

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères MENTOURI Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre : 39/D3C/2016

N° de série : 04/Bioch/2016



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Spécialité : Biochimie et Biotechnologies

Présentée par :

M^{elle} MEDOUKALI Imane

Intitulé

**Les genres *Medicago* L. et *Trifolium* L. en Algérie :
Diversité morphologique, biochimique et moléculaire**

Soutenue le 03/07/2016

Devant le jury

Président :	A. BENSEGUENI	Prof. Université des Frères Mentouri Constantine
Directeur de thèse :	D. KHELIFI	Prof. Université des Frères Mentouri Constantine
Examineurs :	Y. BENHIZIA	Prof. Université des Frères Mentouri Constantine
	A. MEBARKIA	M.C. Université Ferhat Abbas Sétif
	Y. NECIB	Prof. Université des Frères Mentouri Constantine

Au soleil de ma vie,

Maman

Qui a fait de moi ce que je suis

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire de thèse sont le fruit d'un peu moins de cinq années passées au laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV). Au-delà de l'acquisition de techniques, de connaissances et du raisonnement scientifique, cette thèse m'a permis de gagner en maturité. Tout ceci n'aurait pu être réalisé sans un ensemble de personnes à qui j'adresse mes plus sincères remerciements ainsi que le témoignage de mon plus profond respect.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur KHELIFI Douadi, Directeur du laboratoire GBBV. Je veux particulièrement le remercier pour le temps et la patience qu'il m'a accordés tout au long de ces années, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail au sein de son laboratoire. Sa franchise et ses encouragements ont su me remettre sur le droit chemin dans les moments où le moral n'était pas au rendez-vous. De plus, les conseils qu'il m'a procurés tout au long de la rédaction, ont toujours été clairs et enrichissants, me facilitant grandement la tâche et me permettant la finalisation de cette thèse. Je le remercie d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements aux membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce travail : Monsieur BENSEGUENI A. Professeur à l'université de Constantine, Monsieur BENHIZIA Y. Professeur à l'université de Constantine, Monsieur NECIB Y. Professeur à l'université de Constantine et Monsieur MEBARKIA A. Maître de Conférences à l'université de Sétif.

Merci à tous ceux qui ont animé ma vie au labo, qui m'entourent au quotidien et m'apportent leurs aides et leurs compétences. Je pense en particulier à : Inès BELLIL qui m'a initié au monde du labo, pour son amicale présence et ses précieux conseils. Asma MEDOURI pour son amitié et pour les moments qu'on a passé ensemble, les heures tardives de manipulation au laboratoire, la prospection et la collecte de nos échantillons de l'Est jusqu'à l'Ouest. Sarah BECHEKRI, avec qui j'ai aimé la génétique encore et encore, pour son amitié, ses aides précieuses, ses conseils et encouragements. Mohammed CHEKARA BOUZIANI, sans qui l'analyse moléculaire n'aurait pas pu être réalisée, je le remercie pour ses aides, ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.

Mes remerciements s'adressent également à l'équipe de recherche du laboratoire : Soumaya BETINA, Nardjess MOUAS, Lylia HAMEL, Borhan GRAMA, Rayene OUELBANI et Souhir

Remerciements

BENSARI avec qui j'ai partagé de très bons moments et dont les échanges scientifiques et personnels m'ont beaucoup apporté et encouragé.

Je me souviens toujours avec gratitude des aides et encouragements de tout le personnel du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales en particulier Monsieur BELBEKRI Nadir, BOULDJADJ Rima, DJAGHAR Radia, MOUELEF Adra, BAAZIZ Karim, BENAMARA Meriem, MAOUGAL Rym, qu'ils trouvent tous l'expression de ma respectueuse considération.

Merci aux stagiaires ; Sarah KEHAL, Warda DANI qui ont participé à une partie de ce travail, et ont m'aidé aimablement à la mise en forme des références bibliographiques du manuscrit. Je leur souhaite un avenir plein de succès.

Je désire terminer en remerciant mes sources de joie et de force : mes parents, ma sœur, mes frères, mes belles sœurs, ma nièce Lamis, mon fiancé Amine... qui m'ont soutenu et encouragé depuis toujours, dans mes études et dans la vie en général. Je n'aurais jamais pu réaliser mes collectes sans l'aide et la patience de mon très cher frère Bilal, je lui suis très reconnaissante et je lui souhaite une vie pleine de bonheur.

Je dis encore une fois Merci à tous ceux qui j'ai oublié.

Je dédie cette recherche à tous les chercheurs qui bataillent pour sauvegarder les ressources phyto-génétiques.

« Tant qu'il apprend, l'homme ne cesse d'être savant..

Il devient ignorant lorsqu'il prétend savoir »

Mohammed (صلى الله عليه و سلم)

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
EST	Estérases
GOT	Glutamate Oxaloacétate Transaminase
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
PAGE	PolyAcrylamid Gel Elestrophoresis
PC	Principal Component
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Polymorphism Information Content
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate- PolyAcrylamid Gel Elestrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
BET	Bromure d'Ethidium
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages

Liste des figures

Partie 1 : Revue bibliographique

- Figure 1** : Classification phylogénique des Légumineuses
- Figure 2** : Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae
- Figure 3** : Superficies et production des légumes secs en Algérie
- Figure 4** : Relations phylogénétiques entre les espèces des légumineuses
- Figure 5** : Origine géographique des *Medicago*
- Figure 6** : Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde
- Figure 7** : Feuilles de différents écotypes du genre *Medicago*
- Figure 8** : Gousses de *Medicago truncatula*
- Figure 9** : Distribution géographique du genre *Trifolium*
- Figure 10** : La détection d'un polymorphisme de répétition (SSR)

Partie 2 : Diversité génétique du genre *Medicago* L.

CHAPITRE I

- Figure 11** : Map indicating the location of the sampled populations of the genus *Medicago* L. in relation to bioclimatic stages in northern Algeria
- Figure 12** : Principal component analysis of twelve morphological characteristics (a) and their relationship with ecological parameters (b)
- Figure 13** : UPGMA dendrogram based on morphological characteristics of 13 species of the genus *Medicago* L.
- Figure 14** : Zymograms in some accessions of *M. truncatula* esterase (a) and *M. polymorpha* glutamate oxaloacetate transaminase (b)
- Figure 15** : UPGMA dendrogram based on isozyme data of 14 species of the genus *Medicago* L.

CHAPITRE II

- Figure 16** : Electrophoretic banding pattern of albumin fraction in some accessions of *M. orbicularis*.
- Figure 17** : Dendrogram based on UPGMA clustering of albumin data showing relatedness among the studied *Medicago* species.
- Figure 18** : Dendrogram based on UPGMA clustering of globulin data showing relatedness among the investigated *Medicago* species

CHAPITRE III

Figure 19 : Principal component analysis of the nine studied seed physical properties.

Figure 20 : UPGMA dendrogram based on physical properties data of 15 *Medicago* taxa

Figure 21 : SSR banding patterns of *Medicago* taxa revealed by: a) AFctt1 primer in *M. minima* accessions and b) AFct32 marker in *M. p. var. polymorpha* accessions

Figure 22 : UPGMA dendrogram based on SSR data of 15 *Medicago* taxa

Partie 3 : Diversité génétique du genre *Trifolium* L.

CHAPITRE I

Figure 23 : Locations of the sampled populations of the genus *Trifolium* L. in relation to bioclimate in northern Algeria

Figure 24 : Principal component analysis depiction of ten morphological characters (a) and their relationship with bioclimate (b)

Figure 25 : UPGMA phenogram based on morphological characters showing relatedness among *Trifolium* species

Figure 26 : Zymograms of EST in *T. cherleri* and *T. squarrosum* accessions (a) and GOT in some *T. lappaceum* accessions (b)

Figure 27 : UPGMA dendrogram based on isozyme markers showing relatedness among *Trifolium* species

CHAPITRE II

Figure 28 : Electrophoretic banding patterns of albumin (a) and globulin (b) fractions in some accessions of *T. angustifolium* and *T. lappaceum*.

Figure 29 : Dendrogram illustrating relationships of the studied *Trifolium* species based on SDS-PAGE albumin data

Figure 30 : Dendrogram illustrating relationships of the studied *Trifolium* species based on SDS-PAGE globulin data

Figure 31 : Dendrogram illustrating relationships of the studied *Trifolium* species based on Combined SDS-PAGE albumin and globulin data

Liste des tableaux

Partie 1 : Revue bibliographique

Tableau 1 : Composition comparée des graines de légumineuses protéagineuses et du grain de blé

Tableau 2 : Légumineuses alimentaires cultivées en Algérie : leur importance en superficie, production et rendement

Tableau 3 : Répartition des surfaces (10^3 ha) consacrées aux fourrages en Algérie

Tableau 4 : Classification des espèces du genre *Medicago* selon Lesins et Lesins (1979)

Tableau 5 : Classification du genre *Trifolium* proposée par Ellison et al. (2006) comparée à celle de Zohary et Heller (1984)

Partie 2 : Diversité génétique du genre *Medicago* L.

CHAPITRE I

Tableau 6 : *Medicago* accessions and sampling sites with main bioclimatic parameters used in this study

Tableau 7 : Mean, range, standard deviation and coefficient of variation of the analyzed traits for the 13 *Medicago* species

Tableau 8 : Correlation matrix between the 12 morphological characteristics analyzed ($p < 0.05$)

Tableau 9 : Isozyme types frequencies at six loci in fifteen species of the genus *Medicago*

Tableau 10 : Phenotypic polymorphism for each of the six loci in each of the studied Species

CHAPITRE II

Tableau 11 : Localities of investigated *Medicago* species

Tableau 12 : Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism in each *Medicago* species for the albumin fraction.

Tableau 13 : Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism in each *Medicago* species for the globulin fraction.

CHAPITRE III

Tableau 14 : Localities of investigated *Medicago* taxa.

Tableau 15 : Sequences and linkage group of five microsatellite primers tested in *Medicago* taxa

Tableau 16 : Mean, range, standard deviation and coefficient of variation of the analyzed properties for the 15 *Medicago* taxa.

Tableau 17 : Total number of amplified bands, specific bands and polymorphism in each *Medicago* taxa for each SSR marker.

Partie 3 : Diversité génétique du genre *Trifolium* L.

