



Analyse génomique chez le triticales (8x) et leurs géniteurs (blé et seigle) par les techniques C-banding, N-banding et Hybridation *in situ* : Identification de la translocation 2BL/7RS

Dounia HAMMOUDA¹, Nadra KHALFALLAH² et Houda BADRI MOHAMMED³

^{1,2}Université des Frères Mentouri Constantine1, Route de Ain El bey-25000 Constantine Algérie.

Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales. Département de Biologie Écologie Végétale. Faculté des Sciences.

³National Research Center, Division of Genetics Engineering and Biotechnology. Department Genetics and Cytology, Cairo, Egypt.

Laboratoire³ de Génétique et Cytogénétique. Faculté des Sciences.

*Auteur correspondant ; E-mail : hammoudadounia@yahoo.fr , Tél : (+213) 0772610970

Original submitted in on 1st August 2017. Published online at www.m.elewa.org on 31st August 2017
<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v116i1.6>

RESUME

Objectif : L'objectif principal de cette étude est d'analyser l'hétérochromatine (séquences d'ADN non codante et riches en bases CG) des génomes d'un triticales primaire et leurs géniteurs, blé tendre et seigle d'une part, d'autre part de localiser les régions organisateurs nucléolaires (N.O.R) , les gènes ribosomiques (5S et 45S).

Méthodologie et résultats : L'analyse en bandes C, des génomes de l'hybride montrent un marquage différent par rapport à ceux des géniteurs respectifs. Dans les génomes A, l'hybride (Mahon-démias x RC9) est moins hétérochromatique que le géniteur ♀ (Mahon-démias). Par contre, les génomes B et D de l'hybride (Mahon-démias x RC9) montrent une richesse en hétérochromatine par rapport à leurs homologues de géniteur ♀. Le génome R de l'hybride (Mahon-démias x RC9) est presque similaire à son homologue de géniteur ♂ (RC9), à l'exception le chromosome 2BL/7RS. La localisation des régions organisatrices (N.O.R) est conforme à celle décrite par les auteurs, marquées sur les chromosomes 1R- 2R- 3R et 6R du seigle et sur 1B du blé et sur 1R- 2R- 3R- 6R -1B du triticales. Chez le seigle (RC9), l'analyse moléculaire, montre que, le locus 5S est colocalisé avec le locus 45S situé sur le chromosome 5R. Les loci 45S sont localisés sur les chromosomes 1R, 3R, 5R et 7R. Ils correspondent aux organisateurs nucléolaires. Par contre, chez le triticales, les loci 5S sont localisés sur les chromosomes 2A, 5B et 7RS/2BL. Les loci 45S sont situés sur les chromosomes 1R, 3R et 7RS/2BL. Contrairement à la bibliographie, le chromosome 5R présente deux loci 5S et 45S colocalisés sur le télomère du bras court. Ce résultat suggère que la variété du seigle qui a servi de géniteurs acquis au cours de sa sélection des ADN qu'elle transmette à sa descendance d'une manière stable. La translocation 7RS/2BL mise en évidence par le C-banding est confirmée par la FISH.

Conclusion et application des résultats : Nos résultats révèlent l'existence de polymorphismes intervariétaux et interspécifiques chez le seigle et le triticales, ainsi, la présence des chromosomes B de forme télolocentriques ou isochromosomes et de structure hétérochromatiques et / ou euchromatiques. En conclusion, nous établissons

une cartographie cytogénétique moléculaire des chromosomes marqueurs et gènes ribosomiques de notre matériel végétal.

Mots clés : Bandes C, cartographie cytogénétique, chromosomes B, gènes ribosomiques, N.O.R,

ABSTRACT

Objective : The main objective of this study is to analyze heterochromatin (DNA sequences non-coding rich in CG base) genomes of a primary triticales and their progenitors, wheat and rye one hand, other hand to Localize the nuclear organizer regions (NOR) and ribosomal genes (5S and 45S).

Methodology and results: The Analysis of C bands of genomes the hybrids in comparison with their genitors displayed a different marking. In the genomes A, hybrid (Mahon-demiasxRC9) is less heterochromatic than the genitor ♀ (Mahon-demias) .the genomes B and D of the hybrid (Mahon-demias xRC9) show a richness in heterochromatin relative to their homologues of the ♀ genitor. Nevertheless, in R genome of hybrid (Mahon-demias xRC9) is almost similar to its ♂ genitor (RC9), with the exception of the 2BL / 7RS chromosome. In the genitors and in the hybrids, the organising regions (NOR) marked on the chromosomes 1R, 2R, 3R and 6R of rye and on the chromosome 1B of wheat and on the chromosomes 1B, 1R, 2R, 3R, 6R of triticales, showed the a same localisation compared with that described by authors. Molecular analysis shows that, 5S locus is collocated with the 45S locus on chromosome 5R. The 45S loci are located on the 1R, 3R, 5R and 7R chromosomes. They correspond to the nuclear organizer regions (N.O.R). While in triticales, 5S loci are located on chromosomes 2A, 5B and 7RS / 2BL. The 45S locus is located on chromosomes 1R, 3R and 7RS / 2BL. Contrary to the bibliography, chromosome 5R shows two loci 5S and 45S colocalized on the telomer of the short arm. This result suggests that the variety of rye that served as genitor acquired during its selection of rDNA that it transmits to his descendants in a stable manner. Translocation 7RS / 2BL evidenced by C-banding is confirmed by FISH.

Conclusion and application of results: The results indicate the existence of intervarietal and interspecific polymorphisms in rye and triticales, as well as the presence of chromosomes B of telocentric form or isochromosomes a heterochromatic and / or euchromatic structure. In conclusion, we establish a molecular cytogenetic mapping of marker chromosomes and ribosomal genes of our vegetal material (genitors and hybrid)

Key words: B chromosomes, C-bands, molecular cytogenetic mapping, N.O.R, Ribosomal genes

INTRODUCTION

Le triticales primaire (8x) est un amphiploïde, résultant de croisement inter spécifique entre le blé tendre et le seigle. Il a eu un intérêt plus scientifique qu'agronomique (introgressions des gènes de seigle chez le blé par croisement blé x triticales). Cette céréale constitue une source de nombreux gènes à forts potentiels (rendement élevé, résistance aux maladies, tolérance au froid et à la sécheresse avec un meilleur apport en acides aminés). Elle assure en outre, un excellent rendement en paille. L'introduction du génome R dans le blé permet l'identification de plusieurs translocations observées par des auteurs (Lukaszewski & Gustafson, 2000 ; Badaeva *et al.* 2007 ; Schwarzacher. *et al.*, 2011). En cytogénétique, la création du triticales s'est beaucoup

appuyée sur les progrès réalisés. Dans ce domaine, ce complexe a fait l'objet d'études approfondies :

- L'étude de l'affinité d'homologie entre le blé-seigle (Seal & Bennett, 1982).

