Reverse Genetics in Crop Breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and*

- Molecular Tools, Al-Khayri J. M, Jain S. M, and Johnson D. V, eds. (Springer International Publishing), pp. 215–240.
- 97.** Jankowicz-Cieslak, J., Mba, C., and Till, B. J. (2017). Mutagenesis for crop breeding and functional genomics. In: Biotechnologies for Plant Mutation Breeding (Jankowicz - Cieslak J., Tai T., Kumlehn J., Till B, eds), pp 3 -18, Cham: Springer.
- 98.** Jankowicz-Cieslak, J., Till, B. J. (2016). Forward and Reverse Genetics in Crop Breeding. Chapter 8 in: Advances in Plant Breeding Strategies Volume In: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools. J.M. Al-Khayri et al. (eds.), Springer, pp. 215-240.
- 99.** John, S. A. (1999). Mutation frequency and chlorophyll mutations in parents and hybrids of cowpea following gamma irradiation. *Indian J. Genet.* 59(3), 357-361.
- 100.** Johnson, H.W., Robinson, H.F., and Comstock, R. E. (1955). Estimation of genetic and environmental variability in soybeans. *Agronomy Journal.* vol. 47, 314-318.
- 101.** Kantar, F., Hafeez, F.Y., Shivakumar, B.G., Sundaram, S.P. Tejera, N.A., Aslam, A., Bano A. and Raja, P. (2007). Chickpea: Rhizobium Management and Nitrogen Fixation. In: Chickpea Breeding and Management. S.S. Yadav, R.J. Redden, W. Chen, B.Sharma (Eds). CABI. pp. 179-192.
- 102.** Karthika, R., and Subbalakshmi, B. (2006). Effect of gamma rays and EMS on two varieties of soybean. *Asian J. Plant Sci.* 5(4), 721-724.
- 103.** Kashid, N. G. and More, S. B. (2015). “Genetic variability induced by ethyl methane Sulphonate and sodium Azide in chlorophyll mutation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *International Journal of Current Research*, 7, (10), 21101-21104.
- 104.** Kaul, M.L.H., Garg, R. (1979). Population performance and genetic parameters of some promising pealines. *Pisum Newsl.* 11:15–16.
- 105.** Kazan, K. and Muehlbauer, F.J. (1991). Allozyme variation and phylogeny in annual species of *Cicer* (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution.* 175, 11–21.
- 106.** Khan M. R., Qureshi A. S., Hussain S. A. and Ibrahim M. (2005). Genetic variability induced by gamma irradiation and its modulation with gibberellic acid in M₂ generation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pak. J. Bot.*, 37(2): 285-292.
- 107.** Khan, I.A., Bashir, M., and Malik, B.A. (1989). Character association and their implication in chickpea breeding. *Pak. J. Agri. Sci.* 26(2): 214-220.

108. Khan, M., Qureshi A. S., Hussain, S. A., and Ibrahim, M., (2005). Genetic variability induced by gamma irradiation and its modulation with gibberellic acid in M₂ generation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pak. J. Bot. 37(2), 285-292.
109. Khan, M.R., and Qureshi, A.S. (2001). Path coefficient and correlation analysis studies on the variation induced by gamma irradiation in M₁ generation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Online J. Biol. Sci. 1(3), 108-110.
110. Khan, M.R., Shakoor, A. (1977). Grain legumes in Pakistan. In: Induced Mutations for the Improvement of Grain Legumes in South East Asia (1975), IAEA-203, International Atomic Energy Agency, Vienna. pp 21-28.
111. Khan, S., Wani. M.R., Bha.t M.D., Parveen, K. (2005). Induced chlorophyll mutations in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int J Agric Biol 7(5):764–767.
112. Kharkwal M.C. (1999). Induced mutations in chickpea (*Cicer arietinum* L.). III. Frequency and spectrum of viable mutations. Indian Journal of Genetics 59: 451-464.
113. Kharkwal, M.C. (1979). Mutation breeding in chickpea in India. In: Symposium on the role of induced mutations in plant breeding. Osmania University, Hyderabad, pp 177–183.
114. Kharkwal, M.C. (1983). Promising performance of chickpea mutants, Mutat. Breed. Newsl. No. 22 2. New selection technique for micromutations. Abstract of the XV International Congress of Genetics, New Delhi, India, p 298.
115. Kharkwal, M.C. (1998). Induced mutations in chickpea (*Cicer arietinum* L.). II. Frequency and spectrum of chlorophyll mutations. Indian J. Genet. 58(4), 465-474.
116. Kharkwal, M.C. (2011). Brief History of Plant Mutagenesis. In Plant Mutation Breeding and Biotechnology. Edited by Q.Y. Shu, B.P.Forster, H.Nakagawa Plant Breeding and Genetics Section. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. C02:21-30.
117. Kharkwal, M.C., Jain, H.K. and Sharma, B. (1988). Induced mutations for improvement of chickpea, lentil, pea and cowpea. In Improvement of Grain Legume Production Using Induced Mutations. IAEA, VIENNA, STI/PUB/766 ISBN 92-0-111188-6. pp: 89-109.
118. Kharkwal, M.C., Shu, Q.Y. (2009). The role of induced mutations in World Food Security. Induced plant mutations in the genomics era. Q.Y. Shu (ed.) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. pp. 33-38.

119. Kodym, A. Afza, Forstera, R.B.P. Ukai, Nakagawa, Y.H. and Mba, C. (2012). Methodology for Physical and Chemical Mutagenic Treatments. In Plant Mutation Breeding and Biotechnology. Edited by Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa Plant Breeding and Genetics Section. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. C14:169-180.
120. Kodym, A., and R. Afza, (2003). Physical and chemical mutagenesis. Meth. Mol. Biol. 236, 189-203.
121. Kozgar, I. (2012). Studies on the induction of mutation for quantitative traits in chickpea (*Cicer arietinum L.*) Thesis PhD in botany. Aligarh Muslim University- India. 111p.
122. Kozgar, I., (2014). Mutation Breeding in Chickpea: Perspectives and Prospects for Food Security. Ed: Katarzyna Michalczyk, 148 p.
123. Kumar, G. and Singh, V. (2003). Comparative analysis of meiotic abnormalities induced by gamma rays and EMS in barley. J. Indian Bot. Soc. 82, 19-22.
124. Kumar, J. and Abbo, S. (2001). Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. Advanced Agronomy. 72.107–138.
125. Kupicha, F.K. (1977). The delimitation of the tribe Viciae and the relationships of *Cicer L.* Botanical Journal of the Linnean Society. 74:131-162.
126. Kurowska, M., Daszkowska-Golec, A., Gruszka, D., Marzec, M., Szurman, M., Szarejko, I., Maluszynski, M. (2011). TILLING - a shortcut in functional genomics. J Appl Genet 52(4), 371–390. LGC genomics: <https://shop.lgcgenomics.com/>
127. Labdi M., (1990). Contribution à l'étude de la variabilité d'isolats d'*Ascochyta rabiei*, agent de l'antracnose du pois chiche en Algérie. Thèse de DAA, INRA, CRA, Versailles, 36p.
128. Ladizinsky, G. and Adler, A. (1976). The origin of chickpea *Cicer arietinum L.* Euphytica 25:211–217.
129. Lafon, J.P., Tharoud-Prayer, C., Levy, G. (1987). Biologie des plantes cultivées. Physiologie du développement génétique et amélioration. Ed. A.A.P.E.P.S, Paris, 172p.
130. Lal, G. M., Toms, B. and Lal, S. S. (2009). Mutagenic sensitivity in early generation in black gram. Asian J. Agric. Sci. 1(1), 9-11.

- 131.**Lamprecht, H. (1960). Über Blattfarben von Phanerogamen. Klassifikation, Terminologie und Gensymbole von chlorophyll und anderen Farbmутanten. *Agri. Hort. Gen.*, 18: 135-168.
- 132.**Laskar R. A., Khan, S., Khursheed, S. Raina, A. and Amin, R. (2015). Quantitative Analysis of Induced Phenotypic Diversity in Chickpea Using Physical and Chemical Mutagenesis. *Journal of Agronomy* 14 (3): 102-111.
- 133.**Laumont, P., et Chevassus, A., (1956). Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. Institut Agricole d'Algérie. Maison-carrée, Alger; 24 p.
- 134.**Leterme, P. (2002). Recommendations by health organizations for pulse consumption. *British Journal of Nutrition* 88, S239–S242.
- 135.**Li, S., Zheng, Y., Cui, H., Fu, H., Shu, Q., and Huang, J. (2016). Frequency and type of inheritable mutations induced by γ rays in rice as revealed by whole genome sequencing. *J Zhejiang Univ Sci B* 17, 905–915.
- 136.**Lin, C.Y., Pevzner, I. and Friars, G.W. (1979). Experimental investigation of errors of heritability estimates in index selection. *Can. J. Genet. Cytol.* 21, 303-308.
- 137.**Lundqvist, U., Franckowiak, J.D. and Forster, B.P. (2012). Mutation Categories. In *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Edited by Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa Plant Breeding and Genetics Section. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. C04:47-56.
- 138.**Luz, V. K. da., Silveira, S. F. da S., Fonseca, G. M. da., Groli, E. L., Figueiredo, R. G., Baretta, D., Kopp, M. M., Magalhaes Junior, A. M. de., Maia, L. C. da., Oliveira, A. C. de. (2016). Identification of variability for agronomically important traits in rice mutant families. *Bragantia, Campinas* v. 75, n. 1, 41-50.
- 139.**Madrid, E., Bouhadida, M., Dolar, S., Kharrat, M., Houasli, C., Rubio, J., (2015). Chickpea production in Mediterranean Basin. *Legume Perspectives* 10:5-7.
- 140.**Malik, B.A., Khan, I.A. and Malik, M.R. (1988). Genetic variability and correlations among metric traits in chickpea. *Pak. J. Agric. Res.* 9(3), 352-354.
- 141.**Malhotra, R.S., Nassif, A.M., Singh, K.B., Khalaf, G. (2005). Registration of 'Ghab 4' kabuli chickpea cultivar. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Published by Crop Science Society of America.