CHAPITRE I

Tableau 18 : Sampling sites and the main bioclimatic parameters used in this study

Tableau 19 : Mean, range, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) of the analyzed traits for 15 *Trifolium* species

Tableau 20 : Phenotype frequencies at seven zones of enzymatic activity in fifteen *Trifolium* species

Tableau 21 : Polymorphism information content (PIC) for each zone in each studied species

CHAPITRE II

Tableau 22 : Localities of investigated *Trifolium* species

Tableau 23 : Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism in each *Trifolium* species in albumin fraction.

Tableau 24 : Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism in each *Trifolium* species in globulin fraction.

SOMMAIRE

Introduction	1
Partie 1 : Revue bibliographique	
I. Les légumineuses	4
I.1. Présentation générale des légumineuses	4
I.2. Principales caractéristiques des légumineuses	7
I.2.1. Etablissement de la symbiose fixatrice de l'azote	7
I.2.2. Importance des légumineuses dans les systèmes de culture	8
I.2.3. Haute teneur en protéines	9
I.2.4. Métabolites secondaires	10
I.2.5. Autres	11
I.3. Situation des légumineuses en Algérie	11
I.3.1. Les légumineuses alimentaires	12
I.3.2. Les légumineuses fourragères	14
II. Le genre <i>Medicago</i> L.	17
II.1. Taxonomie et génétique	17
II.2. Historique de la classification du genre <i>Medicago</i> L.	18
II.3. Origine géographique et évolution	21
II.4. L'aire de répartition du genre <i>Medicago</i>	22
II.5. Description botanique de la plante <i>Medicago</i>	24
III. Le genre <i>Trifolium</i> L.	25
III.1. Taxonomie et Génétique	25
III.2. Origine et Aire de Répartition	28
III.3. Description botanique	28
IV. Diversité génétique	29
IV.1. Biodiversité ou Diversité biologique	29
IV.2. Diversité génétique : Définition et intérêt	30
IV.3. La conservation des ressources génétiques	31
IV.4. Les principaux facteurs de la diversité génétique	31
IV.4.1. Transfert des gènes	31
IV.4.2. Les mutations	32
IV.4.3. La transposition	32
IV.4.4. La recombinaison homologue	33

IV.4.5. Divers processus favorisant et conservant la variabilité	33
IV.5. Etude de la diversité génétique	34
IV.5.1. Marqueurs morphologiques	34
IV.5.2. Marqueurs biochimiques	35
IV.5.3. Marqueurs moléculaires	36
IV.5.3.1. Les marqueurs RFLP	37
IV.5.3.2. Les marqueurs basés sur la PCR (Polymerase Chain Reaction)	37
IV.5.3.3. Les marqueurs SNP	41
IV.6. Analyse de la variabilité génétique	41
IV.6.1. Méthodes de classification	42
IV.6.2. Analyse factorielle	43
Références bibliographiques	45

Partie 2 : Diversité génétique du genre <i>Medicago</i> L.

Chapitre I: Variation morphologique et enzymatique des populations naturelles du genre <i>Medicago</i> L. prospectées dans le Nord Algérien.	
Introduction	59
Materials and methods	60
Results	61
Discussion	63
References	66
Chapitre II : Polymorphisme des protéines de réserve (albumines et globulines) dans des espèces spontanées du genre <i>Medicago</i> L.	
Introduction	70
Materials and methods	72
Results	73
Discussion	75
References	81
Chapitre III : Diversité génétique des espèces Algériennes du genre <i>Medicago</i> L. appréciée par quelques propriétés physiques du grain et les marqueurs microsatellites	
Introduction	87
	89

Materials and Methods	90
Results	94
Discussion	100
References	102

Partie 3 : Diversité génétique du genre <i>Trifolium</i> L.
--

Chapitre I: Evaluation de la variabilité génétique du trèfle Algérien (<i>Trifolium</i> L.) par les marqueurs morphologiques et enzymatiques.	107
Introduction	108
Materials and Methods	109
Results	111
Discussion	117
References	118
Chapitre II: Variation des albumines et des globulines au sein et entre des espèces du genre <i>Trifolium</i> L. collectées dans le Nord Algérien.	120
Introduction	122
Materials and Methods	123
Results	126
Discussion	132
References	135
Synthèse et conclusion générale	139
I. Le genre <i>Medicago</i> en Algérie.....	139
I.1. Diversité morphologique.....	139
I.2. Diversités biochimique et moléculaire	140
II. Le genre <i>Trifolium</i> en Algérie	143
II.1. Diversité morphologique	143
II.2. Diversité biochimique	144
Annexes	
Résumés	

Introduction générale

Le monde s'est fortement développé au cours du siècle dernier. Ce développement s'est fait le plus souvent au détriment de l'environnement. L'homme a pris conscience récemment des catastrophes qui sont en voie de se mettre en place. La couche d'ozone s'effrite peu à peu, l'effet de serre prend de plus en plus de l'importance et plusieurs espèces animales et végétales dont dépend tout progrès futur sont en voie de disparition. Les progrès accomplis dans les domaines de l'industrie, l'urbanisme et les techniques agricoles sont tels que de graves dégâts sont causés aux écosystèmes, avec parfois une destruction partielle ou totale de ce qu'ils portent comme variabilité. Myers (1999) a estimé que quelques 60 000 espèces végétales avaient disparu depuis 1950 et Tuxill (1998) mentionne que deux espèces sur trois sont en déclin. D'après l'IUCN « International Union for Conservation of Nature and Natural resources » (1996), 34 000 espèces végétales des 250 000 seraient en danger. Cette diminution de la diversité génétique touche aussi les espèces et variétés cultivées qui sont en réduction extraordinaire. En effet, après 10 000 ans d'agriculture et la découverte de quelques 50 000 variétés de plantes comestibles, actuellement, tout juste 15 cultures fournissent 90% de la ration alimentaire du monde dont trois d'entre elles (riz, blé et maïs) sont les aliments de base de 4 milliards d'êtres humains (FAO 1996).

L'analyse de la variabilité génétique des êtres vivants en particulier ceux d'importance agronomique constitue une étape essentielle pour comprendre les mécanismes d'évolution des espèces ainsi que pour assurer une bonne gestion des ressources biologiques pour une utilisation durable.

La large diversité des conditions naturelles de l'Algérie, de son relief, de sa géologie, de ses sols et de son climat, a fini par forger une grande diversité biologique. Cette dernière a défini des biotopes variés permettant la coexistence de nombreuses espèces végétales et animales, souvent adaptées à des conditions abiotiques extrêmes ainsi qu'à de fortes pressions biotiques. Le nombre d'espèces végétales en Algérie est de 3 139, réparties en 5 402 taxons (Quézel et Santa 1962). La grande variation des conditions du milieu fait que pour chaque espèce, il existe un grand nombre d'écotypes dont la variabilité génétique constitue un matériel de choix pour la sélection et la création de variétés adaptées aux conditions diverses. La connaissance de la diversité de notre pays reste très peu développée et ne bénéficie pas à l'heure actuelle, d'un intérêt majeur. En effet, les connaissances sur la flore algérienne datent des travaux de Quézel et Santa (1962) et c'est sur la base de cet inventaire que les travaux de recherche sont réalisés. Pour cela, ces espèces méritent largement une révision basée sur des études écologiques et

taxonomiques qui permettent, sans doute, de meilleures connaissances et classifications ainsi qu'une mise au point actualisée de notre patrimoine floristique.

Les ressources génétiques cultivées sont aussi peu connues en Algérie, et très peu valorisées. Selon Mediouni (2000), la diversité biologique algérienne (naturelle et cultivée) compte environ 16 000 espèces, mais l'économie algérienne n'utilise que moins de 1% de ce chiffre.

Parmi ces ressources, les légumineuses présentent un intérêt certain pour l'agriculture algérienne et offrent une gamme de diversité très importante. La population algérienne est consommatrice de légumineuses alimentaires et les espèces cultivées sont prioritairement celles à destination humaine (Abdelguerfi-Laouar *et al.* 2001). Pour les légumineuses fourragères, les espèces cultivées se limitent à la luzerne (*Medicago sativa*), le bersim (*Trifolium alexandrinum*) et la vesce (*Vicia sativa*) en association avec des graminées (Abdelguerfi et Laouar 2002). Culturellement, les ressources fourragères en Algérie sont perçues par les agriculteurs, éleveurs et pasteurs comme une ressource naturelle qui n'exige pas d'être cultivée et entretenue. Rappelons toutefois que les légumineuses fourragères et/pastorales peuvent jouer un rôle important dans la rotation, la protection contre l'érosion et la désertification et surtout dans l'amélioration des ressources fourragères et pastorales dans les zones marginales et difficiles, ce qui permet une amélioration de la production animale tout en assurant le maintien des populations rurales dans leurs terroirs et un développement durable.

Le travail de cette thèse s'inscrit dans ce contexte. Il s'intéresse à la caractérisation des ressources génétiques de deux genres de la famille des légumineuses, *Medicago* et *Trifolium*, qui présentent des aptitudes de production fourragère très intéressantes, en vue de leur évaluation et valorisation en matière de production fourragère et/ou pastorale. Dans cette étude, nous avons entrepris l'examen de la diversité génétique des populations naturelles et les relations entre les différentes espèces de ces deux genres, récoltées à travers plusieurs régions géographiques selon un gradient bioclimatique dans le Nord Algérien, et cela par l'aide de plusieurs approches morphologique, enzymatique, protéique et moléculaire.

Le présent travail est structuré en trois parties. A partir d'une revue bibliographique, une première partie fait tout d'abord le point sur la présentation de la famille des légumineuses, leur intérêt et leur situation en Algérie avec une présentation des deux genres *Medicago* et *Trifolium*. Ensuite, un aperçu sur la diversité génétique, son intérêt et son étude par les marqueurs génétiques sont développés.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de la diversité génétique du genre *Medicago* par des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires. Les résultats sont structurés en trois chapitres complémentaires présentés sous forme d'articles scientifiques.

Nous présentons ensuite, dans une troisième partie, les résultats de deux approches morphologique et biochimique menées sur les espèces du genre *Trifolium*, sous forme de deux articles scientifiques.

Enfin, les résultats les plus pertinents de ce travail sont repris dans une synthèse et une conclusion générale.