- La détection des mutations chromosomiques de types, translocations et inversions (Gill, 1997 ; Lapinski & Schwarzacher, 1998 ; Silcova *et al.* 2007; Kang *et al.*, 2011; Rahmatov, 2012)

-Investigation de l'origine du génome B du blé (Apples, 1982).

-Identification des chromosomes des lignées d'addition ou de substitution chez le blé et le triticales (Otler, 2005)

-Détermination du niveau de ploïdie et Caractérisation des différents caryotypes des hybrides Interspécifiques (Ammar *et al.*, 2004,

Feldman et al., 2005). Ce travail entre dans le cadre de recherche portant sur les ressources génétiques du triticales. Pour lever un voile sur l'organisation et la distribution de l'hétérochromatine des génomes d'un triticales primaire octoploïde, d'une part, d'autre part la localisation des régions organisateurs nucléolaires (N.O.R), et les gènes ribosomiques (5S

et 45S), nous nous sommes attachée à explorer des mécanismes cytogénétiques par les techniques N-banding, C-banding et moléculaire par Hybridation in situ. L'étude est menée sur les parents (male diploïde et femelle hexaploïde) et leur descendance, un polyploïde (8x).

MATERIELS ET METHODES

Le matériel végétal sous forme de graines porte sur les géniteurs (blé tendre géniteur ♀ et seigle géniteur ♂), leurs hybrides (triticales primaires génération F5). La liste

des espèces et des variétés étudiées et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: Liste et origines des espèces étudiées

Espèces	Variété/lignée	Ploidie et F.G	Source	Origine
<i>Triticum aestivum</i> L. (parent ♀)	Mahon-démias	6x AABBDD	I.T.G.C	Iles Baléares
<i>Sécale céréale</i> L. (parent ♂)	RC9	2x RR	I.T.G.C	France
x-Tritico-secale Wittmack	Mahon-démiasxRC9	8x AABBDDRR	I.A.B	Algérie

I.T.G.C: Institut technique de grandes cultures Constantine

I.A.B: Institut d'Agronomie de Batna

Les techniques du marquage (cytogénétiques et moléculaire) appliquées à notre matériel sont celles décrites par Gill et al. (1991), Shimelis (2005) et Badeava et al. (2007); pour le **C-banding**, celles utilisées par Bushreen&Vahidy (2008) pour le **N-banding** et celle décrite par Heslop-Harrison (1992) pour l'**Hybridation insitu** par Fluorescence. Les pointes racinaires sont prétraitées à l'eau glaciale pendant 27h et sont fixées dans la solution 3V-1V (3 éthanol -1 acide acétique). Après les écrasements et les observations, toutes les lames sont décollées à l'azote liquide à (-196°C). Les meilleures préparations sont soumises aux différentes étapes des techniques employées :

C-banding: les différentes procédures sont décrites dans le tableau 2.

N-banding

- Hydrolyse des lames à l'acide acétique 45 % à chaud à 60°C pendant 10 minutes.

- Dénaturation – Renaturation de l'ADN, Les lames sont plongées dans une solution 1 M NaH₂PO₄ à 92±2°C pendant 2 minutes, à pH = 4.2, puis sont rincées à l'eau distillée durant 2 minutes.

- Coloration des préparations dans une solution tampon 0.1 M phosphate Sorensen, à pH=6.8 et 4-6 % de Giemsa pendant 30 à 45 minutes.

Hybridation insitu(F.I.H)

Les sondes **45S** et **5S r DNA** sont isolées à partir de séquences hautement répétées du seigle, amplifiées à 120pb. Dans la méthode d'hybridation, nous avons utilisé la biotine, pour marquer les sondes.Ce marquage moléculaire a été appliqué, seulement sur les chromosomes de l'hybride (Mahon-démias x RC9) et son géniteur ♂ *Secale céréale* (variété RC9).

Tableau 2 : Les différentes étapes du C-banding appliquées aux trois espèces étudiées.

Espèces	<i>Secale céréale</i> L.	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>x-Triticosecale Wittmack</i>
Étapes			
Délamellation	Le décollement des lamelles se fait à l'azote liquide (-196°).		
Déshydratation	Toute une nuit.		
Hydrolyse	Aucune	Les lames sont plongées dans l'HCl0.2 M à 60°C, 2 mn.	Aucune
Dénaturation Dans une solution saturée de baryte (formule): 50 g/l	10 mn à 60°C.	7 mn à température ambiante.	6min à température 45°C
Rinçage	-Eau de robinet 30mn jusqu'à clarification.	Eau distillée et l'eau du robinet jusqu'à clarification complète.	
Renaturation Les lames sont plongées dans une solution Fraîche 2xSSC à pH 7	Durant 1h à 60°C.		15min à 60°C, puis, pendant 1h30 min à 52°C
Coloration au Giemsa Dans une solution Tampon Sorensen phosphate à pH 6.8	6 % pendant 45' mn.	4 % pendant 30 mn	5% pendant 40 mn
Montage	les lames sont laissées sécher toute une nuit, puis sont fixées définitivement avec un liquide de montage le « Depex »		

RESULTATS

Identification et caractérisation des génomes par les bandes C : L'identification et La distribution de l'hétérochromatine constitutive (séquences d'ADN non codantes riches en bases CG) chez les génomes (A, B, D

et R) d'un triticales (*x-Triticosecale Wittmack*) et ceux de ses parents (*Triticum aestivum* L., AABBDD) et (*Sécale céréale* L., RR) sont analysées et comparées par les bandes C (Figure1).

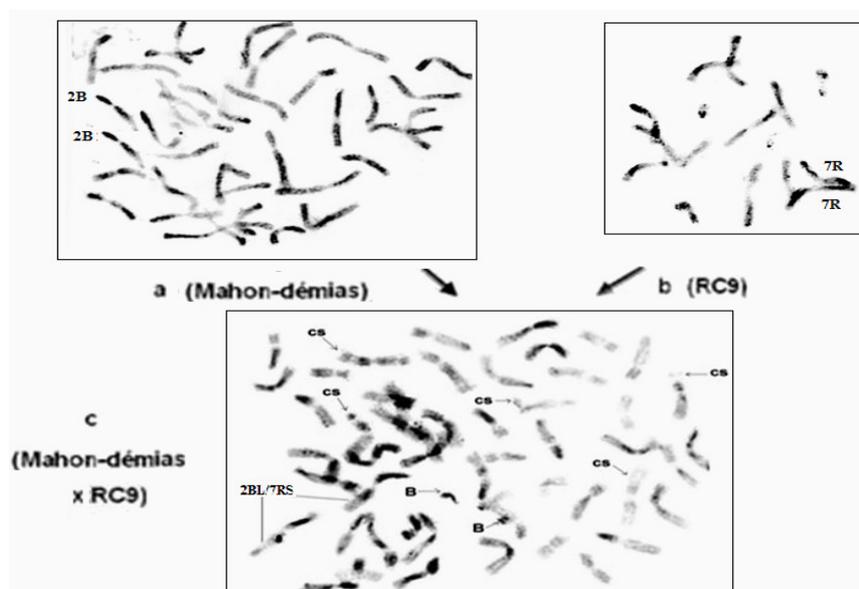


Figure1 : Plaques métaphasiques marquées par le C-banding:(a) et (b) parents (*Triticum aestivum* L., *Secale céréale* L.), (c) Hybride (*x-TriticosecaleWittmack*).