- 142.**Malik, B.A., Tahir, M., Khan, I.A., Zubair, M. and Choudhary, A.H. (1987). Genetic variability, character correlations and Path analysis of yield components in mungbean (*Vigna radiata* L.Wilczek). Pak. J. Bot. 9, 89-97.
- 143.**Mallu, T. S., Nyende, A.B., Ganga Rao, N.V.P.R., Odeny, D. A., Mwangi, S. G. (2015). Assessment of Interrelationship among Agronomic and Yield Characters of Chickpea. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. Vol. 8 (2), 128-135.
- 144.**Maluszynski, K.N., Zanten, L.V. and Ahlowalia, B.S. (2000). Officially released mutant varieties. The FAO/IAEA Database.Mut.Breed.Rev. 12, 1-12.
- 145.**Maluszynski, K.N., Zanten, L.V. and Ahlowalia, B.S. (2000). Officially released mutant varieties. The FAO/IAEA Database. Mut. Breed.Rev. 12: 1-12.
- 146.**Maqbool, M.A., Aslam, M., Ali, H. (2017). Breeding for improved drought tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Breeding, 136, 300–318.
- 147.**Mba, C. (2013). Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. Agronomy 3:200–23.
- 148.**McCallum, C. M., Comai L., Greene E. A. and Henikoff S. (2000). Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiol. 123, 439-442.
- 149.**Medina, F.I.S., Amano, E., Tano, S., (2004). FNCA. Mutation Breeding Manual. Forum for Nuclear Cooperation in Asia. Available from: URL: http://www.fnca.mext.go.jp/english/mb/mbm/e_mbm.html
- 150.**Meeley, R.B., Briggs, S.P. (1995). Reverse genetics for maize. Maize Genet Coop News 69:67-82.
- 151.**Micke A., (1997). Mutation breeding of grain legumes. 15th IAEA/FAO; Interregional Training Course in Advances in Technologies induced Mutations in Crops, 20 May - 27 June 1997: 51p.
- 152.**Mishra, D., Singh B., Sahu, R. (2013). Gamma Ray Induced Macro-Mutations in Greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. International Journal of Agriculture and Forestry, 3(3): 105-109.
- 153.**Moes, A. (1959). La mutagenèse par rayon X chez l'orge distique. In bulletin de l'institut agronomique de recherche de Gembloux, T. 27, n° 2, pp, 28-60.

154. Monica, S. and Seetharaman, N. (2015). Effect of Gamma Irradiation and Ems in M1 Generation of Garden Bean [Lablab Purpureus (L.) Sweet Var. Typicus Cv. CO (Gb) 14]. International Journal of Scientific Research and Engineering Studies (IJSRES) Volume 2 Issue 7: 59-63.
155. Muehlbauer, F. J., and Rajesh, P. N. (2008). "Chickpea a common source of protein and starch in the semiarid tropics," in Genomics of Tropical Crop Plants, Vol. 7, eds P. H. Moore and R. Ming (Berlin: Springer). 171–186.
156. Muehlbauer, F. J. and Singh, K. B. (1987). Genetics of Chickpea. Pp.11-18. In: M.C Saxena, and K.B. Singh (eds.). The Chickpea. CAB International, Walling Ford, UK.
157. Muehlbauer, F.J., Rajesh, P.N. (2008). Chickpea a common source of protein and starch in the semiarid tropics. In: Moore P.H. and Ming R. (eds.). Genomics of Tropical Crop Plants. Springer. 7, 171-186.
158. Muller, H.J. (1927). Artificial transmutation of the gene. Science 66(1699):84–87.
159. Murtagh, F., and Legendre, P. (2014). Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? J. Classific. 31, 274–295. doi: 10.1007/s00357-014-9161-z
160. MVD, (2017). Mutant variety database. <http://mvd.iaea.org/>.
161. Natarajan, A. T. (2005). Chemical mutagenesis: From plants to humans. Curr. Sci. 89(2), 312-317.
162. Nerker, Y. S., and Mote, S. B. (1978). Induced mutagenesis in bengal gram (*Cicer arietinum* L.). II. Micromutations. J. Maharashtra Agric. Univ. 3, 180-183.
163. Novak, F.J., Brunner, H. (1992). Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. IAEA Bull 4:25.
164. O'Neil, C.E., Nicklas, T.A. and Fulgoni, V.L. (2014). Chickpeas and Humus are associated with Better Nutrient Intake, Diet Quality, and Levels of Some Cardiovascular Risk Factors: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2010. Nutrition and Food Sciences. 4(1). 1-7.
165. Ofal Bio, (2011). Pois chiches biologiques (*Cicer arietinum*). Fiche technique, 3p.

166. Parshuram, S., Mishra, P.K., Pattnaik, R.K., Sial, P. (2003). Studies on genetic variability, heritability and genetic advance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Environ. Ecol. 21, 210-213.
167. Pathirana, R. (2012). Plant mutation breeding in agriculture, In: Hemming D. (ed) Plant sciences reviews, CABI. Cambridge, pp: 107-125.
168. Patil, B. C., (1992). The induction of tetraploid in *Crotalaria linifolia* Linn. Cytologia 57, 247-252.
169. Patil, S. B. (2013). Agronomic investigations on tall chickpea genotypes suitable for mechanical harvesting. PhD Thesis. University of Agricultural Sciences. Dharwad. India – 268P.
170. Paul, A., and Singh, D. P. (2002). Induced chlorophyll mutations in lentil (*Lens culinaris* Medik). Indian J. Genet. 62(3), 263-264.
171. PBGL. (2013). Molecular Characterization of Mutant Germplasm- A Manual Prepared by the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture- Plant Breeding and Genetics Laboratory, Seibersdorf. Austria. 184p.
172. Pino-Nunes, L.E., Figueira, A.V.O., Tulmann Neto A., Zsögön, A., Piotto, F.A., Silva, J.A., Bernardi, W.F., Peres, L.E.P. (2009). Induced Mutagenesis and Natural Genetic Variation in Tomato 'Micro-Tom'. ISHS, Acta Horticulturae, 821: 63-72.72 p.
173. Popov, M.G. (1929). [The genus *Cicer* and its species]. Trudy Prikladnoi Botanike Genetike i Selekcii 21-1: 1-254. Also translated by INSDOC, New Delhi, 1976.
174. Qureshi, A.S., Shaukat, A., Bakhsh, A., Arshad, M. and Ghafoor, A. (2004). An assessment of variability for economically important traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pak. J. Bot., 36(4): 779-785,
175. Qureshi, S. J., Khan, M.A., Arshad, M., Rashid, A., Ahmad, M. (2009). Pollen fertility (Viability) status in Asteraceae species of Pakistan. Trakia J. of Sci. 7: 12-16.
176. Qureshi, S. T., Memon, S. A., Waryani, B., Abassi, A. R., Patoli, W., Soomro, Y., Bux H., Bughio F.A.. (2014). Gamma Rays Induced Phenotypic Mutations In Chickpea (*Cicer arietinum* L.) SindhUniv. Res. Jour. (Sci. Ser.) Vol.46 (4):473-478.
177. Raina, A., Laskar, R. A., Khursheed, S., Khan. S., Parveen K., Amin, R., and Khan, S. (2017). Induce Physical and Chemical Mutagenesis for Improvement of Yield Attributing

- Traits and their Correlation Analysis in Chickpea. International Letters of Natural Sciences. ISSN: 2300-9675, Vol. 61, pp 14-22.
- 178.** Ranalli, P. (2012). The role of induced plant mutations in the present era. In: Kozgar M1, Khan, S. (eds) Induced mutagenesis in crop plants. Bioremed Biodivers Bioavail 6 (Spl Iss1): 1-5.
- 179.** Raturi, A., Singh, S.K., Sharma, V. and Pathak, R. (2015). Genetic variability, heritability, genetic advance and path analysis in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Legume Res. 39 (1), 157-163.
- 180.** Raval, L.J. (2001). Studies on selection indices and genetic divergence in chickpea. M.Sc. (Agri.) Thesis G.A.U. Sardar Krushinagar. Gujarat. India.
- 181.** Ravi, R., and Bhattacharya, S. (2004). "Flow behaviour of chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour dispersions: effect of additives." Journal of food engineering, 65(4), 619-624.
- 182.** Reddy, V. R. K., Thresiamma, P. J. and Edwin, R. (1993). A comparative study of microsperma and macrosperma lentils. I. Chlorophyll mutations. J. Indian Bot. Soc. 72, 25-28.
- 183.** Robertson, A.M., Maxted, N. and van der Maesen, L.G.D., (2000). A phenetic and phylogenetic investigation of the genus *Cicer* L. (Leguminosae, Cicereae). Botanical Journal of the Linnean Society (in Press).
- 184.** Robinson, H. F., Comstock, R. E., and Harvey, P. H. (1949). Genotypic and phenotypic correlation in corn and their implications in selection. Agronomy Journal. vol. 43, 282–287.
- 185.** Roychowdhury, R. and Tah, J. (2013). Mutagenesis- A potential approach for crop improvement. In Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques. K.R. Hakeem. P. Ahmad., and M. Ozturk. eds. New York: Springer Science & Business Media. LLC. 4:149–187.
- 186.** Roychowdhury, R., Datta, S., Gupta, P., Tah, J. (2012). Analysis of genetic parameters on mutant populations of mungbean (*Vigna radiata* L.) after ethyl methane sulphanate treatment. Not SciBiol 4(1), 137–143.
- 187.** Rupperez, P. (1998). Oligosaccharides in raw and processed legumes. Food Research and Technology, 206, 130–133.