Première Partie

Revue bibliographique

I. Les légumineuses

I.1. Présentation générale des légumineuses

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les Angiospermes, Eudicotylédones. Elles sont les sœurs des Polygalaceae, composant avec les familles des Quillajaceae et Surianaceae, les Fabales (Judd *et al.* 2001). Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae), avec environ 750 genres (Polhill *et al.* 1981) et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.* 2006), et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricole, après les Poacées (graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tels le maïs, le riz, le blé, l'orge, l'avoine, le seigle et le millet (Young *et al.* 2003). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.* 2000). Cependant, il y a encore 40% des légumineuses qui n'ont jamais été examinées pour la nodulation (Sprent 1999). Les légumineuses sont extrêmement diversifiées, vont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales (Judd *et al.* 2001). Cependant, elles présentent un point commun, leur fruit est une gousse (Caratini 1984). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont 2005).

En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles (Figure 1), deux sont monophylétiques (Papilionoideae, Mimosoideae) et la troisième paraphylétique (Caesalpinoideae) (Guignard et Dupont 2005).

Les Papilionoideae

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de «papillon» (Guignard et Dupont 2005). La sous-famille monophylétique des Papilionoideae renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent 1995): le soja (*Glycine max*, $2n = 4x = 40$), le haricot (*Phaseolus vulgaris*, $2n = 2x = 22$), le pois (*Pisum sativum*, $2n = 2x = 14$), la luzerne (*Medicago sativa*, $2n = 4x = 32$), l'arachide (*Arachis hypogaea*, $2n = 4x = 40$), le pois chiche (*Cicer arietinum*, $2n = 2x = 16$), et la fève (*Vicia faba*, $2n = 2x = 16$). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoides et Phaseoloides (Figure 2), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton *et al.* 2003). Elle est cosmopolite et compte 11300

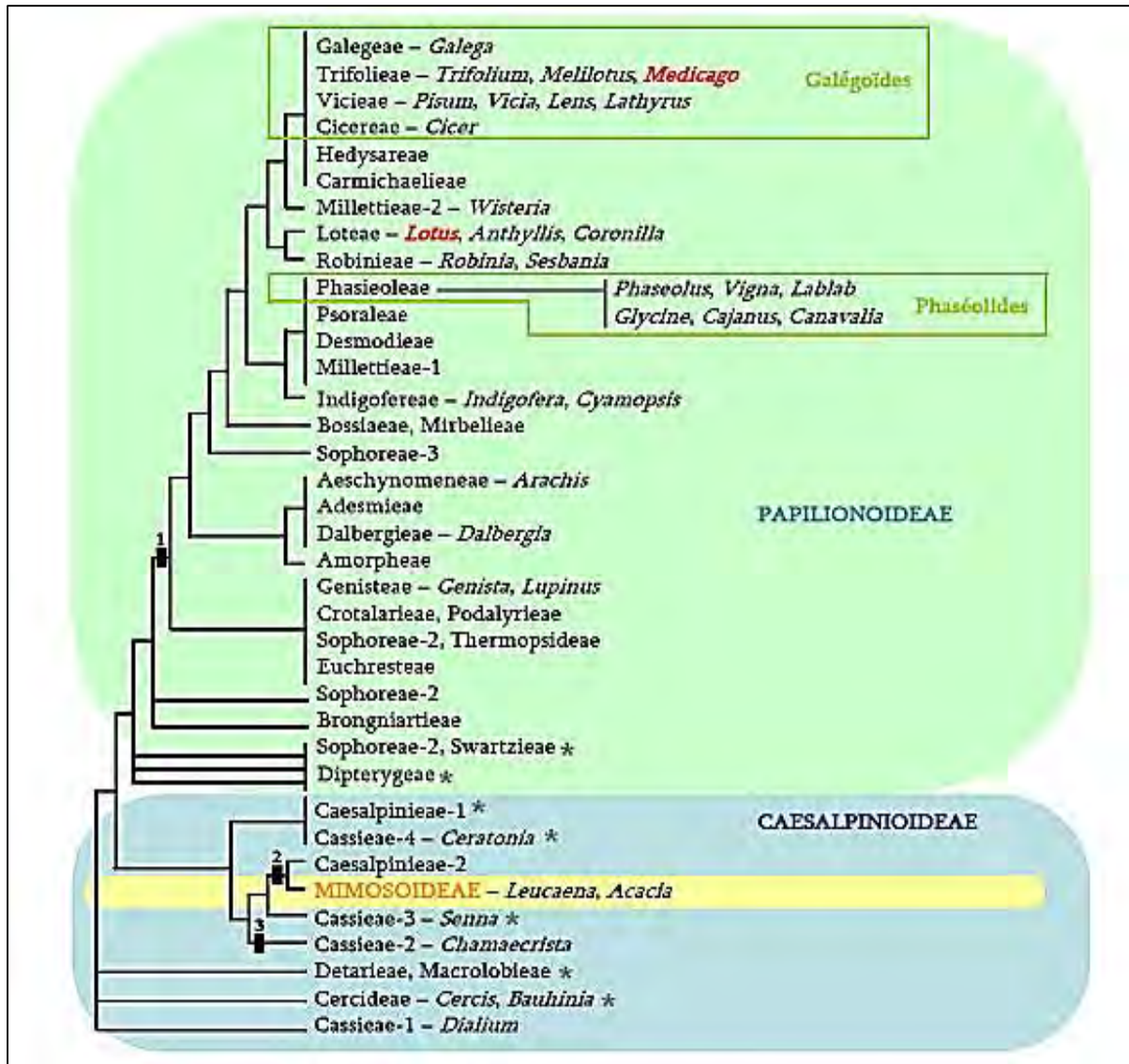


Figure 1: Classification phylogénique des Légumineuses (Doyle *et al.* 1998)

La superfamille des Légumineuses (ou Fabacées) se subdivise en trois familles, les Papilionoideae, et les Mimosoideae qui sont des familles phylogénétiquement très regroupées et les Caesalpinioideae, plus dispersées. Les groupes connus pour présenter des plantes non-nodulantes sont notés par un astérisque gris. Les deux groupes comprenant les principales légumineuses d'intérêt agricole, les Galégoïdes et les Phaséolides, sont représentés par des encadrés. 1,2,3: Possibles origines indépendantes pour la nodulation

espèces réparties en 440 genres regroupés en 31 tribus (Labat 1996). Dans cette sous-famille, 97% des espèces examinées peuvent être nodulées (Sprent 1995). La majorité des espèces sont herbacées ; leur fleur est irrégulière composée de 5 pétales : un étendard, deux ailes et deux pétales partiellement fusionnés en une carène (Judd *et al.* 2001). Les Papilionacées sont utilisées pour la production des graines alimentaires (pois, haricot...), pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage (luzerne, sainfoin, trèfle...), le soja est utilisé sur une large échelle dans l'élevage industriel.

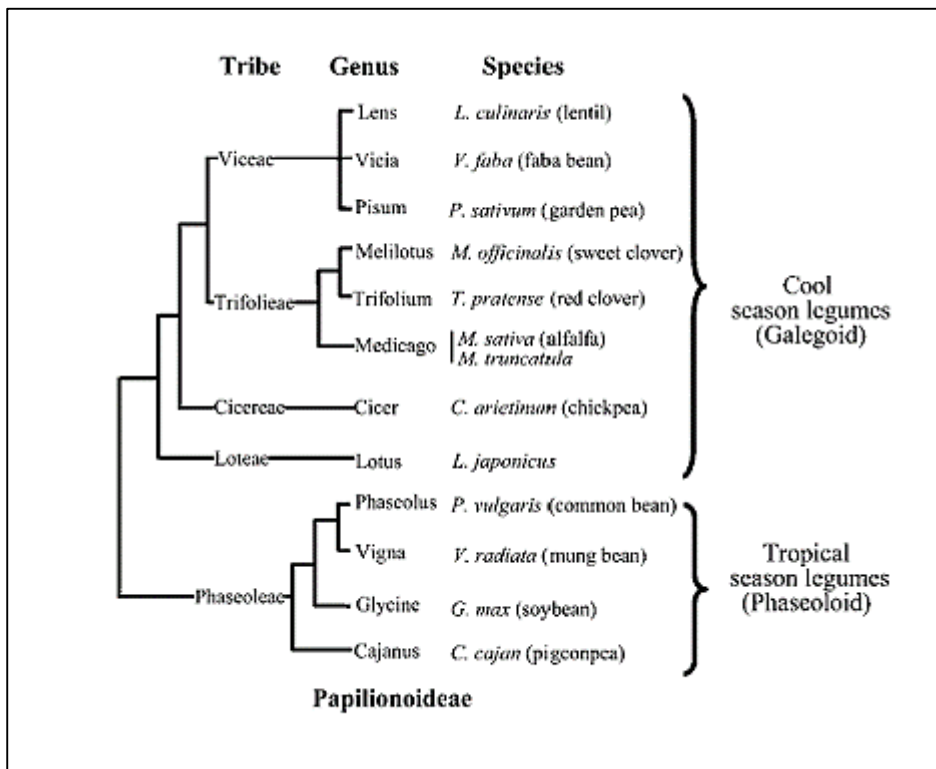


Figure 2: Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae (Zhu *et al.* 2005)

Les Mimosoideae

Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.* 2001).

Les Caesalpinoideae

Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles à l'extérieure (Judd *et al.* 2001).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine ou l'alimentation animale, grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène). Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles de céréales: on distingue les espèces à graines riches en protéines et en huile, sans amidon, classées comme oléagineux (soja, arachide) qui fournissent plus de 35% des besoins mondiaux en huiles végétales (F.A.O. 2007) et les espèces à graines riches en protéines, classées comme protéagineux (pois, féverole) ou légumes secs (haricot, lentille, pois chiche). Cette famille occupe la deuxième place, après les céréales, pour les terres cultivées et la production. En 2004, plus de 300 millions de tonnes de légumineuses à graines ont été produites sur une superficie de 190 millions d'hectares, soit 13% des terres cultivées (selon FAO). Les légumineuses fourragères sont une autre source de protéines pour l'alimentation du bétail (luzerne, trèfle) soit sous forme de foin ou bien consommées dans les prairies ou les parcours.