Cette analyse révèle beaucoup de variations en bandes polymorphes C+. En effet, le nombre de bandes et leur emplacement sur le chromosome, ainsi que leur intensité diffèrent d'une espèce à une autre (Figure1 Figure2). Ces différentes bandes hétérochromatiques sont de types télomériques, centromériques et intercalaires. Chez le **triticales octoploïde** (hybride, F5), l'analyse en C-banding des différents génomes de Mahon-démias x RC9 révèle d'importantes variation dans le zonage des chromosomes (C+) (Figure2 B):

Dans le génome A, tous les chromosomes révèlent de fines bandes. Dans le génome B, les chromosomes 2B, 3B, 5B, 6B et 7B présentent d'épaisses bandes centromériques.

Le génome D montre de nombreuses bandes sombres intercalaires marquées sur tous les chromosomes. Le Génome R, révèle des épaisses bandes centromériques marquées sur les chromosomes 5R, 6R, 7R (bras courts) et 2BL/7RS.

Chez le **blé tendre** (parent ♀, F6), l'analyse en bandes C des chromosomes de la variété Mahon-démias montre une variation dans la distribution des bandes. Dans le génome A, des bandes sont révélées sur les chromosomes 1A- 3A- 4A- 6A et 7A. Les chromosomes 4A et 7A présentent le maximum de bandes C (Figure. 2A).

Dans le génome B, nous constatons l'absence d'épaisses bandes centromériques(C-) sur les chromosomes 3B (bras long) - 4B - 5B - 7B (bras court). (Figure 2A).

Dans le génome D, les bandes sombres sont révélées sur tous les chromosomes à l'exception du 3D (Figure 2A).

Chez le **seigle** (parent ♂, F6), le génome R de la variété RC9 a montré le maximum de bandes(C+), marquées sur les chromosomes 2R, 5R, 6R, 7R. Les chromosomes 1R 3R 4R présentent de fines bandes (Figure. 2C).

Détection d'une translocation 2BL/7RS : Dans notre matériel, nous avons pu mettre en évidence une translocation 2BL/7RS grâce aux bandes C chez le triticales (Mahondémias x RC9) (Figure 3, Figure1).

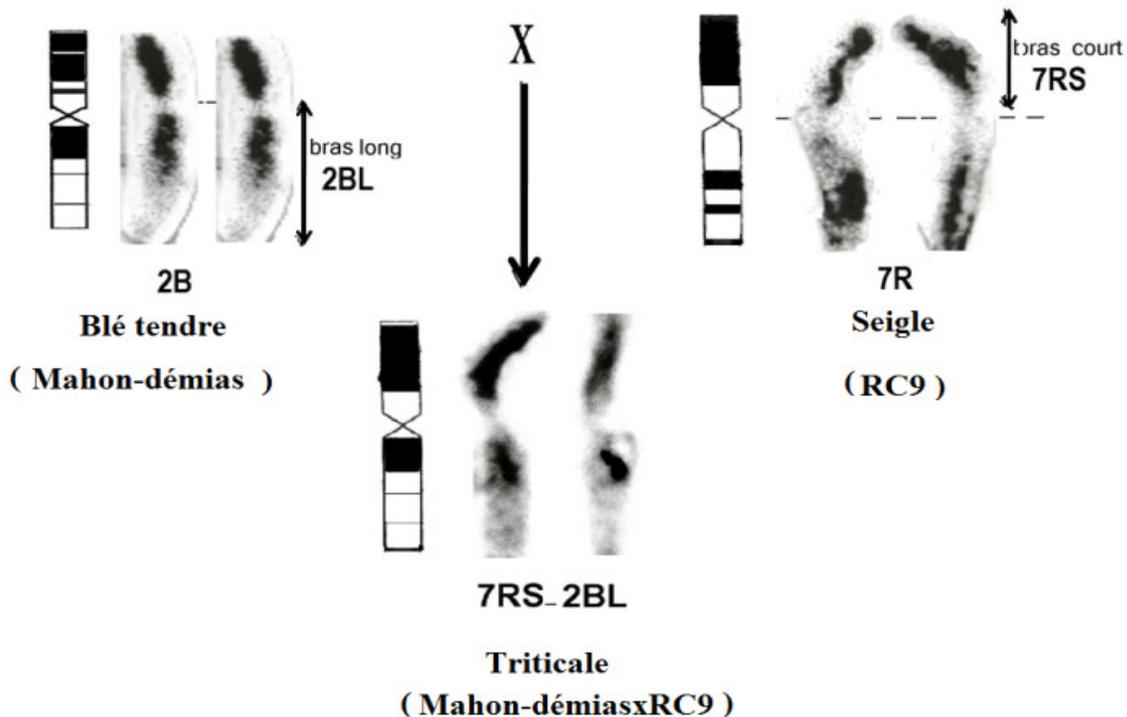


Figure 3: Translocation entre le chromosome 2B du parent ♀ (blé tendre) avec le chromosome 7R du parent ♂ (seigle)