188. Sagade, A.B. and Apparao, B.J. (2011). M₁ generation studies in urdbean (*Vigna mungo* (L.) Hepper). Asian J. Exp. Biol. Sci., 2(2): 372-375.
189. Sağel, Z., Tutluer, M.I., Peşkircioğlu, H., Kantoğlu, K. Y., and Kunter, B. (2009). The Improvement of TAEK-Sağel Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Mutant Variety in Turkey. In: Induced plant mutations in the genomics era Shu. Q.Y. (ed.) / FAO. Rome (Italy); IAEA. Vienna (Austria). pp. 319-321.
190. Saki, I., Zaman, M. A., Tuhina-Khatun, M., Kamal, M. M. and Begum, H. (2009). Genetic Variability. Correlation and Path Co-Efficient Analysis for Agronomic Traits in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) The Agriculturists. A Scientific Journal of Krishi Foundation. 7(1&2): 12-21.
191. Sakin, M. A., and Yildirim, A. (2004). Induced mutations for yield and its components in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Food Agric. Environ. 2(1), 285-290.
192. Salimath, P.M., Toker, C. Sandhu, J.S, Kumar, J., Suma, B., Yadav S.S., Bahl, P.N. (2007). Conventional Breeding Methods. In: S.S. Yadav, R. J. Redden, W. Chen, and B. Sharma (eds), Chickpea Breeding and Management, CABI, UK. pp: 369-390.
193. Samad, M.A., Sarker, N. and Deb, A.C. (2014). Study on relationship and selection index in chickpea. Tropical Plant Research. 1(3), 27–35.
194. Saraf, C. S., Rupella, O. P., Yadav, R. L., Shivkumar, B. G., Bhattarai, S. (1998). Biological Nitrogen fixation and residual effects of winter grain legumes in rice and wheat cropping system of Indo – Gangetic plain. Oxford and IHB Publishing New Delhi India, pp 14-30.
195. Sarwar, G., and Haq, M.A. (2005). Radiation Induced chlorophyll mutations in Sesame, *Sesamum indicum* L. Journal of Agriculture Research. 43(4): 317-322.
196. Sato, Y., Shirasawa, K., Takahashi, Y., Nishimura, M. and Nishio, T. (2006). Mutant selection of progeny of gamma-ray-irradiated rice by DNA hetero-duplex cleavage using Brassica petiole extract. Breed Sci. 56:179-183.
197. Saxena M.C., (1987). Agronomy of chickpea. In: Saxena M.C. & Singh K.B., eds. The chickpea. Wallingford, UK: CAB International, 207-232.
198. Saxena, M.C. 1990. Status of chickpea in the Mediterranean basin. In: Saxena M.C. (Ed.), Cubero J.I. (Ed.), Wery J. (Ed.). Present status and future prospects of chickpea crop

- production and improvement in the Mediterranean countries, Zaragoza: CIHEAM. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; 9:17- 24.
- 199.**Shah, T. M., Mirza, J. I., Haq M. A. and Atta, B. M. (2006). Induced genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) I. Frequency and spectrum of chlorophyll mutations. Pak.J. Bot., 38(4): 1217-1226.
- 200.**Shah, T. M., Mirza, J. I., Haq, A.M. and Atta, B. M. (2008). Radio sensitivity of various chickpea genotypes in M₁ generation I-laboratory studies. Pak. J. Bot., 40(2): 649-665.
- 201.**Shah, T.M., Atta, B.M., Mirza, J.I. and Haq, M.A. (2012). Radio-sensitivity of various chickpea genotypes in M₁ Generation. II-field studies Pak. J. Bot., 44(2): 631-634.
- 202.**Shah, T.M., Hassan, M., Haq, M.A., Atta, B.M., Alam, S.S. and Ali, H. (2005). Evaluation of Cicer species for resistance to Ascochyta Blight. Pak. J. Bot., 37(2): 431-438.
- 203.**Shaikh, M.A.Q. (1977). Grain legumes in Bangladesh. In: Induced Mutations for the Improvement of Grain Legumes in South East Asia (1975), IAEA-203. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, pp. 61–70.
- 204.**Shaikh, M.A.Q., Bhuiya, A.D., Saha, C.S. and Rahman, L. (1983). Performance and agronomic potential of radiationinduced and collected genotypes of chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: Induced Mutations for Improvement of Grain Legumes Production III, IAEA-TECDOC- 299. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, pp. 47–54.
- 205.**Shakoor, A., and Haq, M. A. (1980) Improvement of plant architecture in chickpea and mungbean. In: Induced Mutations for Improvement of Grain Legume Production, I, 59-62. IAEA, Vienna.
- 206.**Sharma, B. and Kharkwal, M.C. (1982). Induced mutations in grain legumes. In: Induced Mutations for the Improvement of Grain Legumes Production II, IAEA-TECDOC- 260. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, pp. 59–64.
- 207.**Sharma, P.C. and Varshney, R.K. (1999). Induced mutations in chickpea improvement. In: Siddiqui, B.A. and Khan, S. (eds) Breeding in Crop Plants, Mutations and In Vitro Mutation Breeding. Kalyani Publishers, Ludhiana, India, pp. 57–67.
- 208.**Sharma, S. K., and B. Sharma, (1981). Induced chlorophyll mutations in lentil. Indian J. Genet. 41(3), 328-333.

209. Sheeba, A., Ibrahim, S.M., Yogameenakshi, P. and Babu, S. (2003). Effect of mutagens on quantitative traits in M2 generation in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Ind. J. Genet.*, 63(2): 173-174.
210. Shrestha, R., Neupane, R.K., Adhikari, N.P. (2011). Status and Future Prospects of Pulses in Nepal" Paper presented at the Regional Workshop on Pulse Production, Nepal Agricultural Research Council Kathmandu, Nepal, October 24-25.
211. Shu, Q.Y. (2009). A Summary of the International Symposium on Induced Mutations in Plants. In: *Induced plant mutations in the genomics era* Shu. Q.Y. (ed.) / FAO. Rome (Italy); IAEA. Vienna (Austria). 15-18.
212. Shu, Q.Y., Shirasawa, K., Hoffmann, M., Hurlebaus, J., Nishio, T. (2012). Molecular techniques and methods for mutation detection and screening in plants. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (eds) *Plant mutation breeding and biotechnology*. CABI and FAO, Oxfordshire, pp. 241–256.
213. Siddique, K.H.M., Loss, S.P., Regan, K.L. and Jettner, R.L. (1999). Adaptation and seed yield of cool season grain legumes in Mediterranean environments of southwestern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 50(3), 375–387.
214. Sigurbjörnsson, B. (1983) Induced mutations. In: Wood, D.R. (ed.) *Crop Breeding*. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 153–176.
215. Singh G. et Bushan L. S., (1979). Water use, water use efficiency and yield of dryland chickpea as influenced by fertilization, stored soil water and crop season rainfall. *Agricultural Water Management*. 2, pp: 299-305.
216. Singh, G., Sareen, P. K. and Saharan, R. P. (2000). Induced chlorophyll and morphological mutations in mungbean. *Indian J. Genet.* 60(3), 391-393.
217. Singh, K.B. (1987). Chickpea breeding. In: Saxena, M.C. and Singh, K.B. (eds) *The Chickpea*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 127–162.
218. Singh, K.B. (1997) Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 53, 161–170.
219. Singh, R. K. and Choudhary, B. D. (1985). *Biometrical Methods in Quantitative Genetic Analysis*. Kalyani Publishers. New Delhi. India. 318p.

220. Singh, U., Kherdekar, M.S. and Jambunathan, R. (1982). Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. The levels of amylase inhibitors, levels of oligosaccharides and in vitro starch digestibility. *Journal of Food Science* 47, 510–512.
221. Sivasubramanian, S. S. and MadhavaMenon, P. (1973). Genotypic and phenotypic variability in rice. *Madras Agricultural Journal*. vol. 60, 1093–1096.
222. Solanki, I. S. and Sharma, B. (1999). Induction and isolation of morphological mutations in different mutagenic damage groups in lentil (*Lens Culinaris Medik*). *Indian J. Genet.*, 59(4): 479-485.
223. Solanki, I.S. and Rana, A. (2016). Induction and harnessing of polygenic variability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) *Legume Research*, 39 (2), 170-176.
224. Solanki, I.S. and Sharma, B. (2001). Differential behaviour of polygenic characters to mutagenic treatments and selection in macrosperma lentil (*Lens culinaris* Medik). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 61 (3), 242-245.
225. Solanki, I.S. and Sharma, B. (2002). Induced polygenic variability in different groups of mutagenic damage in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 62 (2), 135-139.
226. Solanki, R.K., Gill, R.K., Verma, P., Singh, S. (2011). Mutation breeding in pulses: an overview. In: Khan S., Kozgar MI. (eds). *Breeding of pulse crops*. Kalyani Publishers, Ludhiana, pp. 85–103.
227. Stadler LJ (1928). Mutations in barley induced by x-rays and radium. *Science* 68: 186–187.
228. Street, K., Rukhkyan, N., Ismail A. (2008). Directives pour la régénération : pois chiche. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M. A. and Hanson J., editors. *Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]*. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 11p.
229. Szurman-Zubrzycka, M., Chmielewska, B., Gajewska. P., Szarejko, I. (2017). Mutation Detection by Analysis of DNA Heteroduplexes in TILLING Populations of Diploid Species. In: *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*. Jankowicz -Cieslak J., Tai T., Kumlehn J., Till B, eds. 18: pp 281-303, Cham: Springer.