I.2. Principales caractéristiques des légumineuses

I.2.1. Etablissement de la symbiose fixatrice de l'azote

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. C'est le constituant principal de l'atmosphère terrestre sous forme d'azote gazeux (N_2) mais les plantes l'absorbent dans le sol sous forme de nitrates (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu.

La fixation biologique de l'azote est effectuée par des microorganismes soit autonomes soit en symbiose avec des plantes supérieures. Les légumineuses peuvent acquérir l'azote grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec des bactéries du sol collectivement appelées Rhizobium. Les bactéries de la famille des Rhizobiacées peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation de structures appelées nodosités ou nodules. Par ces nodules, la plante hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. Le processus de la fixation, lui-même, consiste en la réduction de l'azote atmosphérique N_2 sous forme ammoniacale. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase d'origine bactérienne (Downie 2005). Cette association à bénéfice réciproque entre

la légumineuse et les bactéries est appelée symbiose fixatrice de l'azote atmosphérique. Dans ce cas, les légumineuses ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol. La culture des Légumineuses représente donc le meilleur moyen de produire des protéines tout en respectant l'environnement : c'est un exemple de culture dans le cadre d'une agriculture durable.

En dehors des légumineuses, seul un petit nombre d'espèces (quelques centaines au plus) possèdent des nodules fixateurs d'azote. Il s'agit exceptionnellement d'une association avec les Rhizobiums (on ne connaît qu'un seul exemple : *Parasponia*) mais le plus souvent la symbiose est réalisée avec des actinomycètes (bactéries filamenteuses) du genre *Frankia* (Benson et Silvester 1993). Dans ce cas, les plantes hôtes, dites plantes actinorhiziennes, sont des arbres ou des arbustes appartenant à des familles primitives : *Alnus*, *Casuarina*, ...

I.2.2. Importance des légumineuses dans les systèmes de culture

La déficience en azote minéral dans le sol constitue un facteur limitant de la croissance des plantes. On estime que la réduction biologique de l'azote atmosphérique N₂ en ammonium fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère (Lodwig *et al.* 2003). La majorité de cet azote est apporté par la symbiose Rhizobium-légumineuses (Zahran 1999), avec un apport annuel d'azote dans les terres estimé de 200–300 kg d'azote/ha (Peoples *et al.* 1995).

Pour les trois plus importantes céréales cultivées : blé, riz et maïs, il est nécessaire de prélever entre 20 et 40 kg d'azote/ha du sol dans une période de culture de 3 à 5 mois pour chaque tonne de graines produit (Peoples *et al.* 1995). Selon Danso (1995), l'azote de la fixation symbiotique a une contribution plus importante pour la croissance des plantes par rapport à celui des engrais azotés appliqués dans l'agriculture des pays en développement. La production des engrais azotés demande beaucoup d'énergie : l'énergie nécessaire à la production chimique d'une tonne d'engrais azoté par l'industrie, est de 2.5 tonnes de pétrole. Leur coût ne cesse donc d'augmenter proportionnellement au prix du pétrole. De plus, la fertilisation azotée des plantes joue un rôle important dans l'accroissement de l'effet de serre et est économiquement ruineux tout en créant une pollution importante car souvent les nitrates sont lessivés lors des pluies et atteignent la nappe phréatique (Link *et al.* 2006).

Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote

atmosphérique. L'azote fixé dans l'atmosphère contribue pour 50 à 60 % du N des légumineuses à graines, 55 à 60 % du N des arbres fixateurs d'azote, 70 à 80 % du N des légumineuses fourragères. Cette réserve d'azote, étant stockée dans les feuilles, les nodules ou bien les autres organes rend les résidus des légumineuses plus riches en azote et contribue à enrichir le sol en cet élément qui y reste plus longtemps disponible, comparativement à l'azote minéral fortement lessivé par les eaux. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise de ces résidus laissés par les légumineuses (Chalck 1998).

Il est maintenant bien établi que les précédentes légumineuses augmentent généralement les rendements des cultures non fixatrices d'azote mais cet apport d'azote atmosphérique n'explique pas toujours les rendements souvent très élevés des cultures succédant aux légumineuses. D'autres effets bénéfiques des légumineuses semblent intervenir dans l'accroissement des rendements. Certains auteurs comme Chalck (1998) préfèrent le terme 'effet rotation' pour désigner cet effet positif des légumineuses sur la culture suivante. Certains auteurs attribuent l'effet bénéfique des rotations à l'amélioration des propriétés physiques et biologiques des sols et à la capacité de quelques légumineuses à solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore par leurs exsudats racinaires.

I.2.3. Haute teneur en protéines

Depuis le début de la civilisation, les légumineuses ont joué un rôle très important dans l'alimentation humaine et animale, particulièrement dans les pays en voie de développement et dans les régions subtropicales où elles constituent les principales sources de protéines. Les graines des légumineuses contiennent au moins 20 à 40% de protéines et complètent l'apport en acides aminés fourni par les céréales. En effet, elles sont particulièrement riches en lysine (acide aminé essentiel pour la croissance) et déficientes en acides aminés sulfurés et en tryptophane (Wang *et al.* 2003), à l'inverse des céréales (Tableau 1). Ainsi, l'utilisation combinée de ces deux sources d'aliments favorise un bon équilibre diététique (Popelka *et al.* 2004; Gepts *et al.* 2005). C'est pour cette raison que dans la majorité des centres de domestication, les légumineuses et les céréales ont été associées (Gepts 2004).

Graham et Vance (2003) estiment que les légumineuses fournissent environ le 1/3 des protéines alimentaires et viennent ainsi en deuxième rang après les graminées pour la satisfaction des besoins alimentaires de l'Homme. Cette part est fournie, essentiellement, par

les cultures du haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le pois chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le Soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le Pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier (Vance *et al.* 2000).

Tableau 1 : Composition comparée des graines de légumineuses protéagineuses et du grain de blé (% de la matière sèche, sauf pour les acides aminés en g/16g N)

Constituants/ espèce	Amidon	Fibres	Lipides	Protéines	Lysine	Méthionine + Cystéine
Pois	50	15	2	22-25	7,1	2,4
Féverole	43	18	2	28-32	6,5	2,1
Lupin blanc	1	22	10	35-39	4,3	2
Soja	2	20	20	36-40	6,2	2,8
Blé*	70	8-10	1-1,5	10-15	2,3	4

* : D'après (Feillet 2000)

Pour le cheptel, les légumineuses fourragères telles que la luzerne (*Medicago sativa*) et le trèfle (*Trifolium spp.*) représentent une source d'alimentation riche en protéines, en fibres et en énergie. Elles sont à la base de la production de lait et de viande (Russelle 2001). La luzerne (*Medicago sativa*) représente le fourrage le plus répandu dans les zones à climat tempéré (Russelle 2001). Cette plante apporte de nombreux éléments à la ration donnée aux animaux. Elle leur fournit d'abord une part importante des protéines nécessaires à leur croissance, de la bêta-carotène et des fibres indispensables à la digestion chez le ruminant. D'autres espèces sont aussi importantes pour le pâturage dans les zones tempérées comme les trèfles (*Trifolium spp.*), le lotier (*Lotus corniculatus*), le melilot (*Melilotus spp.*) et la vesce (*Vicia spp.*). Elles sont largement représentées autour du Bassin Méditerranéen. Certaines de ces espèces peuvent jouer un rôle important dans l'amélioration de la production pastorale et/ou fourragère, vu leurs faibles coûts, leurs qualités nutritives et peuvent supporter les eaux saumâtres (Foury 1954).

I.2.4. Métabolites secondaires

Les légumineuses constituent une source d'éléments minéraux essentiels requis pour l'alimentation humaine (Sandberg 2002) et de métabolites secondaires comme les isoflavonoïdes bénéfiques pour la santé qui peuvent prévenir contre les cancers chez l'Homme (Messina 1999), et d'autres comme les phénylpropanoïdes ayant un rôle défensif pour les

plantes contre les attaques de pathogènes et d'insectes (Dixon *et al.* 2002 ; Ndakidemi et Dakora 2003). Les légumineuses sont connues par leur effet de réduction du cholestérol dans le sang, leur effet hypoglycémiant, et elles réduisent l'augmentation de la pression du sang après la prise de repas (Messina 1999). Par contre, certaines légumineuses produisent des facteurs antinutritionnels comme des inhibiteurs de la trypsine (enzyme digestive), des phytohémagglutinines et des allergènes (cas de l'arachide) (Messina 1999).

I.2.5. Autres

Les légumineuses non cultivées, en plus de leur contribution à la fixation symbiotique de l'azote, constituent un potentiel de reforestation et de contrôle de l'érosion des sols (Ahmad *et al.* 1984). Des associations symbiotiques avec ces légumineuses peuvent même fournir un couvert végétal pour les terres dégradées (Jha *et al.* 1995).

I.3. Situation des légumineuses en Algérie

Quoique sur les 237.806.000 hectares, seulement 3,3% sont à vocation agricole, l'Algérie ne demeure pas moins un pays de contrastes, se distinguant par une variation éco-géographique très remarquée. Le désert occupe les 4/5 du pays et le 1/5 restant est largement occupé par les étages bioclimatiques aride et semi-aride. Les étages subhumide et humide couvrent des surfaces relativement plus restreintes. Cette variation des milieux s'accompagne d'une importante diversité de la faune et de la flore.

Selon le MA (1992), l'Algérie renferme 3300 espèces vasculaires spontanées dont 168 sont endémiques. Elle se classe en deuxième position après le Maroc et elle est suivie par la Tunisie. A eux trois, ces pays se partagent un héritage de plus 6151 espèces vasculaires spontanées dont 710 sont endémiques au Maghreb.

L'essentiel des ressources phytogénétiques se rencontre sur la frange nord où les conditions pédoclimatiques sont plus favorables, mais il n'en demeure pas moins que le sud recèle des trésors dans ce domaine comme la variabilité du palmier dattier, de l'arganier et des blés sahariens pour ne citer que ceux-là (Laumont et Erroux 1961). Cette région comme celles du nord du pays ont contribué à l'enrichissement des banques mondiales de germoplasme par de nombreux spécimens, notamment pour les céréales, les espèces fourragères et pastorales et les légumineuses alimentaires (Annichiarico et Perenzin 1994).

Dans la flore algérienne, les Fabaceae sont représentées par environ 360 espèces et sous-espèces, dont 41 % rares à très rares et 13 % endémiques au sens large (Quézel et Santa 1962).