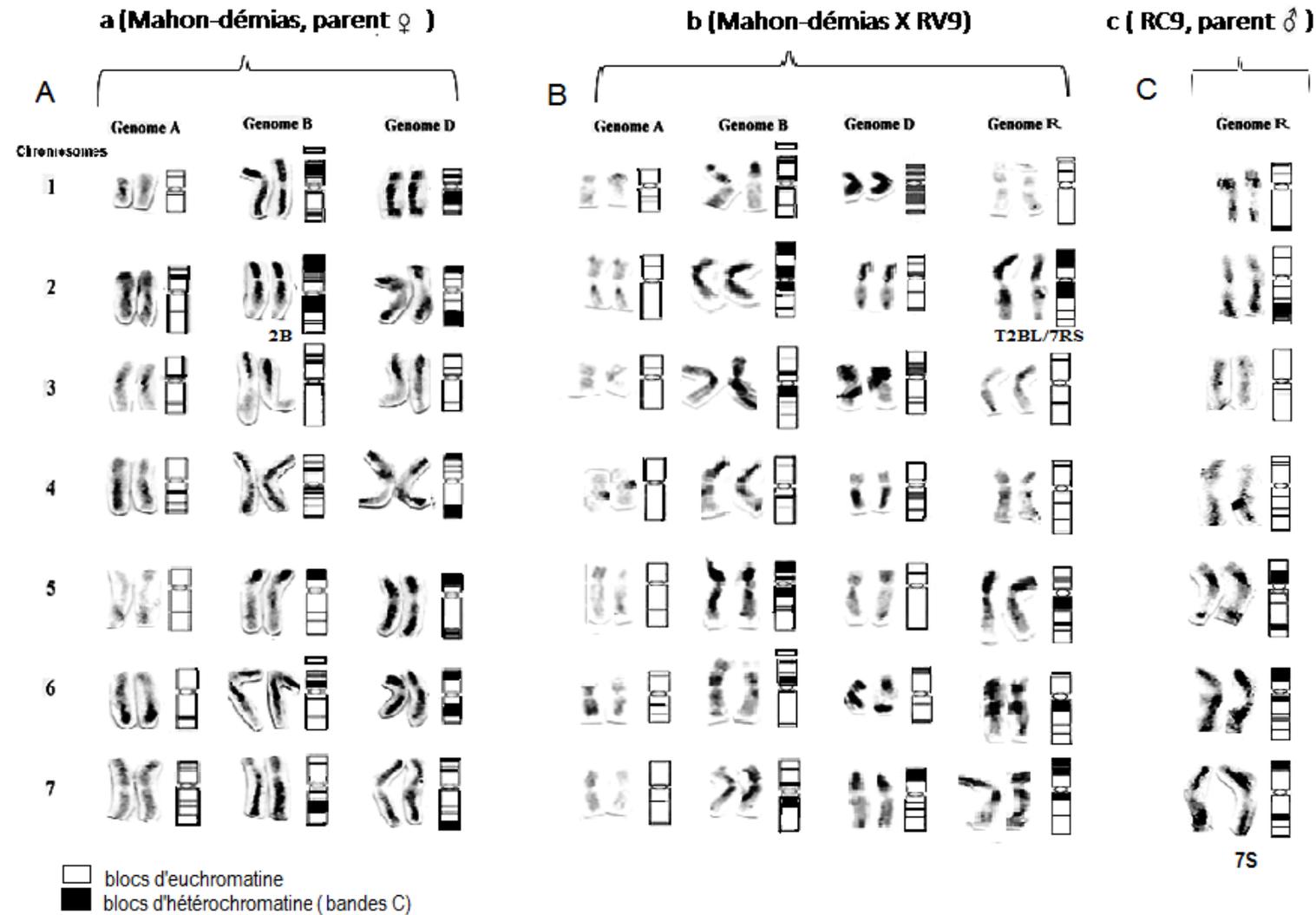


Figure 2 : polymorphisme hétérochromatique interspécifique (en bandes C) chez (a) *Triticum aestivum* L., (b) *x-Triticosecale* Wittmack (8x), (c) *Sécale céréale* L. les constriction secondaires sont localisées sur les chromosomes 1B et 6B des génomes B.

Localisation des organisateurs nucléolaires par le N-banding : Nous avons pu localiser des régions organisatrices nucléolaires (N.O.R), marquées sur les chromosomes 1B- 2R- 3R- 6R de l'hybride Mahon-démiasxRC9 (Figure4c), sur le chromosome 1B du parent blé tendre (Figure4a) et sur les chromosomes 1R- 2R- 3R- 6R du parent seigle (Figure4b).

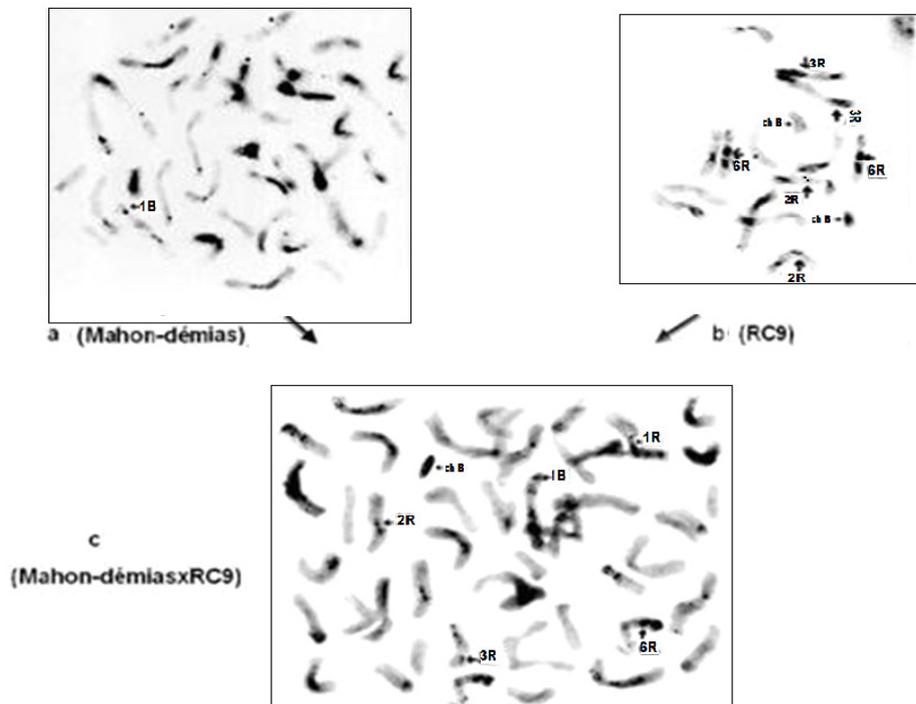


Figure 4 : Plaques métaphasiques marquées par le N-banding:(a) et (b) parents (*Triticum aestivum* L., *Secale céréale* L.), (c) Hybride (*x-Triticosecale* Wittmack). Les organisateurs nucléolaires (N.O.R) sont marqués sur le chromosome 1B (a), sur les chromosomes 1R- 2R- 3R- 6R (b) et sur les chromosomes 1B- 2R- 3R- 6R (c).

L'analyse des bandes N chez tous les génomes des trois espèces étudiées (parents et hybride) montre une richesse en hétérochromatine (N+). Également, des chromosomes B de type hétérochromatique et / ou euchromatique sont détectés chez les deux espèces (Figures4b, 4c).

Localisation et distribution des gènes ribosomiques : L'analyse par l'hybridation *in situ* (F.I.S.H) sur le seigle (variété RC9) et le triticales octoploïde (Mahon-démiasxRC9). (Figure5), permet de constater que les

deux espèces se distinguent entre elles par le nombre et la position des gènes ribosomiques 5S et 45S qui sont soit co-localisés, soit distribués sur des chromosomes différents. Chez le seigle (variété RC9), cinq à sept loci majeurs d'ADNr sont observés. Le locus 5S est colocalisé avec le locus 45S situé sur le chromosome 5R (Tableau 3). Les loci 45S sont localisés sur les chromosomes 1R, 3R, 5R et 7R. Ils correspondent aux organisateurs nucléolaires (NOR) (Tableau 3, Figure 5a).