- 230.** Tabasum, A., Saleem, M. and Aziz, I. (2010). Genetic variability, trait association and path analysis of yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Pak. J. Bot. 42, 3915-3924.
- 231.** Till, B. J., Amos, E. K., Kinyua, M. G., Bado, S. , Jankowicz-Cieslak, J., Huynh, O. A., Henry, I., Comai, L. and Lagoda, P. (2014). Mutation induction and reverse-genetics for functional genomics and breeding. In Mutagenesis and High-throughput Screening CORNET Projects, 5–6. Tagungsband der 64. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 25.-26. November 2013, Raumberg-Gumpenstein.
- 232.** Till, B. J., Amos, E. K., Kinyua, M. G., Bado, S. , Jankowicz-Cieslak, J., Huynh, O. A., Henry, I., Comai, L. and Lagoda, P. (2014). Mutation induction and reverse-genetics for functional genomics and breeding. In Mutagenesis and High-throughput Screening CORNET Projects, 5–6. Tagungsband der 64. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 25.-26. November 2013, Raumberg-Gumpenstein.
- 233.** Till, B.J. (2014). Mining Genetic Resources via Ecotilling. In Genomics of Plant Genetic Resources, R. Tuberosa, A. Graner, and E. Frison, eds. (Springer Netherlands), pp. 349–365.
- 234.** Till, B.J., Datta, S., and Jankowicz-Cieslak, J. (2018). TILLING : The Next Generation. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1-22.
- 235.** Till, B.J., Jankowicz-Cieslak, J., Huynh, O.A., Beshir, M.M., Laport, R.G., Hofinger, B.J. (2015). Low-Cost Methods for Molecular Characterization of Mutant Plants, Tissue Desiccation, DNA Extraction and Mutation Discovery: Protocols. Ed: Springer International Publishing, ISBN: 978-3-319-16258-4. 35P.
- 236.** Till, B.J., Zerr, T., Comai, L., Henikoff, S. (2006) A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. Nat Protoc, 1(5):2465–2477.
- 237.** Toker, C. (2009). A note on the evolution of kabuli chickpeas as shown by induced mutations in *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genet Resour Crop Evol. 56:7–12.
- 238.** Toker, C. and Cagirgan, M.I. (2004). Spectrum and Frequency of Induced Mutations in Chickpea International Chickpea and Pigeonpea Newsletter. ICRISAT, ICPN, 11: 8-10.

239. Toker, C., Uzun, B., Canci, H., Ceylan, F.O. (2005). Effects of gamma irradiation on the shoot length of Cicer seeds. *Radiation Physics and Chemistry* 73: 365-367.
240. Toker, C., Uzun, B., Ceylan, F.O., Ikten, C. (2014). Chickpea. In: *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, A. Pratap and J. Kumar Eds., Volume 2, Springer, Dordrecht, pp:121-151.
241. Tripathi, A., and Dubey, D. K. (1992). Frequency and spectrum of mutations induced by separate and simultaneous applications of gamma rays, ethyl methane sulphonate (EMS) in two microsperma varieties of lentil. *LENS* 19(1), 3-8.
242. Tsai, H., Howell, T., Nitcher, R., Missirian, V., Watson, B., Ngo, K.J., Lieberman, M., Fass, J., Uauy, C., Tran, R.K., Khan, A.A., Filkov, V., Tai, T.H., Dubcovsky, J. & Comai, L. (2011). Discovery of Rare Mutations in Populations: TILLING by Sequencing. *Plant Physiology*, 156: 1257–1268. <https://doi.org/DOI 10.1104/pp.110.169748>
243. Ukai, Y. and Nakagawa, H. (2011). Strategies and Approaches in Mutant Population Development for Mutant Selection in Seed Propagated Crops. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H (eds) *Plant mutation breeding and biotechnology*. CABI and FAO, Oxfordshire, C18: 209-222.
244. Umavathi, S., Mullainathan, L. (2015). Physical and chemical induced mutagenesis study for identifying lethality dose in chickpea (*Cicer arietinum L.*) Var. Co – 4. *International Letters of Natural Sciences* 8:1-5.
245. Upadhyaya, H.D., Bramel, P.J., and Singh, S. (2001). Development of chickpea core subset using geographic distribution and quantitative traits. *Crop Sci.*, 41:206-210.
246. Usharani, K.S. and Ananda Kumar, C.R. (2016). Estimation of variability, heritability and genetic advance in mutant populations of black gram (*Vigna mungo L.* Hepper). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 48 (3), 258-265.
247. Usharani, K.S., and Ananda Kumar, C.R. (2015). Mutagenic efficiency and effectiveness of gamma rays and EMS and their combination in inducing chlorophyll mutations in M₂ generation of Urdbean (*Vigna mungo L.*) Hepper, *Electronic Journal of Plant Breeding*, 6(1): 210-217.
248. USSL, Staff. (1954). Diagnostic and improvement of saline and alkali soils. U.S.D.A. Handbook, n° 60, 160p.

- 249.** Vaghela, M.D., Poshiya, V.K., Savaliya, J.J., Kavani, R.H. and Davada, B.K. (2009). Genetic variability studies in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Legume Res.* 32 (3), 191-194.
- 250.** Van der Maesen, L.J.G. (1979). *Cicer*. In *Flora Iranica*. Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz 140: 1-15, t. 1-22.
- 251.** Van der Maesen, L.J.G. (1987). *Cicer* L. Origin, history and taxonomy of chickpea. In: M.C. Saxena and K.B. Singh (ed.). *The Chickpea*. C.A.b. International Cambrian News Ltd. Aberystwyth. UK., 11-34.
- 252.** Van der Maesen, L.J.G., Maxted, N., Javadi, F., Coles, S. and Davies, A.M.R. (2007). Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. In: *Chickpea Breeding and Management*, Edited by SS Yadav, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India, R Redden, Victoria Institute for Dryland Agriculture Horsham, Australia, W Chen, USDA-ARS, Washington State University, USA and B Sharma, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.
- 253.** Van Harten, A.M. (1998). *Mutation Breeding. Theory and practical Applications*. Cambridge, U.K.: New York, Cambridge University Press, pp. 353.
- 254.** Varshney, R. K., Song, C., Saxena, R. K., Azam, S., Yu, S., Sharpe, A., Cannon, S., Baek, J., Rosen, B.D., Ta'ran, B., Millan, T., Zhang, X., Ramsay, L.D., Iwata, A., Wang, Y., Nelson, W., Farmer, A.D., Gaur, P.M., Soderlund, C., Penmetsa, R.V., Xu, C., Bharti, A.K., He, W., Winter, P., Zhao, S., Hane, J.K., Carrasquilla-Garcia, N., Condie, J.A., Upadhyaya, H.D., Luo, M.C., Thudi, M., Gowda, C.L.L., Singh, N.P., Lichtenzveig, J., Gali, K.K., Rubio, J., Nadarajan, N., Dolezel, J., Bansal, K.C., Xu, X., Edwards, D., Zhang, G., Kahl, G., Gil, J., Singh, K.B., Datta, S.K., Jackson, S.A., Wang, J., Cook, D.R. (2013). Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol* 31:240–248.
- 255.** Varshney, R.K., Thudi, M., May, G.D. & Jackson, S.A. (2010). Legume genomics and breeding. *Plant Breed. Rev.* 33, 257–304.
- 256.** Vavilov, N.I. (1951). The origin variation maturity and breeding of cultivated plant. (In *An annotated bibliography of chickpea Genetics and Breeding 1915.-1983*. Ed. Singh. K.B.; Malhotra. R.S. and Muehlbauer. F.J. 1984. ICARDA/ICRISAT joint publication).
- 257.** Vilain, M. (1989) *La production végétale*. T2, Ed. Lavoisier, Paris, 378p.

- 258.** Wang, X., Gao, W., Zhang, J., et al. (2010). Subunit, amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Res Internl* 43, 567-572.
- 259.** Wani, A. A. (2011). Induced polygenic variability for quantitative traits in Chickpea var. Pusa-372. *Comunicata Scientiae*. 2(2), 100-106.
- 260.** Wani, M. R. and Khan, S. (2006). Estimates of genetic variability in mutated populations and the scope of selection for yield attributes in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Egyptian Journal of Biology*. Vol. 8, 1-6.
- 261.** Wani, M.R. and Khan, S. (2006). Estimates of genetic variability in mutated population and scope of selection for yield attributes in *Vigna radiata* (L). Wilczek. *Egyptian Journal of Biology*. 8, 1-6.
- 262.** Wani, M.R., Kozgar, M.I., Tomlekova, N., Khan, S., Kazi, A.G., Sheikh, S.A. and Ahmad, P. (2014). Mutation Breeding: A Novel Technique for Genetic Improvement of Pulse Crops Particularly Chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: Ahmad et al. (eds.). *Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*. Volume 2. CH 9, 217-248.
- 263.** Wery, J. (1986). Un pois pas si chiche que cela ! *Bulletin FNAMS; Semences* 97: 32-35.
- 264.** Wood, J.A. and Grusak, M.A. (2007). Nutritional value of chickpea. In: S.S. Yadav, R. Redden, W. Chen and B. Sharma (eds.) *Chickpea Breeding and Management*. CAB, Wallingford, UK. Pp. 101-142.
- 265.** Yadav, R.S., Hash, C.T., Bidinger, F.R., Devos, K.M., Howarth, C.J. (2004). Genomic regions associated with grain yield and aspects of post-flowering drought tolerance in pearl millet across stress environments and testers background. *Euphytica* 136, 265–277.
- 266.** Yadav, S.S., Redden, R.J., Chen, W., Sharma, B. (2007). *Chickpea breeding and management*. CAB International, Oxfordshire, UK. ISBN 1-84593-213-7.
- 267.** Yaqoob, M. and Rashid, A. (2001). Induced mutation studies in some mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. *Online J Biol Sci* 1(9):805–808.
- 268.** Yimram, T., Somta, P. and Srinives, P. (2009). Genetic variation in cultivated mung bean germplasm and its implication in breeding for high yield. *Field Crops Res*. 112, 260-266.