I.3.1. Les légumineuses alimentaires

En Algérie, les légumineuses alimentaires (légumes secs) font partie du paysage agricole depuis des millénaires. Ces cultures constituent une importante source protéique susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une large couche de la population. Les espèces cultivées sont prioritairement celles à destination humaine et correspondent à la fève, la féverole, le pois chiche, le pois, la lentille et le haricot (Abdelguerfi-Laouar *et al.* 2001).

La place des légumineuses alimentaires dans le système agraire n'a pas toujours été importante. Leur superficie totale entre 1993-2002 avoisine 82301 hectares. Les espèces les plus cultivées sont dans l'ordre d'importance : la fève et la féverole, le pois chiche et le pois sec (Figure 3). Les rendements moyens enregistrés pour ces trois espèces sont très bas, de l'ordre de 3 à 5 qx /ha entre 1993 et 2002 (Tableau 2). Cette situation est le moins qu'on puisse dire alarmante en comparaison avec les normes internationales qui préconisent pour les légumineuses un pourcentage des emblavures par rapport aux céréales. Malheureusement, la production Algérienne est insuffisante : environ 50-80% des besoins nationaux sont importés pour une population de 32 millions (en 2003), ce qui revient à 70 millions US \$/an en moyenne (Feliachi 2002). Or, dans un passé peu lointain (les années 70), l'Algérie couvrait ses besoins en production de légumineuses alimentaires pour une population de 15-18 millions d'habitants. D'après la littérature et selon des agriculteurs et des hommes de terrain, des variétés et des variétés-populations très diversifiées existaient et étaient spécifiques à certaines régions de l'Algérie (Laumont et Chevassus 1956 ; 1960).

La culture des légumineuses alimentaires a nettement régressé en Algérie, sur le plan des superficies emblavées et au point de vue de la production (Abdelguerfi-Laouar *et al.* 2001). Bien qu'elles aient reçu beaucoup d'attention de la part des services agricoles pour augmenter les superficies et améliorer les niveaux de rendements, les résultats obtenus n'ont pas été à la hauteur des efforts consentis. Cette situation est la résultante de plusieurs raisons politiques, économiques, sociales et agronomiques. Les raisons essentielles peuvent être résumées comme suit :

- Les importations (en quantité et qualité) massives et à des prix relativement abordables ont entraîné le délaissement de la production locale, y compris celle de l'autosubsistance.
- Les contraintes agronomiques, telles le manque de semences, de variétés adaptées et productives, la faiblesse des rendements, ainsi que les contraintes abiotiques (sécheresse) et biotiques (maladies fongiques, bruches...).
- La recherche par les agriculteurs des cultures moins contraignantes et plus rentables (cultures maraichères...).

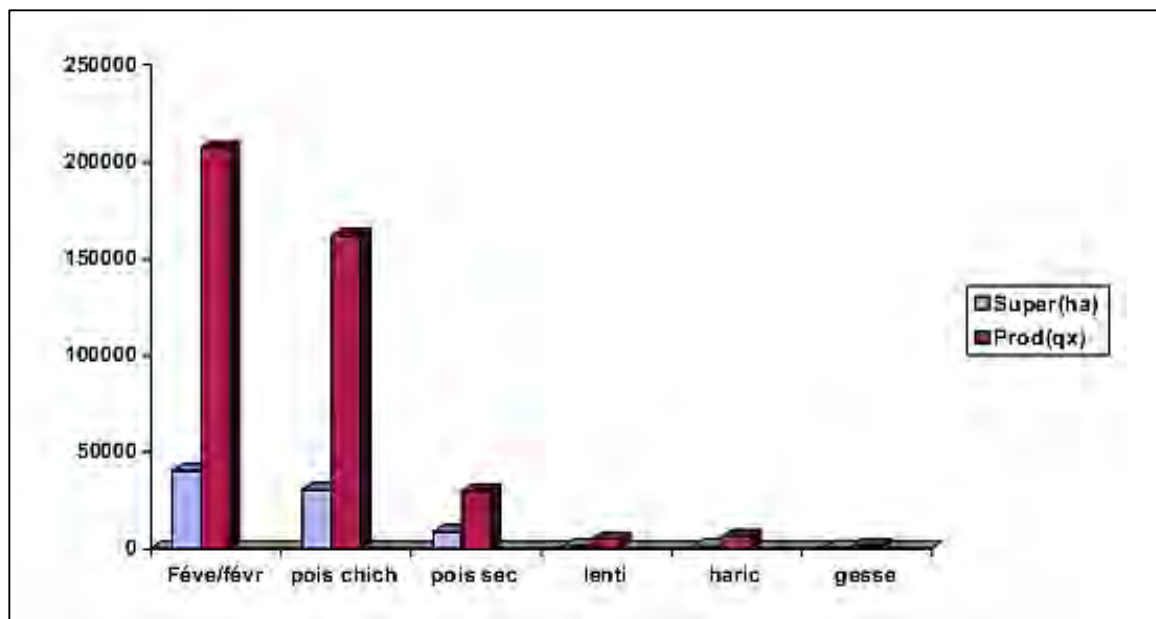


Figure 3: Superficies et production des légumes secs en Algérie (M.A. 1993-2002)

Tableau 2: Légumineuses alimentaires cultivées en Algérie: leur importance en superficie, production et rendement (M.A. 1993-2002).

Culture	Superficie		production		Rendement (qx/Ha)
	Hectare	%	Quintaux	%	
Fève/Févrole	40229	48,96	207042	50,27	5,13
Pois chiche	30487	37,04	161799	39,28	5,30
pois sec	8627	10,48	29793	7,23	3,45
Lentilles	1271	1,54	5021	1,22	3,95
Haricot sec	1240	1,50	6480	1,57	5,22
Gesse	377	0,46	1732	0,42	4,59
Total	82301	100	411867	100	5,00

I.3.2. Les légumineuses fourragères

L'Algérie porte une grande richesse d'espèces spontanées fourragères et pastorales, appartenant aux genres *Medicago*, *Scorpiurus*, *Lolium*, *Trifolium*, *Bromus*, *Lotus*, *Hedysarum*, *Phalaris*, et *Dactylis* (Lapeyronie 1978). Le Catalogue Australien mentionne l'inscription de nombreux cultivars de fétuque élevée (Cultivar Demeter), de ray-grass, de dactyle (cultivar Currie), de phalaris et de medic (Cultivar Jemalong) issus des ressources génétiques introduites à partir de l'Afrique du Nord. Ces cultivars sont exploités en Australie du sud, sous un climat où les précipitations sont comprises entre 350 et 500 mm (Oram 1991). A l'ICARDA, 24% du germoplasme conservé est de type fourrager, dont 66% proviennent de l'Afrique du Nord. Au niveau mondial, sur les 15 espèces fourragères les plus collectées, l'Algérie participe pour 2196 accessions soit 42% du nombre total d'accessions.

Les espèces spontanées apparentées des espèces fourragères (graminées et légumineuses) généralement rencontrées comprennent la luzerne (*Medicago sativa*), des *Medicago* annuelles, le lupin, le bersim, le trèfle, le trèfle blanc, le trèfle souterrain, le pois fourrager (*Lathyrus* ssp), le sulla (*Hedysarum coronarium*), des vesces, des graminées (*Eragrostis*, *Festuca*, *Phalaris*) et diverses espèces comme l'Astragalus, le Bituminaria, le Lotus, et l'Ononis.

La surface des terres agricoles est de 20% de la superficie totale du pays soit à peu près 47 millions d'hectares, dont 8 millions d'hectares de surface agricole utile (SAU), 32 millions d'hectares de parcours et 7 millions d'hectares de forêts. La surface irriguée ne représente que 7% de la SAU. Les principales cultures algériennes sont les céréales (33%), l'arboriculture (6%), les fourrages (6%) et les cultures maraîchères (3%). L'état de la situation actuelle des fourrages est critique, puisque, sur les 8 millions d'hectares de SAU, les fourrages ne présentent qu'un faible pourcentage (6%) (MA 2005). La production fourragère est constituée des fourrages cultivés et naturels. Les fourrages cultivés occupent 523 000 hectares, soit 1,6% de la superficie totale. L'essentiel des fourrages naturels est constitué par les pacages et parcours avec 29 millions d'hectares, soit 88 %. La jachère occupe 3,5 millions d'hectares soit 10,4% (Tableau 3).

Tableau 3 : Répartition des surfaces (10³ha) consacrées aux fourrages en Algérie (Houmani 1999).

Etage bio-climatique	Fourrages				Total
	cultivés	Pacage	Jachère	Prairie	
Humide	60,5	269,2	198,9	11,7	540,3
%	11,6	0,9	5,6	38,7	1,6
Sub-Humide	339,9	1310,3	1587,2	16,3	3254,4
%	65,0	4,5	44,8	53,9	9,8
Semi-Aride	118,6	4540,5	1690,9	2,2	6352,2
%	22,7	15,6	47,7	7,4	19,1
Aride	3,7	23358,6	65,4	0,0	23127,7
%	7,0	79,0	1,8	0,0	69,5

Les fourrages cultivés sont composés essentiellement de vesce-avoine qui représente 28% de la surface fourragère. 25% de la superficie sont affectés aux céréales fourragères : maïs, sorgho, orge, avoine et seigle. Pour les légumineuses fourragères, les espèces cultivées se limitent à la luzerne, le bersim et la vesce en association avec des graminées (Abdelguerfi et Laouar 2002). La luzerne et le trèfle, sont peu représentatifs avec 1 à 5% de la superficie cultivée. Elles sont menées en conduite mixte : pâturage en automne, mise en défens en hiver-printemps et fauche en fin de printemps et au début de l'été. La valeur fourragère est variable (0.5-0.7 UF/kg MS).

Rappelons toutefois que les légumineuses fourragères et/ou pastorales peuvent jouer un rôle important dans la rotation (enrichissement du sol en azote et en matière organique, réduction des adventices de culture...), dans la protection des sols contre l'érosion et la désertification (espèces annuelles à resemis naturel, espèces pérennes), et surtout dans l'amélioration des ressources fourragères et pastorales dans les zones marginales et difficiles (sols en pentes, sols salés, régions arides et/ou accidentées...). Ce qui permet une amélioration de la production animale tout en assurant le maintien des populations rurales dans leurs terroirs et un développement durable.