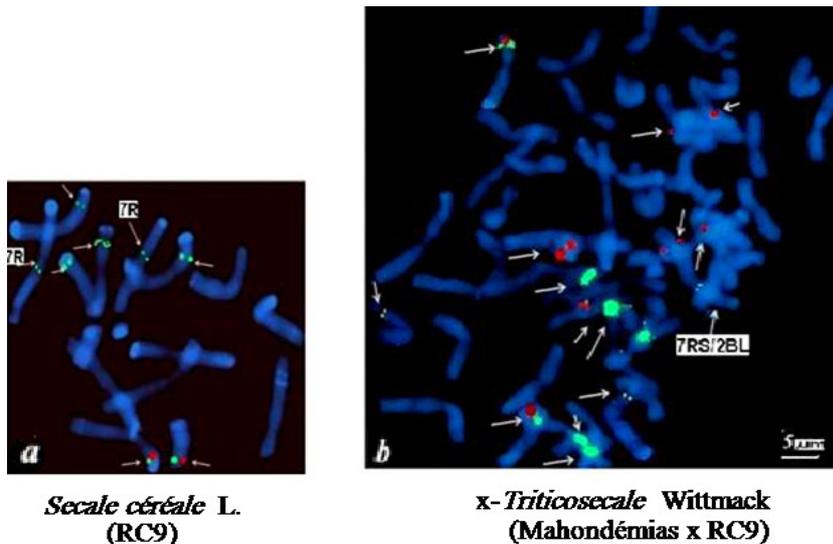


Figure 5 : Hybridation *in situ* (F.I.S.H) des espèces *Secale céréale* L. (a-variété RC9), et *x-Triticosecale* Wittmack (b-Mahon-démias x RC9). Les locis 5S sont marqués par le rouge et les loci 45S sont marqués par le vert.

Chez le seigle (variété RC9), cinq à sept locis majeurs d'ADNr sont observés. Le locus 5S est colocalisé avec le locus 45S situé sur le chromosome 5R (Tableau 3). Les locis 45S sont localisés sur les chromosomes 1R, 3R, 5R et 7R. Ils correspondent aux organisateurs nucléolaires (NOR) (Tableau 3, Figure 5a). Chez le triticales, les locis

5S sont localisés sur les chromosomes 2A, 5B et 7RS/2BL. Les locis 45S sont situés sur les chromosomes 1R, 3R et 7RS/2BL. Le chromosome 5R se caractérise par une colocalisation des locis 45S et 5S (Tableau 3, Figure 5b).

Tableau 3 : Localisation des gènes ribosomiques 5S (loci vert) et 45S (loci rouge) sur les chromosomes marqueurs du seigle et du triticales 8x.

Espèces	2n	Type chromosomique	5S loci (rouge)	45S loci (vert)	localisation
<i>Secale céréale</i> L. (RC9)	14	Submétacentrique- Métacentrique	5R	1R, 5R 7R, 3R	Télomère Centromère
<i>x-Triticosecale</i> Wittmack (MahonRC9)	56	Submétacentrique Métacentrique Métacentrique Métacentrique	5R-5B 7RS/2BL 2A	1R-5R 3R 7RS/2BL	Télomère Centromère centromère Télomère Télomère

DISCUSSION

Nous remarquons une grande hétérogénéité structurale entre les trois espèces étudiées. Les chromosomes des génomes (A, B, D et R) de l'hybride montrent un marquage différent par rapport à ceux des géniteurs respectifs :

Dans les génomes A, l'hybride (Mahon-démiasxRC9) est moins hétérochromatique que le géniteur ♀ (Mahon-démias) (Figures 2A, 2B). Par contre, les génomes B et D de l'hybride (Mahon-démiasxRC9) montrent une richesse

en hétérochromatine par rapport à leurs homologues de géniteur ♀ (Figures 2A, 2B). Le génome R de l'hybride (Mahon-démias xRC9) est presque similaire à son homologue de géniteur ♂ (RC9), à l'exception le chromosome 2BL/7RS (Figure 1C). Ces résultats concordent avec ceux de Hammouda & Khalfallah (2008), et qui confirment la richesse en hétérochromatine chez l'hybride et le géniteur male, en utilisant la technique du N-banding. Les résultats obtenus chez le seigle (RC9), en

comparaison à ceux des auteurs (Gill et al, 1986, 2009), présentent des bandes supplémentaires (C+) dans la totalité des chromosomes, témoignant d'une richesse en hétérochromatine constitutive. Par opposition, chez le caryotype de référence, les chromosomes se caractérisent par l'absence des bandes sombres centromériques et la présence des épaisses bandes télomériques et fines bandes intercalaires, le cas inverse chez nous. Chez le blé (Mahon-démias), nos résultats en confrontation à ceux des auteurs (Gill et al., 1991; Friebe & Gill 1994, Shimelis, 2005; Gill et al., 2009) montrent un marquage différent par rapport à celui de la variété standard *Chinese Spring* dans la distribution des bandes. Dans le génome A, les chromosomes 1A- 4A- 6A et 7A révèlent des bandes supplémentaires. Les chromosomes 3A et 5A sont presque similaires à ceux de *Chinese Spring*. Selon les mêmes auteurs, les bras 1AS- 3AL- 4AS et 6AS de la variété *Chinese Spring* ne sont pas marqués, alors que dans la variété Mahon-démias les bras 1AS - 6AS sont marquées par des fines bandes additionnelles (Hammouda & Kalfallah, 2008). Dans le génome B, nous distinguons l'absence d'épaisses bandes centromériques (C-) sur les chromosomes 3B - 5B et 7B de la variété Mahon-démias, par opposition à ceux de la variété *Chinese Spring*. D'après Friebe & Gill (1994), l'hétérochromatine du chromosome 4B apparaît instable. Une inversion pericentrique est détectée dans ce chromosome chez *Chinese Spring* (Endo & Gill, 1984, Endo et al., 2008). Dans le génome D, les chromosomes 1D - 4D - 5D - 6D et 7D présentent le maximum de bandes C (Hammouda & Kalfallah, 2008) Le chromosome 3D est similaire à celui du *Chinese Spring*. Deng-call et al. (1997) révèlent une variation des bandes C chez *Triticum tauschii* par rapport à *Chinese Spring* sur les chromosomes 2D, 5D et les bras 1DL -3D L -7DL. Toutes les variations révélées par le C-banding sont dues probablement à l'amplification ou à la réduction de la quantité des séquences d'ADN hautement répétées dans ces régions (Friebe&Gill, 1994). L'hétérochromatine constitutive bien que non codante (bandes C), joue un rôle important dans la régulation de l'expression du génome entier. Des réarrangements dans les séquences non codantes, supposés contribuer au processus de stabilisation génomique, ont été observés chez les polyploïdes synthétiques de Triticées (Feldman et al, 1997 ; Shaked et al, 2001). Les résultats du C-banding (parents et hybride) indiquent la présence des polymorphismes interspécifiques (Figure 2) et confirment l'existence d'une translocation 2BL/7RS chez la lignée Mahon-démiasxRC9 (Figure 3). D'après les auteurs (Badaeva et al., 2007), la répartition des bandes C sur les

chromosomes sert à identifier, très précisément, les segments chromosomiques mettant en évidence des réarrangements structuraux tels que les translocations et les inversions. Selon d'autres auteurs (Lukaszewski, 1993; Kubaláková et al., 2003), c'est justement la présence d'épaisses bandes hétérochromatiques dans les régions télomériques chez le seigle qui peuvent être impliquées dans des translocations observées chez les **hybrides «blé-seigle»**.