- 269.** Yuan, L., Dou, Y., Kianian, S.F., Zhang, C., and Holding, D.R. (2014). Deletion mutagenesis identifies a haploinsufficient role for gamma-zein in opaque2 endosperm modification. *Plant Physiol* 164, 119–130.
- 270.** Zaghouane, O. (1997). La situation et les perspectives de développement des légumineuses alimentaires en Algérie. *Revue céréaliculture*, n°30. Août 1997. pp.27-34.
- 271.** Zeghouane, O. (2018). État des lieux et devenir des légumineuse alimentaire en Algérie: importance économique et sociale, développement et amélioration de la production et de la productivité. Congrès national sur les ressources phylogénétiques en Algérie. INRAA-Alger, 22,23 et 24 octobre 2018.pp.55-77.
- 272.** Zeghouane, O., Akkouche, A., Djeddou, R., Abed, N.EL., Djennadi, R., Amiali, S., Rouag L., Touati, S. (2016) Le développement et l'amélioration de la production des légumineuses alimentaires : un enjeu stratégique pour l'Algérie. Forum régional pour le développement des légumineuses alimentaires. Mostaganem-Algérie, 28,29 et 30 novembre 2016. Ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche-Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Communication orale. MADRP- FAO.
- 273.** Zine-Zikara F., Bouzid L., Yekkour A. (2015). Le pois chiche en Algérie : situation, potentialités et perspectives. *Recherche Agronomique* 27: 35-47.
- 274.** Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Domesticated Plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin* (4th ed.). Oxford: Oxford University Press.

ANNEXES

Annexe 1. Détails des variétés de pois chiche développées par mutagenèse (Source : Wani *et al.*, 2014).

Nom de la variété mutante	Pays	Année d'inscription	Développé par	Principaux caractères améliorés
Hyprosola (M-699)	Bangladesh	1981	200 Gy les rayons gamma	10 jours de maturité précoce, plus de gousses, indice de récolte supérieur, densité de plantation supérieure à 19%, rendement supérieur à celui de la variété initiale.
CM72	Pakistan	1983	150-Gy les rayons gamma	Résistance à l'antracnose du pois chiche (<i>Ascochyta rabiei</i>), rendement élevé.
Kiran (RSG-2)	India	1984	Neutrons rapides	Type de plante érigée, plus de gousses, rendement élevé, maturité précoce, tolérance au sel.
Pusa 408 (Ajay)	India	1985	600-Gy rayons gamma sur les graines	Haut rendement, résistance à l'antracnose, semi-dressé, à 140-155 jours jusqu'à maturité et architecture du plant.
Pusa 413 (Atul)	India	1985	600-Gy rayons gamma sur les graines	Haut rendement, résistance à la fusariose, résistance modérée à l'antracnose, résistance au stunt virus, pourriture du pied, pourriture des racines, semi-dressé, nombre de ramifications plus élevé, plus de deux grains / gousse, 130–140 jours jusqu'à maturité.
Pusa 417 (Girnar)	India	1985	600 Gy rayons gamma sur les graines	Haut rendement, courte, semi-érigée, très ramifiée, nombre de gousses élevé, 110–130 jours à la maturité, résistance à la fusariose, résistance modérée au stunt virus, racine du collet, pourriture du pied, pourriture racinaire, dommages mineurs causés par le foreur des gousses et les nématodes.
NIFA-88 (CM-1918)	Pakistan	1990	100 Gy rayons gamma sur les graines	Résistance modérée à l' <i>Ascochyta rabiei</i> , 2 semaines maturité plus tôt, rendement élevé (15 à 20%), fixation d'azote supérieure à celle initiale.
Line 3	Egypt	1992	50 Gy rayons gamma+ 0,025% EMS	Haut rendement
CM-88	Pakistan	1994	100 Gy rayons gamma	Résistance à l' <i>Ascochyta</i> , résistance au <i>Fusarium</i> et rendement élevé.
NIFA-95	Pakistan	1995	200 Gy rayons gamma	Résistance à l'antracnose

CM-98	Pakistan	1998	300-Gy rayons gamma	Résistance à l' <i>Ascochyta</i> blight et au <i>Fusarium</i> wilt
Binasola-2 ^a	Bangladesh	1998	NA	Haut rendement, maximum 2,2 tonnes. ha-1 (moyenne 1,6 tonne.ha-1), plantes de plus de 50–60 cm, taille de graine supérieure à Hyprosola, période de maturité initiale de 120–130 jours, convient à la culture dans les zones sèches, en particulier dans le Barind tract.
CM 2000	Pakistan	2000	150-Gy rayons gamma	Haut rendement et résistance aux maladies
Hassan-2K	Pakistan	2000	450-Gy rayons gamma sur les graines	Haut rendement, résistance à l'antracnose et au fusarium et teneur en protéines plus élevée (24%)
Binasola-3	Bangladesh	2001	200-Gy rayons gamma sur les graines sèches et sélections de la génération suivante	Maturité précoce, type de plante dressée, tégument rugueux et taille de graine supérieure au génotype exotique G-97 (initiale)
Binasola-4	Bangladesh	2001	Hybridation avec une lignée ICRISAT K-850 et la variété mutante Hyprosola	Meilleur rendement en graines que les parents, taille moyenne, couleur de l'enveloppe de la graine brillante
Borina ^b	Bulgaria	2004	150-Gy rayons gamma	Mutations morphologiques
Strandja ^b	Bulgaria	2004	50-Gy rayons gamma + 0.05 % EMS	Mutations morphologiques
BGM 547	India	2005	Rayons Gamma	Haut rendement, grain "bold", belle couleur brun doré et résistance moyenne au fusarium, à la pourriture des racines, au stunt et à <i>Helicoverpa armigera</i>
Pusa 547	India	2006	600-Gy rayons gamma	Haut rendement, bonne qualité de cuisson, tolérance au <i>Fusarium wilt</i> , au stunt virus et à la pourriture racinaire
TAEK-SAGEL	Turkey	2006	150-Gy rayons gamma	Maturité précoce (95-100 jours), capacité de rendement supérieure (180-220 kg / da), teneur en protéines de la graine supérieure (22-25%), hauteur du premier pot supérieure (20-25 cm), poids de 100 graines (42-48) , temps de cuisson (35-40 min), résistante à <i>Ascochyta</i>

				blight (<i>Ascochyta rabie</i>) et meilleure qualité que dans la variété de contrôle
THAL-2006	Pakistan	2006	Hybridation avec la lignée mutante CM82/87	Tolérance à l'antracnose, tolérance au stress hydrique et taille de la graine "bold seed size"
CM-2008	Pakistan	2008	0.2 % EMS	Taille de la graine, résistance au fusarium et rendement élevé
Binasola-5	Bangladesh	2009	200 Gy rayons gamma	Haut rendement, hauteur de la plante (50-66) cm. La période de maturité varie entre 120 et 125 jours. Les graines contiennent 23,5% de protéines.
Binasola-6	Bangladesh	2009	200 Gy rayons gamma	Haut rendement. Hauteur de la plante (48-60 cm). La période de maturité varie entre 122 et 126 jours. Il a la couleur brillante de l'enveloppe de la graine. Les graines contiennent 23,10% de protéines.
Binasola-7	Bangladesh	2013	200 Gy rayons gamma	Haut rendement. La hauteur de la plante varie de 46 à 60 cm. La période de maturité varie entre 120 et 125 jours. Le poids de 100 graines est de 23,2 g et la teneur en protéines de 23,50%.
Binasola-8	Bangladesh	2013	200 Gy rayons gamma	Haut rendement. Il mûrit dans 125 à 130 jours, le poids de 100 graines est de 23,9 g. Teneur en protéines de la graine 23,80%.
Binasola-9	Bangladesh	2016	Rayons gamma	Haut rendement. Il mûrit dans 115-125 jours, le poids de cent graines est de 21,7 g.
Binasola-10	Bangladesh	2016	Rayons gamma	Variété de pois chiche à haut rendement. Il mûrit dans 115-122 jours, le poids de cent graines est de 23,5g.

Joint FAO/IAEA, Vienna Mutant Variety Database, MVD; <http://mvgs.iaea.org>

^aBangladesh Institute of Nuclear Agriculture, BINA; <http://www.bina.gov.bd/>

^bTomlekova 2010

Titre du document	Référence	Affiliations des auteurs	Objective	Traitement mutagène et dose Echantillonnage	Résultats
Effects of gamma irradiation on physical and chemical properties of chickpeas (<i>Cicer arietinum</i>).	Graham John A. ⁽¹⁾ ; Panozzo Joe F. ⁽¹⁾ ; Lim Patrick C. ⁽¹⁾ ; Brouwer Jan Bert ⁽¹⁾ Journal of the science of food and agriculture, ISSN. vol. 82, n°14, pp. 15 99-1605. 2002.	⁽¹⁾ Agriculture Victoria-Horsham, Victorian Institute for Dry land Agriculture, Private , AUSTRALIE	Changements dans les propriétés physiques et chimiques des pois chiche	Rayons gamma ⁶⁰ Co <ul style="list-style-type: none"> • 0 -20kGy • 20 to 50kGy 	<ul style="list-style-type: none"> • n'a eu aucun effet significatif sur la capacité d'hydratation, • diminution significative de l'hydratation
Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays, Ethyl Methane Sulphonate and their Combination Treatments in Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	Aijaz A. Wani, Asian Journal of Plant Sciences, ISSN, 1682-3974. 2009.	Cytogenetic Laboratory, Department of Botany, University of Kashmir, INDIA	Évaluer l'efficacité des rayons gamma, de l'EMS et de leur combinaison chez le pois chiche	<ul style="list-style-type: none"> • Rayons gamma ⁶⁰Co (150, 200, 300, 400 Gy) • EMS (0.1, 0.2, 0.3, and 0.4%) • Combination rayons gamma + EMS <ul style="list-style-type: none"> - 200Gy+ 0.2%EMS - 300+0.2%EMS - 200Gy+ 0.3%EMS - 300+0.3%EMS semences certifiées de 2 variétés de pois chiche * population M ₂ composé de 1500 graines dans chaque traitement avec 500	<ul style="list-style-type: none"> • Recommandé pour exploiter la variabilité • Rayons gamma +EMS>EMS> Rayons gamma