Les fourrages cultivés consommés en sec fournissent 577 millions d'Unités Fourragères Lait (UFL). Ces fourrages représentent 92% des apports énergétiques des fourrages cultivés et concernent essentiellement la vesce-avoine, l'avoine fourrage et le pois-avoine. Les fourrages cultivés consommés en vert fournissent 43 millions d'UFL, soit 8% des apports énergétiques

totales. Les cultures fourragères se localisent principalement dans les plaines d'intérieur (30%) et les hauts plateaux céréaliers (35%). Les fourrages naturels fournissent 5498×10^6 d'UFL. Les prairies naturelles localisées dans les étages bioclimatiques humides et sub-humides fournissent 73×10^6 d'UFL. L'apport fourrager de la jachère est estimé à 1443×10^6 d'UFL. Les pacages et parcours se trouvant surtout en milieux arides et semi-arides, fournissent 3981×10^6 d'UFL soit 72,4% de l'offre totale (Houmani 1999).

Culturellement, les ressources fourragères en Algérie sont perçues par les agriculteurs, éleveurs et pasteurs comme une ressource naturelle qui n'exige pas d'être cultivée et entretenue. Cette vision des choses combinée à des choix aléatoires d'espèces et de variétés fourragères ainsi que des bouleversements dans les systèmes agro-sylvo-pastoraux ont porté préjudice au développement des fourrages en Algérie et par conséquent aux productions animales.

Pour les fourrages cultivés, les contraintes essentielles se résument à la faiblesse de la production de semence, au peu de variabilité des espèces cultivées et à la contribution très modeste des cultivars locaux. Les contraintes des fourrages naturels sont nombreuses et spécifiques aux différentes zones productrices. Ainsi dans les régions humides et subhumides, les observations collectées depuis plusieurs années indiquent une érosion génétique du matériel végétal local. Lapeyronie (1978) signale que la flore dans les principales zones fourragères était, au début du siècle, beaucoup plus variée que celle rencontrée vers les années soixante. Cette situation est attribuée à l'introduction de variétés étrangères qui a contribué à la dépréciation des variétés locales, la destruction de l'habitat naturel de nombreuses espèces en raison du développement de l'urbanisation et de l'utilisation des terres (drainage des zones humides et construction de barrages), la mécanisation intensive de l'agriculture, la réduction des terres de parcours au profit des cultures céréalières et le peu d'intérêt des filières de productions animales pour les pâturages naturels

Dans les régions semi-arides et arides, les contraintes sont engendrées par la sécheresse, la désertification, la charge animale, la résilience de l'écosystème, l'extension des surfaces cultivées. Elles limitent le maintien voire participent à la régression des fourrages naturels. On estime, en effet, que la désertification est le principal phénomène qui menace le maintien de la diversité des plantes. La diminution de la pluviosité se répercute directement sur la production primaire des écosystèmes et sur la diversité floristique. La production pastorale perd l'équivalent de 236 UF/ha pour une diminution du cumul annuel de pluie de 104 mm. La

végétation pastorale est soumise à une pression de plus en plus forte de la part des populations utilisatrices conduisant à un surpâturage excessif et la régression des ressources. En 1968, Les parcours steppiques nourrissaient $7,9 \times 10^6$ moutons et offrent 1,6 milliards d'UF, soit une charge de 1 mouton pour 4 hectares. En 1996, la flore s'est fortement dégradée et la production chute à 533 millions d'UF, alors que l'effectif du cheptel augmente à $19,0 \times 10^6$ moutons. La charge réelle atteint le seuil 0,78 hectares par mouton (Aidoud et Nedjraoui 1992 ; Nedjraoui 2000).

II. Le genre *Medicago* L.

Le genre *Medicago* constitue un groupe taxonomique largement distribué dont les centres de diversification recouvrant le pourtour méditerranéen et l'Eurasie. Il comporte un grand nombre d'espèces annuelles et pérennes depuis fort longtemps comme d'excellents fourrages. Selon Fournier (1961), le terme "*Medicago*", vient du mot latin "*Medica*" ou «herbes de médecine», il fut modifié par Dale champs en 1587, et devient : *Medicago*. Le nom scientifique du genre *Medicago* n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais au fait que la luzerne serait originaire de Médie (région allant du Nord-Ouest de l'Iran à l'Azerbaïdjan). Le nom anglais et espagnol 'alfalfa' proviendrait du nom arabe « al-fac-façah », qui signifie « le père des aliments » car il servait de fourrage aux chevaux. Quant au nom vernaculaire (Luzerne), il est emprunté à l'occitan « luserna », qui désigne aussi une partie lumière ou le ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante.

II.1. Taxonomie et génétique

Le genre *Medicago* regroupe de nombreuses espèces de plantes proches des genres *Trifolium*, *Melilotus* et *Trigonella*, appartenant comme eux à l'ordre des Fabales, superfamille des Légumineuses, famille des Fabaceae et sous-famille des Faboideae. Le genre *Medicago* est placé dans la tribu des Trifolieae qui comprend la majorité des légumineuses fourragères tempérées comme la luzerne cultivée et le trèfle, et qui est phylogénétiquement proche de la tribu des Viciae (Figure 4) incluant les légumineuses à graines comme le pois (*Pisum sativum*) et la féverole (*Vicia faba*) (Doyle et Luckow 2003 ; Choi *et al.* 2004). Selon Ernest *et al.* (1998) le genre *Medicago* comporte 86 espèces (annuelles, bisannuelles et vivaces) représentant l'ensemble de 12 sections et 8 sous sections.

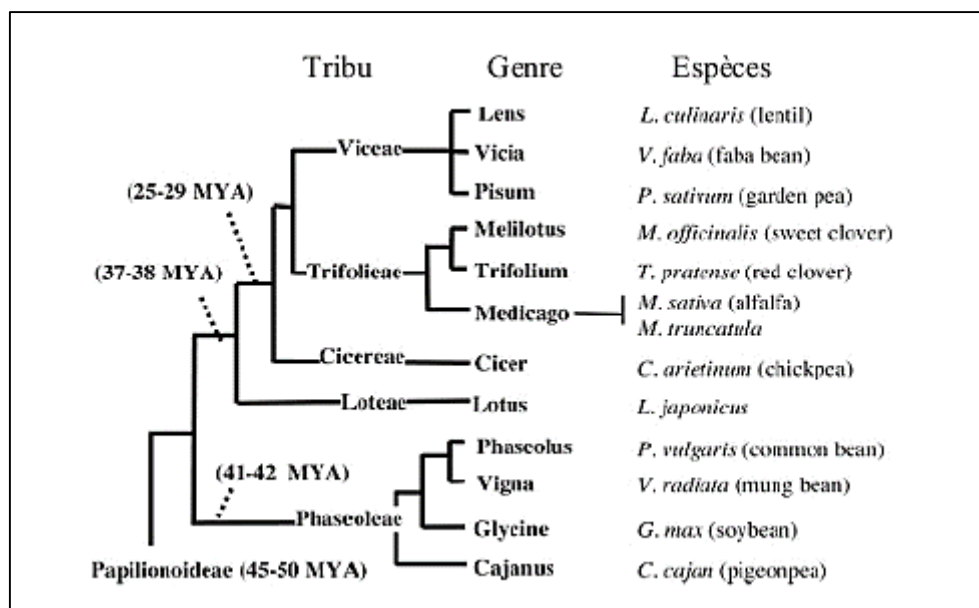


Figure 4 : Relations phylogénétiques entre les espèces des légumineuses

(Choi *et al.* 2004)

Le nombre chromosomique de base du genre *Medicago* est $x = 8$, excepté chez quatre espèces annuelles : *M. constricta* Dur., *M. praecox* DC., *M. polymorpha* L., et *M. rigidula* L. et certaines formes de *M. murex* qui ont un nombre chromosomique de base $x = 7$. Chez les différentes espèces du genre, trois niveaux de ploïdie existent : diploïdes ($2n = 2x = 14$ et $2n = 2x = 16$) qui représentent la majorité des espèces, tétraploïdes ($2n = 4x = 32$) et hexaploïdes ($2n = 6x = 48$) (Quiros and Bauchan 1988). Les espèces annuelles sont pour leur majorité des diploïdes autogames, alors que les espèces pérennes sont des tétraploïdes allogames (Négre 1959 ; Heyn 1963 ; Lesins et Lesins 1979 ; Small et Jomph 1989). A la base, le genre devait être diploïde et les espèces tétraploïdes auraient dérivé d'une non-réduction des gamètes, donnant des plantes très vigoureuses et hétérozygotes capables de s'adapter et de coloniser de nouveaux habitats permettant d'accroître l'aire géographique du genre *Medicago* (Quiros et Bauchan 1988).

II.2. Historique de la classification du genre *Medicago* L.

Plusieurs classifications du genre *Medicago* furent proposées par plusieurs botanistes et taxonomistes (Urban 1872 in Schoulteten 2004 ; Heyn 1963 ; Lesins et Lesins 1979 ; Small et Jomphe 1989 ; Ernest *et al.* 1998).

Depuis le XVIème siècle, des espèces du genre *Medicago* ont été connues, plus de 9 espèces ont été mentionnées par Carl Von Linné en 1753 (in Heyn 1963). Un premier effort de synthèse a été effectué par Urban (1872, in Heyn 1963), mais d'une manière relativement incomplète. Heyn, en 1963, a réalisé un ouvrage sur le genre *Medicago* dans lequel elle a détaillé particulièrement les taxons de la section *Spirocarpos*.

Sur la base de la morphologie des gousses et des graines, Lesins et Lesins (1979) ont réalisé sur le même genre une monographie plus complète comprenant 55 espèces (Tableau 4) dont 33 sont annuelles, 21 sont pérennes et une est arbustive d'une pérennité variable (*M. arborea*), classées en 4 sous-genres (*Lupularia*, *Orbicularia*, *Spirocarpos* et *Medicago*). Entre ces deux dernières monographies, les différences se situent principalement au niveau de l'unité taxonomique. Au niveau des *Spirocarpos* (où se trouve la majorité des espèces annuelles de *Medicago*), Lesins et lesins (1979) avaient réalisé certains changements par rapport à la monographie de Heyn (1963): ils ont changé le nom de *M. aculeata* en *M. doliata* ; ont classé *M. soleirolii* dans le groupe des *Pachysperae* au lieu de *Rotatae* ; ont considéré la variété *shephardii* de l'espèce *M. tornata* comme espèce du groupe *Pchyspirae* et, enfin, ils ont considéré les variétés de *M. intertexta* var. *intertexta* et var. *ciliaris* comme deux espèces.