Que peut-on retirer de l'étude des translocations blé x seigle ?

Ces translocations (blé-seigle) sont importantes dans la sélection végétale. Elles sont largement utilisées par les sélectionneurs dans le monde entier, dans les plus exploitées sont 1BL/1RS (Heslop-Harrison et al., 1990, Lukaszewski, 1983, 2000; Timofeev, 1998; Badaeva et al., 2007, Rahmatov, 2012) et 2RL/2BS (Schwarzacher et al., 2011; Rahmatov, 2012). La localisation des régions organisatrices (NOR) est conforme à celle décrite par les auteurs (Schlegel & Gill 1984; Gill et al., 1991). D'après ces auteurs, les régions organisatrices nucléolaires sont marquées sur les chromosomes 1R (constriction secondaire)- 2R- 3R et 6R du seigle et sur les chromosomes 1B et 6B (constrictions secondaires) du blé (Figure 1, Figure 2). Toutes ces régions représentent l'hétérochromatine contenant les séquences d'ADN (GAA)_m (GAG)_n des satellites, portant les gènes responsable du codage des ARN ribosomiaux. Donc, ces bandes N peuvent être utilisées comme marqueurs additionnels pour la constriction secondaire du chromosome 1R le bras long du chromosome 2R, le bras court du chromosome 3R, le bras long du chromosome 6R et les constrictions secondaires des chromosomes 1B et 6 B (Hammouda & Kalfallah, 2008).

Rapport C+N+/C-N+ : Il est important d'apprécier la richesse en hétérochromatine (bandes C et bandes N) révélées par les techniques de marquage C-banding et N-banding. Chez le blé et le seigle, l'hétérochromatine peut être décrite comme C+N+ ou C+N- traduisant une variation hétérochromatique au sein de ces espèces. L'hétérochromatine C+N+ coïncide avec la localisation des séquences d'ADN (GAA)_n (GAG)_n des satellites (organiseurs nucléolaires) (Appels, 1982; Gill et al., 1991; Hammouda & Kalfallah, 2008). Notons que l'espèce *Hordeum sp* est C-N+ (Kakeda et al., 1991). Contrairement aux données de la littérature où le blé est C+N+, notre variété de blé tendre (Mahon-démias) peut être décrite comme C- N+ (absence des épaisses bandes centromériques dans le génome B). Elle présente donc une pauvreté relative en hétérochromatine essentiellement dans le génome B. A-t-elle subi une perte

d'hétérochromatine au cours de sa sélection ? Si c'est le cas, les zones vitales du génome B, n'étant plus protégées, sont exposées à d'éventuels réarrangements structuraux. Ce qui peut expliquer l'existence de la translocation 2BL/7RS chez le triticales 8x. La variété RC9 (seigle) et son hybride, Mahon-démias x RC9 (triticales 8x), se révèlent C+N+. La confrontation d'un génome C-N+ (femelle) avec un génome C+N+ (male) produit un hybride qui à la cinquième génération se révèle C+N+. L'hypothèse explicative serait que le génome de l'hybride s'est enrichi en hétérochromatine au fur et à mesure de sa stabilisation.

Importance des chromosomes B : D'après les auteurs (Ribeiro *et al.*, 2004) chez les plantes les chromosomes B sont, soit entièrement hétérochromatiques, comme chez *Secale céréale* L. soit entièrement "euchromatique" comme chez le maïs (Houben, 2011). Dans notre cas, les deux types sont détectés chez *Secale céréale* L. (variété RC9). Ces chromosomes B qui pourraient avoir une influence sur l'accumulation du taux l'hétérochromatine et jouent un rôle important dans l'adaptation du végétal aux conditions défavorables (Yakovlev, 1986; Bernard,

1997; Amirouche, 2007; Hammouda & Khalfallah, 2008, Houben *et al.*, 2011, Hammouda & Khalfallah; 2015). Ostashevsky (1996) montre que, l'addition des chromosomes "B" peut améliorer les régions organisatrices nucléolaires (N.O.R) du seigle. D'après Langdon *et al.* (2000), les chromosomes B du seigle contiennent l'équivalent de 10 % du contenu d'ADN d'hôte haploïde, mais les gènes majeurs ne sont pas localisés dans ce contenu.

Analyse moléculaire et cartographie cytogénétique moléculaire : Chez l'hybride (Mahxon-démiasxRC9), l'analyse comparative des locis rapport à ceux du géniteur male (RC9) montre un marquage similaire dans la localisation des gènes ribosomiques 5S et 45S, à l'exception du chromosome 7R porteur de la translocation (Figure 6). D'après les travaux (Gustafson *et al.*, 1990, 2000, Kubaláková *et al.*, 2003; Lukaszewski, 2008), deux locis 5S sont situés sur le 1R (centromère et télomère) alors que dans notre cas un seul le locus télomérique est observé sur ce chromosome (Figure 6). Cette observation conforme à celle de Gill (1994).

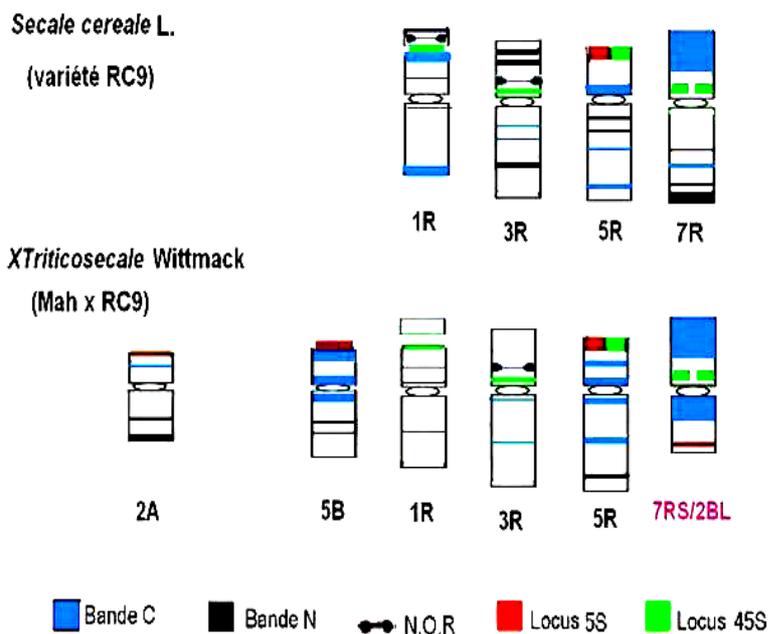


Figure 6 : Schéma illustrant la localisation de l'hétérochromatine (bandes C et N) et des gènes ribosomiques 5S et 45S pour le seigle (2x) et son hybride (triticales 8x).