				graines dans chaque parcelle de réplication	
Genetic improvement of chickpeas using induced mutations (<i>Cicer arietinum</i>)	J. D. Barshile ⁽¹⁾ and B. J. Apparao ⁽²⁾ , 2009 Induced Plant Mutations in the Genomics Era Q. Y. Shu (Editor) Food and Agriculture Organization of the United Nations, ROME	⁽¹⁾ Shri Anand College of Science, pathardi, District Ahmednaga..r, India ⁽²⁾ Padmashri Vikhe Patill College of Arts, Science and Commerce, Paravarangar..., India	Cultivars à haut rendement, variabilité génétique induite pour amélioration d'un cultivar de pois chiche locale	Gamma rays ⁶⁰ Co • Dose 400, 500, 600 Gy Sodium azide (SA) • Dose 2,3 et 4 mM), Ethyl methane sulphonate (EMS) • Dose 8, 12 et 16 mM.	<ul style="list-style-type: none"> • Une variation génotypique considérable a été observée du nombre de graines et de gousses par plante. • Les lignées mutantes induites ont montré une augmentation à la fois positive et négative des caractères quantitatifs.
Genetic Improvement of Soybean Variety VLS-2 through Induced Mutations	J G Manjaya and <i>al.</i> , 2009 Induced Plant Mutations in the Genomics Era Q. Y. Shu (Editor) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome	Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, India	Induire une variabilité génétique pour les caractères morphologiques, les attributs de rendement et l'huile et teneur en inhibiteurs de la trypsine dans le cultivar de soja	<ul style="list-style-type: none"> • Rayons gamma ⁶⁰Co (Dose 250Gy) • Un millier de graines de la variété de soja VLS-2 ont été exposées à des rayons gamma 250Gy dans une cellule gamma GC 220 avec ⁶⁰Co. • 748 M₁ plantes ont été récoltées individuellement et les graines 	<ul style="list-style-type: none"> • Dans la génération M₅, 24 lignées mutantes ont été évalués pour différents caractères quantitatifs. • L'analyse de variance a montré des variations hautement significatives entre les lignées mutantes pour le rendement par plant. • Le rendement par plante du mutant M-17 était de 13,1 g, ce qui est nettement supérieur à

				<p>obtenues ont été utilisées pour élever la population M₂.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dans la population M₂, 7 480 plantes ont été sélectionnées pour rechercher des mutations morphologiques. 	celui du parent VLS-2 (8,3 g).
<p>The Improvement of TAEK-Sagel Chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) Mutant Variety in Turkey</p>	<p>Z Sağel and <i>al.</i>, Induced Plant Mutations in the Genomics Era 2009</p> <p>Q.Y.Shu (Editor) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome</p>	<p>TAEA, Saraykoy Nuclear Research and Training Center, Nuclear Agriculture Section, Saraykoy, Ankara, Turkey</p>	<p>Essais de rendement et de caractéristiques de qualité, amélioration de variétés de pois chiches bien adaptées aux zones de culture de pois chiches, résistantes au froid, adaptées au type de récolte, présentant un rendement élevé et une teneur élevée en protéines, grosses graines, résistance à l'antracnose et à d'autres maladies et ravageurs, et amélioration des caractéristiques de qualité.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 8 doses d'irradiation gamma (⁶⁰Co): Dose 50-400Gy • 0 (Control), 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 et 400Gy • Mille graines par traitement ont été semées dans le champ M₁. • 3 500 des plantes individuelles ont été récoltées et 20 graines de chaque plante M₁ ont été prélevées et plantées la saison suivante. • 2520 mutants M₂ souhaitables ont 	<p>Mutant de pois chiche 'TAEK-Sagel'.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rendement 186 kg/ha • teneur en protéines de la graine 23%. • Le temps de cuisson était plus court que les autres (37 minutes).

				été sélectionnés et cultivés dans les rangs de la progéniture comme M ₃ .	
Induced Genetic Variability for Yield and Yield Components in Peanut (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	H L Nadaf and <i>al.</i> , Induced Plant Mutations in the Genomics Era 2009 Q.Y.Shu (Editor) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome	National Seed Project, Seed Unit, University of Agricultural Sciences, Dharwad, Karnataka, India	Induire une variabilité polygénique du rendement et de ses composants	<ul style="list-style-type: none"> • Radiation gamma (200Gy et 300Gy) et ethyl methane sulphonate (EMS-0.5 %). • 500 graines par traitement dans M₂, 90 lignées mutantes/ descendance. 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mutants supérieurs isolés dans M₄ • Les mutants supérieurs isolés du traitement 200Gy. • Deux des lignées mutantes ont donné un rendement significativement supérieur (3 315 et 2 647 kg / ha) par rapport aux parents.
TILLING to detect induced mutations in soybean	Jennifer L Cooper and <i>al.</i> , 2008 <i>BMC Plant Biology</i> , <i>BioMed central</i> , 8:9	Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA 98107, USA	Soybean (<i>Glycine max</i> L) 4 populations	EMS <ul style="list-style-type: none"> • Dose 40 mM-50mM N-nitroso-N-methylurea (NMU) • Dose 2.5mM 	<ul style="list-style-type: none"> • Sept cibles dépistées dans chaque population et 116 mutations induites découvertes.
Induction of dormancy in Spanish Groundnut Seeds (<i>Arachis hypogaea</i> L.) Using Cobalt-60	N. Benslimani et Khelifi L. 2009 Induced Plant Mutations in the Genomics Era Q.Y.Shu (Editor) Food and	Algiers nuclear Research Center. National Institute for Agriculture, El Harrach	Produire des lignées mutantes avec des graines dormantes pour obtenir une variété adaptée et éviter ainsi des pertes de production considérables	<ul style="list-style-type: none"> • ⁶⁰Co (50, 100, 150, 200, 300, 450 Gy) • Pour le test de radio sensibilité de 25 graines par dose et par population dans 	<ul style="list-style-type: none"> • Un effet significatif de l'irradiation à travers des analyses statistiques. • La dormance des semences testée sur chaque plante M₂, les résultats obtenus démontré l'existence

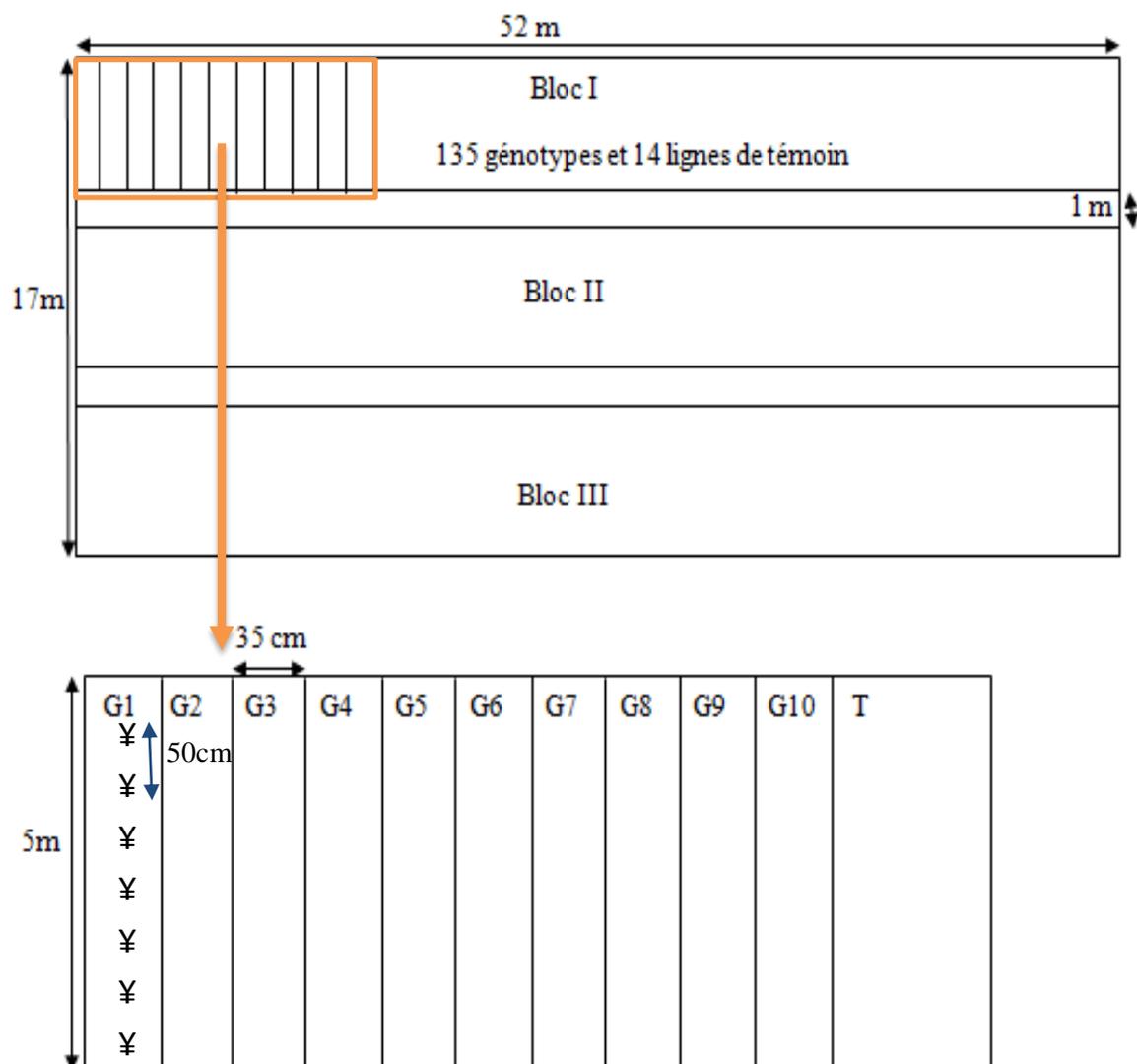
Gamma Irradiation	Agriculture Organization of the United Nations, Rome		Matériel végétal (4 populations d'arachide de type spanish non dormantes)	des boîtes de Pétri contenant du papier filtre. <ul style="list-style-type: none"> • 2 populations et trois doses (100, 200 et 300 Gy) ont été retenus pour le terrain et 225 graines par dose et par population. 	d'une telle caractéristique.
Mutation Breeding of Pigeonpea (<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.] for Yield Contributing Traits.	Sanjay Pralhad Giri, Thèse Doctor Of Philosophy In Botany October-2010	In Faculty Of Science Department Of Botany, Padmashri Vikhe Patil College Of Arts, Science And Commerce, Pravaranagar, Loni – 413713 (Maharashtra), India	Induire une variabilité génétique des caractères contribuant au rendement chez un cultivar local de pigeonpea. Etudier l'efficacité et l'efficience de ces deux mutagènes et leur impact sur les caractères contribuant au rendement et les paramètres biochimiques.	<ul style="list-style-type: none"> • EMS (10, 20, 30 et 40 mM) • ⁶⁰Co (100, 200, 300, and 400 Gy). • 100 graines de chaque traitement ont été mises en bouteille entre les plis de papier filtre et conservées pour la germination dans l'obscurité à une température ambiante (25 +2 °C) dans des boîtes de Petri. • 300 graines de chaque traitement ont été semées dans le champ expérimental. 	<ul style="list-style-type: none"> • La réduction du pourcentage de germination des graines était plus évidente dans les traitements à l'EMS que celle des rayons gamma.