Le plus important et le plus récent enrichissement du genre *Medicago* provient particulièrement du transfert dans ce genre de 23 espèces de Trigonelles (Small *et al.* 1987). Actuellement, 86 espèces du genre *Medicago* sont reconnues (Small et Jomphe 1989). Dans le genre *Medicago* la notion d'espèce n'est pas toujours claire, particulièrement chez les plantes pérennes. Comparées à ces dernières, il semble que les espèces annuelles soient relativement fixées (Bena *et al.* 1998). L'organisation de Small et Jomphe (1989) des espèces pérennes ne correspond pas à celle établie par Lesins et Lesins (1979) pour certains taxons. En effet, des espèces définies comme tel par Lesins et Lesins (1979) ont été réduites, par Small et Jomphe (1989), à des sous-espèces (*M. glomerata* est devenu ssp. de *M. sativa*) et d'autres espèces ont été enrichies en sous-espèces (*M. papillosa* a été subdivisée en deux sous-espèces ssp. *papillosa* et ssp. *macrocarpa*). Les espèces annuelles les plus connues telles que *M. truncatula*, *M. polymorpha*, *M. rigidula*, *M. minima*, *M. ciliaris*... font partie du sous-genre *Spirocarpos* qui comprend quatre sections : *Rotatae*, *Pachysperae*, *Leptospirae* et *Intertextae* (Lesins et Lesins 1979).

Tableau 4 : Classification des espèces du genre *Medicago* selon Lesins et Lesins (1979)

Sous-genre	Section	Sous-section	Espèce	Nombre chromosomique (2n)	Type d'espèce
<i>Lupularia</i>	-	-	<i>M. lupulina</i>	16,32	A,B
			<i>M. secundiflora</i>	16	A,B
<i>Orbicularia</i>	<i>Carstiensae</i>	-	<i>M. carstiensis</i>	16	P
	<i>Platycarpae</i>	-	<i>M. platycarpa</i>	16	P
			<i>M. ruthenica</i>	16	P
	<i>Orbiculres</i>	-	<i>M. orbicularis</i>	16	A
	<i>Hymenocarpos</i>	-	<i>M. radiata</i>	16	A
	<i>Heyniana</i>	-	<i>M. heyniana</i>	16	A
<i>Cretaceae</i>	-	<i>M. cretacea</i>	16	P	
<i>Falcago</i>	<i>Falcago</i>	<i>Falcatae</i>	<i>M. falcata</i>	16,32	P
			<i>M. sativa</i>	16,32	P
			<i>M. glomerata</i>	16	P
			<i>M. glutinosa</i>	32	P
			<i>M. prostrata</i>	16,32	P
		<i>Rupestres</i>	<i>M. rhodopea</i>	16	P
			<i>M. saxatilis</i>	48	P
			<i>M. rupestris</i>	16	P
		<i>Daghestanicae</i>	<i>M. cancellata</i>	48	P
			<i>M. daghestanica</i>	16	P
	<i>Papillosae</i>	<i>M. pironae</i>	16	P	
		<i>M. dxhawakhetica</i>	32	P	
	<i>M. papillosa</i>	16,32	P		
	<i>Arobeae</i>	-	<i>M. arobea</i>	32,48	P
	<i>Marinae</i>	-	<i>M. marina</i>	16	P
<i>Suffruticosae</i>	-	<i>M. hybrida</i>	16	P	
		<i>M. suffruticosa</i>	16	P	
<i>spirocarpos</i>	<i>Rotatae</i>	-	<i>M. rotata</i>	16	A
			<i>M. bonarotina</i>	16	A
			<i>M. noeana</i>	16	A
			<i>M. shephardii</i>	16	A
			<i>M. rugosa</i>	30	A
	<i>Pachyspirae</i>	-	<i>M. scutellata</i>	30	A
			<i>M. soleirolii</i>	16	A
			<i>M. tornata</i>	16	A
			<i>M. littoralis</i>	16	A
			<i>M. truncatula</i>	16	A
<i>M. rigidula</i>			14	A,B	
<i>M. murex</i>			14,16	A	
<i>M. constricta</i>			14	A	
<i>M. turbinata</i>	16	A			
<i>M. doliata</i>	16	A			
<i>spirocarpos</i>	<i>Leptospirae</i>	-	<i>M. sauvagei</i>	16	A
			<i>M. laciniata</i>	16	A
			<i>M. minima</i>	16	A
			<i>M. praecox</i>	16	A
			<i>M. coronata</i>	16	A
			<i>M. polymorpha</i>	14	A,B
			<i>M. arabica</i>	16	A
			<i>M. lanigera</i>	16	A
			<i>M. disciformis</i>	16	A
	<i>M. tenoreana</i>	16	A		
<i>Intertextae</i>	-	<i>M. intertexta</i>	16	A	
		<i>M. ciliaris</i>	16	A	
		<i>M. muricoleptis</i>	16	A	
<i>M. granadensis</i>	16	A			

A : Annuelle, P : Pérenne, B : Bisannuelle

(Jules 1992)

La plus récente classification de *Medicago* (Small et Jomphe 1989) comparée à la monographie de Lesins et Lesins (1979) ne présente pas beaucoup de changement dans ce groupe (*Spirocarpos*) ; elle se limite à une addition de nouvelles espèces chez les *Pachysperae* (*M. rigidoloides*, *M. sphaerocarpos* et *M. syriaca*) et les *Leptospirae* (*M. laxispira*) et à l'adoption du nom de l'espèce *M. blancheana* (Heyn 1963) au lieu de *M. bonarotiana* (Lesins et Lesins 1979).

II.3. Origine géographique et évolution

La plus vieille référence connue de culture de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) date de 1 300 ans avant J.C. en Turquie. Mais son extension en Europe n'a débuté réellement qu'avec l'Empire romain (Génier *et al.* 1992), même si les phéniciens l'ont introduit dans le bassin méditerranéen occidental. Elle se répand ensuite et à la fin du XVIII^e siècle, sa zone de culture est mondiale (Michaud *et al.* 1988). En effet, d'après Vavilov (1949, dans Quézel 2000), Harlan (1971) et Smith (1996) le centre d'origine de *Medicago* est le croissant Fertile qui correspond à la région géographique occupée par la Palestine, la Cisjordanie, le Liban et des parties de la Jordanie, la Syrie, l'Irak, l'Égypte et le sud-ouest de la Turquie d'où il aurait été apporté en Europe par le roi perse Darius. Des études assez récentes ont placé l'origine du genre *Medicago* dans le Caucase (Lesins et Lesins 1979), avec des extensions vers le Nord-Ouest de l'Iran et le Nord-Est de la Turquie (Quiros et Bauchan 1988). Béna (1998), dans son étude phylogénétique, a soutenu l'hypothèse d'une origine du genre *Medicago* dans une région recouvrant l'Iran, l'Anatolie et le Caucase.

Ces régions sont connues par leur richesse en espèces pérennes, espèces dont on suppose qu'elles représentent l'état ancestral du genre. Heyn (1963), Lesins et Lesins (1979) et Small et Jomphe (1989) suggèrent que l'état ancestral du genre *Medicago* serait pérenne allogame et que les espèces annuelles autogames dériveraient de ces espèces il y a 6 ou 7 millions d'années. D'après Lesins et Lesins (1979), les espèces pérennes allogames auraient colonisé la plaine méditerranéenne alors que celle-ci était asséchée. La colonisation de cette zone, très chaude et où les pollinisateurs ne devaient pas être fréquents, se serait faite grâce à une apparition de l'autogamie chez ces pérennes. La réouverture de la jonction avec l'Atlantique (au miocène) aurait provoqué une montée rapide des eaux. Des modifications rapides de milieux, et notamment d'amples variations des niveaux de la mer, auraient alors sélectionné des espèces annuelles parmi les espèces autogames, mieux adaptées aux variations écologiques. L'évolution

du genre *Medicago* s'est accompagnée de modifications morphologiques et biologiques. Les formes annuelles sont strictement autogames très souvent diploïdes et ont généralement des graines plus grosses que les espèces pérennes.

Géographiquement, les espèces pérennes et annuelles du genre *Medicago* ne se distribuent pas de la même manière. Les espèces annuelles sont cantonnées particulièrement dans la région méditerranéenne. Par contre, les espèces pérennes sont à large distribution et se localisent plutôt à l'Est de la Méditerranée et principalement au Centre et à l'Ouest asiatique (Figure 5).