A l'exception de Kubaláková *et al.*(2003), ces mêmes auteurs n'ont observé aucun locus situé sur le chromosome 5R alors que nous dénombrons deux locis 5S et 45S colocalisés en position télomérique sur ce

même chromosome (Figure 6). Contrairement à la bibliographie, dans le matériel étudié (géniteurs et hybride) le chromosome 5R présente deux locis 5S et 45S colocalisés sur le télomère du bras court. Ce résultat

suggère que les variétés de seigle qui ont servi de géniteurs dans notre matériel ont acquis au cours de leur sélection des ADNr qu'ils transmettent à leur descendance d'une manière stable. La translocation 7RS/2BL mise en évidence par le C-banding est confirmée par la FISH. Dans notre étude, les plaques métaphasiques marquées par le N-banding, C-banding et l'hybridation *in situ* du seigle (RC9) de l'hybrides (Mahondémias x RC9), montrent que l'hétérochromatine

(riche en GC) et les locis 5S et 45S d'ADNr sont de bon marqueurs chromosomiques qui ont permis d'identifier individuellement certaines paires chromosomiques. Nous pouvons proposer ces chromosomes marqueurs pour l'établissement d'une cartographie cytogénétique moléculaire de l'hétérochromatine constitutive de notre matériel. Les loci 45S correspondent aux organisateurs nucléolaires N.O.R (Figure 6).

CONCLUSION

Les travaux que nous avons réalisés nous a permis d'élargir nos connaissances sur la constitution génomique du complexe polyploïde *x-Triticosecale* Wittmack et ces géniteurs (*Triticum aestivum* L., *Secale céréale* L.), par des analyses cytogénétiques (C-banding et N-banding) et moléculaire (Hybridation *in situ*). - L'analyse cytogénétique montre que l'hybride (MahondémiasxRC9) est riche en hétérochromatine (génomes B et D) que le géniteur ♀ (Mahon-démias), alors qu'il est presque similaire à son de géniteur ♂ (RC9). D'une manière générale, l'hétérochromatine de l'hybride Mahondémias x RC9 (triticales 8x) et son géniteur ♂ RC9 (seigle) est décrite comme C+N+. Par contre l'hétérochromatine du géniteur ♀ Mahon-démias (blé tendre) est désigné comme C-N+ (absence des épaisses bandes centromériques dans le génome B) (Hammouda & Khalfallah, 2008). Donc, La confrontation d'un génome C-N+ (femelle) avec un génome C+N+ (male) produit un hybride qui à la 5^{ème} génération se révèle C+N+. L'hypothèse explicative serait que le génome de l'hybride s'est enrichi en hétérochromatine au fur et à mesure de sa stabilisation. La translocation 7RS/2BL mise en évidence par le C-banding est confirmée par la FISH. Ces translocations (blé-seigle) sont importantes dans la sélection végétale. Elles sont largement utilisées par les sélectionneurs dans le monde entier, dans les plus exploitées sont 1BL/1RS et 2BS/2RL. Également, des polymorphismes hétérochromatiques intervariétaux et interspécifiques sont mis en évidence. La localisation des

régions organisatrices nucléolaires (N.O.R) est conforme à celle décrite par les auteurs (Hammouda & Khalfallah, 2008), marquées sur les chromosomes 1R- 2R- 3R et 6R du seigle et sur 1B du blé et sur 1R- 2R- 3R- 6R -1B du triticales. Toutes ces régions représentent l'hétérochromatine contenant les séquences d'ADN (GAAM (GAGn des satellites, portant les gènes responsables du codage des ARN ribosomiques). Des chromosomes B sont observés chez le seigle et le triticales (types hétérochromatiques et euchromatiques). Ces chromosomes pourraient avoir une influence sur l'accumulation du taux l'hétérochromatine et jouent un rôle important dans l'adaptation du végétal aux conditions défavorables. Ce qui explique l'adaptation du seigle (RC9) et du triticales (Mahon-démiasxRC9) aux conditions de l'environnement défavorables. -Analyse moléculaire, montre que, dans le matériel étudié (géniteurs et hybride) le chromosome 5R présente deux locis 5S et 45S colocalisés sur le télomère du bras court, contrairement à la bibliographie. Ce résultat suggère que les variétés de seigle qui ont servi de géniteurs dans notre matériel ont acquis au cours de leur sélection des ADNr qu'ils transmettent à leur descendance d'une manière stable. - L'ensemble des résultats obtenus nous permettent d'établir une cartographie cytogénétique moléculaire de l'hétérochromatine constitutive et des gènes ribosomiques 5S et 45S des chromosomes marqueurs de notre matériel. Les loci 45S correspondent aux organisateurs nucléolaires N.O.R.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ammar K., Mergoum M., Rajaram S., 2004. The history and evolution of Triticales. In Mergoum M.
- Gomez M. ; Apherison H. (org). Triticales improvement and production. Food and agriculture organization of the united nations Rome:FAO. Plant production and protection, p:179.
- Amirouche N., Misset M.T., 2007. Morphological variation and distribution of cytotypes in the diploid-tetraploid complex of the genus *Dactylis* L. from Algeria. *Plant Syst. Evol.* DOI.10.1007/s00606-006-0502.-
- Apples R., 1982 — The molecular cytology of wheat-rye hybrids. *Int. Rev. Cytol.*, 14: 93-132.
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pulkhalskyi. V.A., Zelenin A.V.; Bernard S., 2007.
- Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*, V 50:907-926(20)