<p>Induced genetic variability in chickpea (<i>cicer arietinum</i> L.) frequency of morphological mutations</p>	<p>Tariq Mahmud Shah¹, Babar Manzoor Atta¹, Javed Iqbal Mirza² And Muhammad Ahsanul Haq¹</p> <p>2011</p>	<p>¹Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), Jhang Road, Faisalabad, Pakistan ²Institute of Pure and Applied Biology, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan</p>	<p>Etude de la fréquence des mutations morphologiques induites par les mutagènes physiques (rayons gamma) et chimiques (EMS) dans la population M₂ deux desi (Pb2000, C44), un kabuli (Pb1) et un desi x kabuli (gén. 40 CH91) de pois chiche</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 200, 300, 400, 500, et 600 Gy • EMS (0.2%, 0.3% et 0.4%). • La radio-sensibilité, la DL 50 et les doses de traitements physiques et chimiques ont été déterminées (Shah <i>et al.</i>, 2008). 	<ul style="list-style-type: none"> • La fréquence la plus élevée de mutations morphologiques a été observée lors d'une irradiation gamma à 300 Gy. (4.11%) suivi par 0.4% EMS (2.08%) de genotype desi C44. • Les rayons gamma et les traitements EMS diffèrent par leur spectre / fréquence de mutation.
<p>Variability and Correlations Studies for Total Iron and Manganese Contents of Chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) High Yielding Mutants</p>	<p>Mohammad Imran Kozgar, Samiullah Khan and Mohd Rafiq Wani, 2012. American Journal of Food Technology, 7: 437-444.</p>		<p>La création de la variabilité génétique suivie du criblage et de la sélection des meilleures plantes est une cible majeure pour le pois chiche. Effets étudiés sur les composants de variation pour le rendement / plante, les teneurs totales en Fe et Mn de la graine.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ⁶⁰Co : 100, 200, 300, 400 Gy • EMS : 0.1, 0.2, 0.3, 0.4% • Combinaison: 100 Gy+0.1, 100 Gy+0.2, 200 Gy+0.1, 200 Gy+0.2%, • Semences de variété de pois chiche Desi. • Trois cents graines ont été utilisées pour chaque traitement. 	<ul style="list-style-type: none"> • Six mutants à haut rendement ont été isolés dans la génération M₂ et leurs teneurs en Fe et Mn ont été évaluées.

Annexe 3. Photos illustrant l'essai au champ de la génération M_1 (Superficie totale de l'essai est de 700 m^2). (A) photo après le semis, (B) photo en plein stade formation des gousses.



Annexe 4. Schéma du dispositif expérimental de la génération M₂ (bloc aléatoire complet ; 3 blocs).



Annexe 5. Répartition des 135 familles M₂ de pois chiche sur les 3 blocs.

Rep 1 Les cellules contiennent des numéros des lignes en haut et des familles en bas.

Rep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ligne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	77	80	47	58	106	18	4	51	113	67	54	32	28	78	43
2	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	9	25	61	62	107	69	5	105	79	130	37	16	103	118	83
3	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
	73	17	116	13	7	76	93	99	100	46	15	74	84	104	52
4	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	41	90	64	2	98	39	1	129	66	122	120	30	124	81	131
5	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
	57	14	112	86	22	42	27	126	3	123	125	6	71	95	72
6	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
	55	33	121	96	59	132	97	110	88	75	56	101	109	8	68
7	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
	36	85	38	87	102	29	21	26	134	70	92	50	24	65	63
8	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
	119	133	31	117	114	53	44	108	82	115	111	91	89	94	12
9	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135
	34	40	11	135	49	20	23	48	19	127	35	10	60	45	128

Rep 2 Les cellules contiennent des numéros des lignes en haut et des familles en bas.

Rep	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Ligne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
	39	133	118	87	64	135	71	104	119	42	22	124	21	99	98
2	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165
	93	45	47	106	50	86	40	121	56	89	109	19	88	77	76
3	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
	68	43	128	107	72	65	38	80	23	2	52	30	111	51	25
4	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195
	14	41	44	130	8	79	59	69	125	85	60	48	117	26	123
5	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
	92	84	9	3	102	12	120	116	70	11	15	95	105	58	74
6	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225
	90	63	18	13	129	10	46	100	83	81	57	35	28	94	55
7	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
	82	32	75	49	53	91	73	126	62	17	6	7	67	115	134
8	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255
	1	127	101	97	131	34	4	96	24	5	66	33	78	16	54
9	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
	61	31	108	122	114	20	27	132	37	112	103	36	113	29	110

Rep 3 Les cellules contiennent des numéros des lignes en haut et des familles en bas.

Ligne	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
1	271 98	272 82	273 32	274 92	275 7	276 105	277 113	278 119	279 16	280 43	281 73	282 102	283 44	284 132	285 46
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	286 116	287 95	288 31	289 125	290 114	291 52	292 1	293 10	294 124	295 94	296 115	297 85	298 100	299 101	300 120
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	301 107	302 79	303 57	304 20	305 37	306 112	307 86	308 81	309 33	310 35	311 50	312 69	313 71	314 63	315 62
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	316 129	317 30	318 89	319 28	320 47	321 122	322 36	323 75	324 26	325 76	326 91	327 45	328 22	329 64	330 80
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	331 111	332 49	333 58	334 25	335 74	336 106	337 4	338 9	339 34	340 131	341 42	342 68	343 117	344 60	345 78
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6	346 5	347 59	348 12	349 93	350 8	351 67	352 134	353 6	354 61	355 99	356 11	357 27	358 55	359 65	360 70
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7	361 128	362 66	363 110	364 48	365 84	366 87	367 13	368 133	369 83	370 53	371 54	372 41	373 135	374 127	375 40
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8	376 18	377 130	378 121	379 56	380 97	381 126	382 96	383 39	384 123	385 38	386 109	387 77	388 72	389 51	390 14
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9	391 24	392 15	393 103	394 23	395 19	396 108	397 90	398 88	399 104	400 29	401 17	402 118	403 3	404 2	405 21
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Annexe 6. Photos illustrant l'essai au champ de la génération M₂ (superficie totale de l'essai est de 884 m²). (A) Couverture de la parcelle de l'essai juste après le semis contre les attaques des pigeons. (B) Étiquetage des familles et des plants au stade levée.



Annexe 6. Photos illustrant l'essai au champ de la génération M₂, (C) stade pleine floraison, (D) stade maturité.



Annexe 7. Préparation de la solution de l'acétocarmin

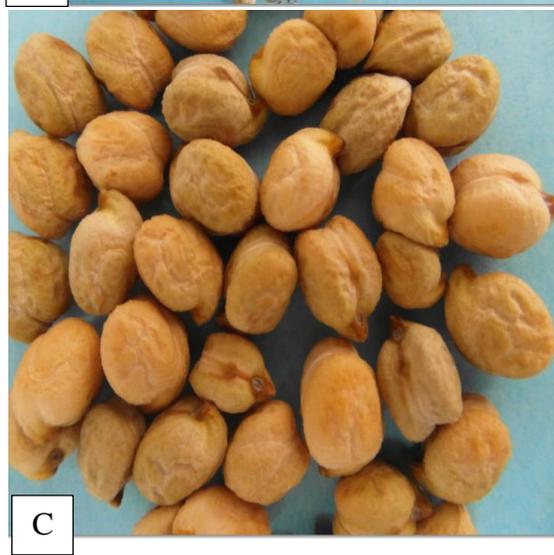
1. Pour la préparation de 100ml de solution nous avons besoin des quantités suivantes :

- 5 g de Carmine
- 55 ml d'eau distillée
- 45 ml d'acide acétique

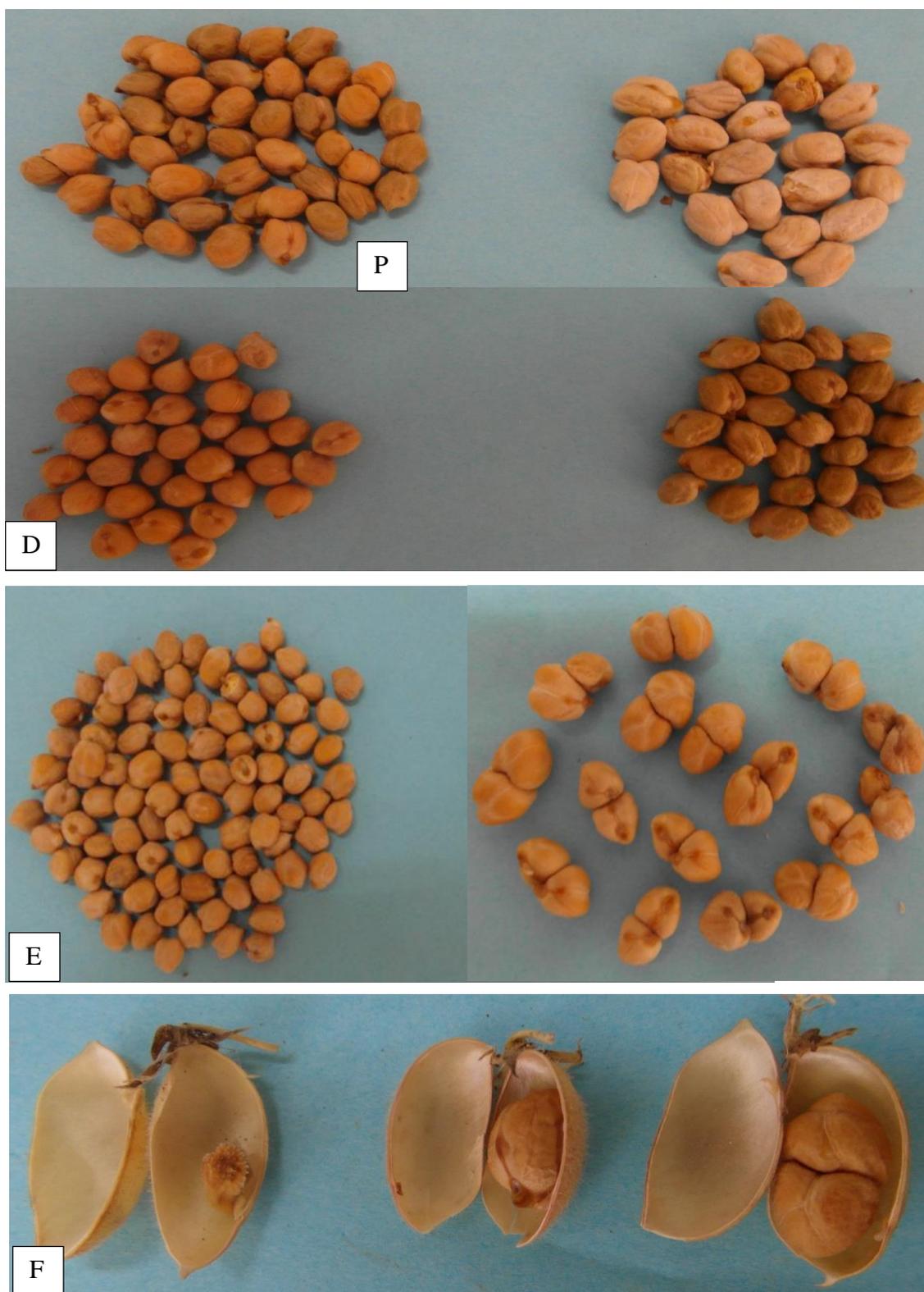
2. Étapes de préparation de la solution de l'acétocarmin :

1. Mixer le mélange.
2. Chauffer jusqu'à ébullition.
3. Laisser refroidir.
4. Filtrer le mélange.

Annexe 8. Évaluation de la génération M₂ de pois chiche; (A) plant M₂, (B et C) graines et gousses de plant M₂.



Annexe 8. Évaluation de la génération M₂ de pois chiche; (D) graines M₂ avec des couleurs différentes par rapport aux graines du parent (P), (E) graines simple et graines double, (F) gousse avec deux graines, une graine et graine échaudée.



Annexe 9. Protocole d'extraction d'ADN à faible coût avec l'utilisation de la poudre de silice

❖ Matériel, produits chimiques et enzymes utilisés :

- Vortex
- Billes métalliques
- Tubes Eppendorf (1,5 et 2 ml)
- Celite 545 poudre de silice (Celite 545-AW reagent grade)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) pour biologie moléculaire 99%
- Sodium acetate anhydrous
- NaCl (Sodium chloride)
- RNase A
- Ethanol absolu
- Nuclease-free H₂O (eau ultrapure distillée)
- Guanidine thiocyanate
- Micro centrifugeuse pour tubes (1.5mL, 2.0mL)
- Micropipettes (1000µL, 200µL, 20µL)
- Portoirs pour tubes

❖ Protocole suivi :

1. Collecte de tissus : des échantillons de feuilles sont collectés à partir des plantules de pois chiche cultivés dans la serre à l'aide d'un ciseau désinfecté avec de l'éthanol, et les mettre rapidement dans des enveloppes en papier étiqueter.
2. Immédiatement après collecte, mettre ces enveloppes contenant les échantillons de feuilles dans un récipient contenant du silica gel de. Sceller le récipient.
3. Mettre le tissu séché dans des tubes de 2ml contenant chacun 3 billes métalliques et libellés avec le numéro de l'échantillon.
4. Pour le broyage des tissus on utilise le vortex, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.
5. Ajouter 800 µl de tampon de lyse et 4µl RNase A (10 microgrammes par millilitre) dans chaque tube.
6. Bien mixer pendant environ 2 minutes avec le vortex jusqu'à ce que la poudre est entièrement hydratée et mélangée avec le tampon.
7. Incuber 10 min à température ambiante.
8. Ajouter 200 µl 3M acétate de sodium (pH 5,2). Mélanger par inversion des tubes et incuber sur la glace pendant 5 min.
9. Centrifuger 13 200 tr / min 5 / RT.

10. Etiqueter les tubes avec des aliquotes de solution liante de silice (silica binding solution ou SBS), (SBS, 700 microlitres).
11. Transférer le liquide dans les tubes correctement étiquetés contenant SBS. Suspendre complètement la poudre de silice au vortex et par inversion de tubes (20 sec).
12. Incuber 15 min à température ambiante (sur un agitateur à 400 tours par minute et / ou par inversion des tubes de temps en temps).
13. Centrifuger 13 200 tr / 3 min / RT.
14. Enlever le surnageant avec une pipette et jeter le (l'ADN est lié à la silice).
15. Ajouter 500 microlitres de tampon de lavage fraîchement préparée à chaque tube.
16. Suspendre complètement la poudre de silice au vortex et par inversion des tubes (env. 20 sec).
17. Centrifuger 13 200 rpm pendant 3 minutes à température ambiante pour obtenir un culot de la silice. Retirer le surnageant et de garder le culot.
18. Répéter les étapes 17-20.
19. Centrifuger pendant 30 secondes le culot et éliminer tout résidu de l'éthanol avec une micropipette.
20. Ouvrir le couvercle des tubes et les placer dans une hotte pendant 30 minutes (Cela peut être fait pour une période plus longue sur la paillasse).
21. Ajouter 200 µl de tampon TE à chaque tube pour éluer l'ADN.
22. Suspendre complètement la poudre de silice au vortex et inversion de tubes (env. 20 sec).
23. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
24. Centrifuger à 13200 rpm pendant 5 min à température ambiante pour obtenir un culot de la silice.
25. Libeller des nouveaux tubes de 1,5 ml avec les numéros des échantillons.
26. Recueillir le liquide contenant de l'ADN génomique et le placer dans les nouveaux tubes de 1,5ml.
27. L'ADN peut être conservé temporairement à 4 ° C avant de vérifier la qualité et la quantité.

Annexe 10. Protocole d'extraction d'ADN avec le kit commercial Qiagen.

Isolement de l'ADN génomique à partir de feuilles fraîches ou bien congelées (Conserver à -80 ° C) :

- ❖ Matériel, produits chimiques et enzymes utilisés :
 - Kit commercial Qiagen
 - Broyeur de tissu ou bien mortier et pilon
 - Azote liquide,
 - Bain-marie (65 ° C),
 - Billes métalliques
 - Tubes Eppendorf (1,5 et 2 ml)
 - Micro centrifugeuse pour tubes (1,5mL, 2,0mL)
 - Micropipettes (1000µL, 200µL, 20µL)
 - Portoirs pour tubes

Collecte de tissus : des échantillons de feuilles sont collectés à partir des plantules de pois chiche cultivés dans la serre à l'aide d'un ciseau désinfecté avec de l'éthanol, et mis rapidement dans des tubes Eppendorfs de 2ml (contenant des billes métalliques pour faciliter le broyage). Ces tubes sont plongés aussi rapidement que possible après étiquetage dans l'azote liquide.

- ❖ Le protocole suivi est celui de DNeasy Plant Handbooks Mini Kit Qiagen.
- ❖ Conservation de l'ADN génomique obtenu à 4 ° C pour une utilisation immédiate ou à -20 ° C pour le stockage à long terme.

Annexe 11. Les principales étapes de séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées avec l'utilisation du protocole du Laboratoire d'Amélioration des Plantes et de Génétique PBGL standard.

Les principales étapes sont décrites ci-dessous :

1. Dilution des amorces à 100 μM pour le pré-séquençage.
2. Amplification pré-séquençage : Amplification PCR avec le même protocole et le même programme (70NOKILL.cyc) utilisés dans la partie PCR.
3. Vérification de la concentration d'ADN sur gel agarose 1% avec l'utilisation d'un marqueur de taille (Low DNA mass ladder).
4. Dilution pour les échantillons ou on a une forte concentration
5. Purification de l'ADN de la réaction PCR pour le séquençage par l'utilisation de deux méthodes soit par digestion enzymatique avec l'exonucléase I et le shrimp alcaline phosphatase, en utilisant le programme de la machine PCR ExoSAP (Incubation à 37 °C pendant 15 min, Inactivation des enzymes par incubation à 80 °C pendant 15 min et refroidissement à 8°C) ou en utilisant le kit Qiagen (kit de purification PCR).
6. Vérification de la qualité et la de la quantité en utilisant Qubit 2,0 fluorimètre.
7. Étiquetage des échantillons et préparation de la liste correspondante et les déposer au centre de séquençage (génomique LGC).
8. Analyse de données des séquences par le séquenceur (séquences et chromatogrammes).

PUBLICATION