- Bushreen J., and Vahidy A. 2008. Giemsa N-banding pattern in some wild diploid species of *Hordeum*. *Pak. J. Bot.*, 40(6): 2299-2305.
- Comeau A. et Jahier J., 2005. Sauvetage d'embryons zygotiques et hybridation interspécifique. Biotechnologie. Unisat. Université Audiovisuelle. Francophone. 41-70
- Deng-cai L., Chi Y. and Jun-liang Y., 1997. C-banding analysis of D-genome chromosome in Chinese landrace of *Triticum tauschii* (Coss.), *Schmalhand Triticum aestivum* L. cv. *Chinese spring*. Wheat Information Service. China. 84: 33-39.
- Endo T.R., Nasuda S, Jones N, Dou Q, Akahori A, Wakimoto M., 2008. Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background. *Genes Genet Syst*, 83: 23–30.
- Feldman, M., and Levy, A.A., 2005. Allopolyploidy a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet. Genome Res.* 109(1–3): 250–258.
- Friebe B. and Gill B.S., 1994. C-band polymorphism and structural rearrangements detected in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 78 (1-2): 1-5.
- Gill B. S. and Friebe B., 2009. Cytogenetic Analysis of Wheat and Rye Genomes. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, V 7: p 121
- Gill BS, Friebe B., Endo T.R., 1991. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosomes bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 34: 830-839.
- Gill, John S., 1997. Wheat-Rye chromosomes translocation involving small terminal and intercalary rye chromosomes segments in the Portuguese wheat landrace. Barbela, Norwich. UK, p. 546-593.
- Gustafson J. P., Butlert E., and McIntyre C.L. 1990. Physical mapping of a low-copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). *Nati. Acad. Sci. USA*. Vol. 87, pp. 1899-1902
- Hammouda D. et Khalfallah N. 2008. Comparative analysis of D and R genomes in two lignes (*x-Triticosecale Wittmack*) and their genitors (*Secale cereale* L., *Triticum aestivum* L.) by N-banding. *Caryologia*. vol 61, n3, p 245-252.
- Hammouda D. and Abdel-hady I., 2008. N and C-banding analysis of chromosomes in wheat, *Triticum aestivum* L. Variety "Mahon-émias". *The Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* J.G.E.B, Egypt, vol 6, n1, p: 85-88.
- Hammouda D. et Khalfallah N. 2015. Étude comparative de la caryomorphologie chez six génotypes du *Lens culinaris* Medik. *European Scientific Journal*, August Edition, Vol.11, No.24, p214-225.
- Heslop-Harrison J.S., 1992. Molecular cytogenetics, cytology and genomic comparisons in the Triticeae. *Hereditas*, Volume 116, Issue s1: 93–99
- Heslop-Harrison J.S., Leith A.R., Schwarzacher T., Ananthawat-Jonsson K. 1990. Detection and characterisation of 1B/1R translocation in hexaploid wheat. *Heredity* 65: 385–392
- Houben A., Nasuda S., and Takaski R. 2011. Plant B Chromosomes. Chapter 5, p 97-111.
- Jahier J., 1992. Techniques de cytogénétique végétale. *Jahier J. (Ed.). INRA. Paris*. pp 171
- Kakeda K., Fukui K. and Yamagata H., 1991. Heterochromatic differentiation in barley chromosomes revealed by C- and N-banding techniques. *Theor. Appl. Genet.* 81: 144-150.
- Kang H. Wang Y. Fedak G. Cao W; Zhang H. Fan X. Sha L., 2011. Introgression of chromosome 3Ns from *Psathyrostachys huashanica* into wheat specifying resistance to stripe rust. *PLOS. One*, 21802.
- Kousaka R., and Takashi R., 2012. Effect of a rye B chromosome and its segments on homoeologous pairing in hybrids between common wheat and *Aegilops variabilis*. *Genes and Genetics System*, vol. 87 N1: 1- 7.
- Kubaláková M., Valárik M., Bartoš, J., Vrána J., Molnár-Láng M., and J. Doležel, 2003. Analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. *Genome* 46: 893–905.
- Lapinski B., Schwarzacher T., 1998. Translocations 5A/5R in improved lines of tetraploid winter triticales. Paper presented at 4 th International Triticales Symposium, 1: 218-220.
- Landgeva S., Ganeva G. and Georgina V., 1995. Somatic karyotypes and N-banding patterns of tetraploid of wheats. *Biologisches Zentralbat.* 114 (3): 253-265.
- Langdon T., Seago C., Jones R.N., Ougham H., Thomas H., Forster J.W., Jenkins G., 2000. De Novo Evolution of satellite DNA on Rye B chromosome. *Genetics. UK.* 154: 869-884.
- Lukaszewski A.J., 1995. Chromatid and chromosome type breakage-fusion-bridges cycles in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Genetics*. 140: 1069- 1085.

- Lukaszewski A.J., 2000. Manipulation of 1RS/1BL translocation on wheat by induced homeologous recombination. *Crop.Sci.* 40: 216-225
- Lukaszewski A.J. and Gustafson J.P., 1983: Translocations and modifications of chromosomes in triticales X wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 64: 239-248
- Lukaszewski A.J., Christine A.; 2011. Transfer of the *Glu-D1* Gene from Chromosome 1D to Chromosome 1A in Hexaploid Triticale. *Plant Breeding*, Volume 112, Issue 3: 177–182.
- Ostashevsky J.Y., 1996. Centromeric locations in karyotypes: a rule derived from the theory of branched polymers. *J. Theor. Biol.* 181: 293-298.
- Otler G., 2005. The fortune of a botanical curiosity: Triticale: past. Present and future. *Journal of Agricultural science.* V143:329-346
- Rahmatov M., 2012. Isolation and evaluation of different wheat-rye translocation lines obtained from a disease resistant double translocation line with 1BL 1RS and 2RL 2BS. Faculty of Landscape Planning, University of Agricultural Science; p 54.
- Ribeiro T., Pires B., Delgado M., Viegas W., Jones N. et Morais-cecilio L., 2004. Evidence for "cross talk" between A and B chromosomes of rye. *Proc. R. Soc. Lond. B (suppl)* 271:482-484.
- Seal A.G., and Bennett M.D., 1981. The rye genome in winter hexaploid triticales. *Can. J. Genet. Cytol.* 23:647-653.
- Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M., and Levy A.A., 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*, 13(8): 1749– 1759.
- Schlegel R., and Gill B.S., 1984. N-banding analysis of Rye chromosomes and the relation between N-banded and C-banded heterochromatin. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 765-769.
- Shimelis H., 2005. C-banding analysis of chromosomes translocation in doubled haploid wheat. *African Journal of Biotechnology. South Africa.* 4 (6): 541-547.
- Silkova O.G., Dobrovolskaya O.B., Dubovets N.I., Adonina I.G., Kravtsova L.A., 2007. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR markers *Genetika*, V43, N 8: 1149-1152
- Siljak-yakovlev S. and Cartier D., 1986. Hétérochromatin patterns in some taxa of *Crepispraemorsa* complex. *Caryologia*, 39: 27-32.
- Timofeev V.B., 1998. Triticale as a 'bridge' for carrying 1BL/1RS translocation into a common winter wheat. Paper presented at the 4th *International Triticale Symposium*, 2: 58-60.