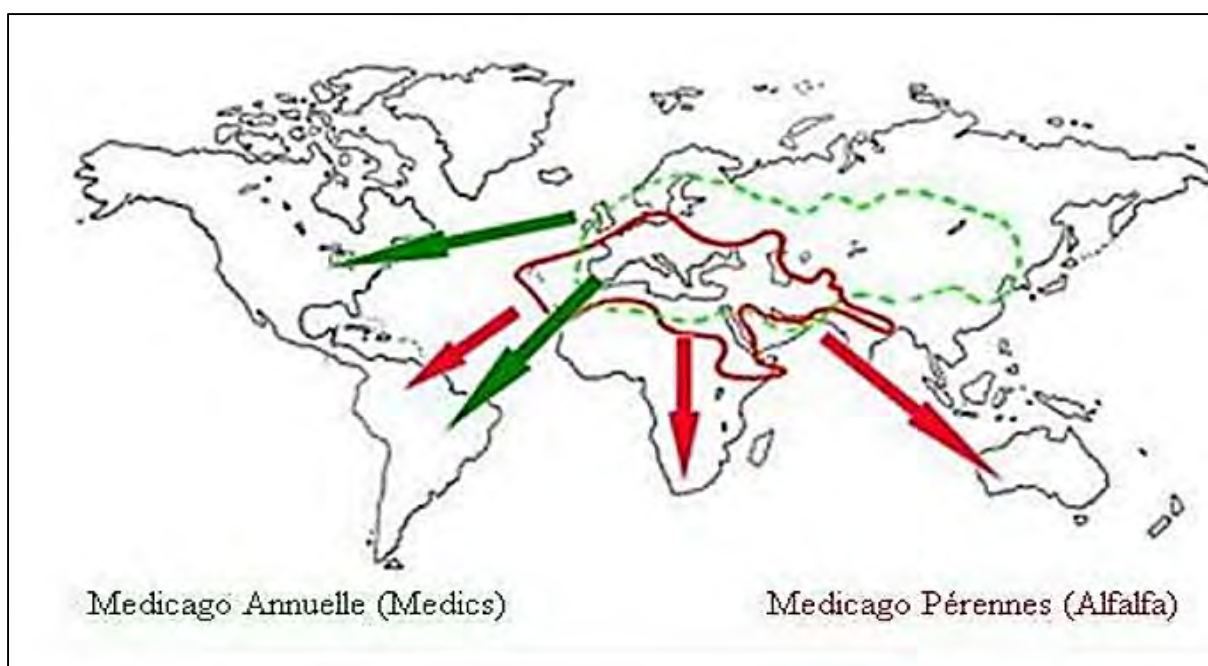


Figure 5: Origine géographique des *Medicago* (Delalande *et al.* 2007)

II.4. L'aire de répartition du genre *Medicago*

Pour Lapeyronie (1982), les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides. Elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient). Certaines ont été introduites en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord. D'après Derek et Ernest (1997), elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes. Les travaux de Mathieu (2003) et Hireche (2006) affirment qu'au cours du XIX^{ème} siècle, Les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne, elles ont ensuite envahi d'autres parties du

monde (Figure 6), en particulier les continents américains et australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (Delalande *et al.* 2007).

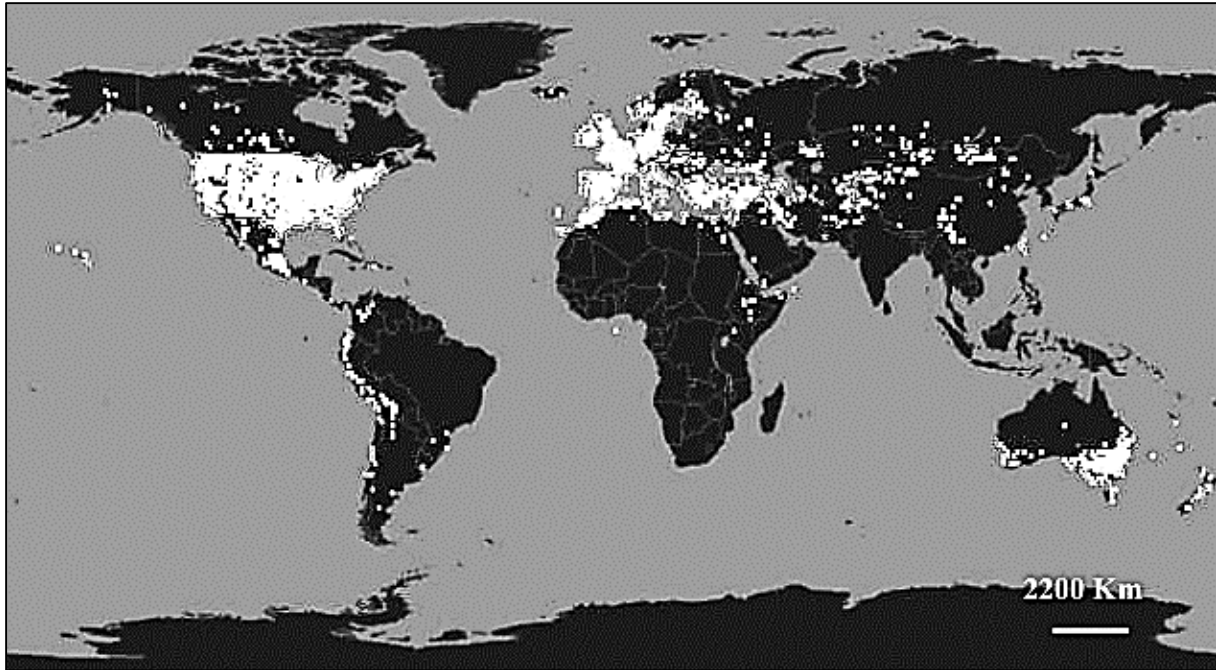


Figure 6: Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde
(Prolea 2002)

Les luzernes annuelles ont parfois des distributions très limitées. Certaines espèces étant endémiques, alors que d'autres sont colonisatrices. Une étude plus précise de la distribution des espèces a été faite à partir des prospections de matériel spontané entreprise depuis de nombreuses années sur l'ensemble du bassin méditerranéen (Prosperi *et al.* 1993). Les espèces annuelles de *Medicago* se retrouvent dans tous les étages bioclimatiques : de l'humide au saharien. Certains espèces sont à large spectre de répartition, d'autres ont une distribution spatiale plus délimitée. *M. truncatula* et *M. polymorpha*, présentes dans tous les étages bioclimatiques, sont considérées comme des formes ubiquistes, un ensemble d'espèces formé par *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. orbicularis* et *M. murex*, s'étend de l'étage humide au semi-aride. Tandis que *M. laciniata* et *M. minima* sont présentes du semi-aride au saharien. Les *Medicago* pérennes se rencontrent essentiellement sur les rives nord de la Méditerranée et s'étendent jusqu'en Asie centrale ; quelques formes spontanées sont localisées sur les hauts plateaux des chaînes de l'Atlas Nord-Africain. Dans le complexe d'espèces pérennes, l'infertilité est entretenue naturellement entre les différentes formes spontanées qui le

composent. Ainsi, le maintien de types différents (populations naturelles ayant des caractères singuliers) est dû essentiellement à l'isolement géographique.

II.5. Description botanique de la plante *Medicago*

Les espèces du genre *Medicago* sont des plantes annuelles ou vivaces, le plus souvent herbacées, parfois aussi de petits arbustes comme *Medicago arborea*, à de fortes racines pivotantes pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur. Ses tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentés au sommet (Figure 7). Les stipules sont larges de forme allongée ou cordiforme. Les inflorescences dont la couleur varie du mauve au jaune sont soit en grappe, soit portées sur un long racème qui contient jusqu'à 20 fleurs (Lapeyronie 1982 ; Mathieu 2003). La fécondation est allogame chez les espèces vivaces et autogame chez les espèces annuelles (Prosperi *et al.* 1993). Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille, soit spiralée (de 1 à 4 spires) parfois épineuse (Figure 8). La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 10 mm (Mathieu 2003 ; Hireche 2006).



Figure 7: Feuilles de différents écotypes du genre *Medicago* (Delalande *et al.* 2007).



Figure 8: Gousses de *Medicago truncatula* (Ramakrishnan *et al.* 2006).

Chez les plantes des espèces annuelles de *Medicago*, la morphologie et l'architecture varient fortement entre les génotypes de la même espèce. Elles sont très dépendantes de l'environnement et des conditions de culture (Delphine 2006).

III. Le genre *Trifolium* L.

Le genre *Trifolium* L. est l'un des plus grands genres de la famille des légumineuses, avec environ 255 espèces qui sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agro-écologiques (Zohary et Heller 1984 ; Gillet et Taylor 2001). Les espèces du genre *Trifolium* ou les trèfles sont d'une importance agricole considérable et sont largement cultivées comme plantes fourragères, des engrais verts et des herbes précieuses dans la médecine populaire de diverses cultures. Au moins 16 espèces (*T. pratense* L., *T. repens* L., *T. resupinatum* L., *T. incarnatum* L., *T. hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T. subterraneum* L., *T. fragiferum* L. et *T. medium* L...), sont activement cultivées (Gillett et Taylor 2001), un assez grand nombre pour un seul genre. Les espèces introduites sont devenues largement naturalisées dans le monde entier et de nombreuses espèces indigènes sont également fortement utilisées pour les pâturages (Crampton 1985). Les nodules racinaires fixateurs d'azote ont été rapportés chez plus de 125 espèces de trèfle (Sprent 2001). Parmi les espèces qui ont été étudiées, la nodulation est établie par la micro-symbiote *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* (Sprent 2001).

III.1. Taxonomie et Génétique

Comme les autres grands genres de la famille des légumineuses (e.g. *Astragalus*, *Indigofera* et *Mimosa*), une spéciation dans le genre *Trifolium* est accompagnée par une diversification des structures liées à la dispersion des graines. Contrairement à ces genres, les fruits du trèfle sont assez invariables, mais la corolle et le calice sont plus variables et responsables de la diversité des mécanismes de dispersion (Zohary 1972). Cette diversité florale a conduit à des propositions classiques (Presl, 1831) et récentes pour diviser le genre *Trifolium* en séries de genres plus petits (Hendrych 1976 ; 1978 ; Khokhrjakov 1998 ; Roskov 1990 ; Soják 1986 ; see also Small 1987). Presl (1831) reconnut 9 sections, dont la majorité sont encore retenues aujourd'hui, mais certaines sous des noms différents. Le nombre de sections a été ramené à 7 par Boissier (1872-1873). Hossain (1961) a classifié le genre en 8 sous-genres.

Dans une classification des espèces en fonction de la morphologie, les taxons ont été divisés en 8 sections (Zohary et Heller 1984). Ces sections ont été nommées : *Lotoidea*,

Paramesus (C.Presl), *Mystillus* (C.Presl), *Vesicaria*, *Chronosemium*, *Trifolium*, *Trichocephalum* Koch et *Involucrarium* Hooker. Six sections sur ces 8 ont été limitées à l'Ancien Monde ou l'Eurasie et certaines s'étendent à l'Afrique (Tableau 5). Seule la section *Involucrarium* a été distribuée dans le Nouveau Monde, dans le Nord et le sud d'Amérique (Zohary et Heller 1984 ; Steiner *et al.* 1997). La monographie complète de Zohary et Heller (1984) résume la vaste histoire taxonomique du genre *Trifolium* et fournit des descriptions détaillées et des illustrations de toutes les espèces reconnues.

Ellison *et al.* (2006), dans une analyse phylogénétique basée sur l'ADN, ont proposé d'élever la section *Chronosemium* à un sous-genre. Suite à cette classification, les autres espèces de *Trifolium* sont placées dans le sous-genre *Trifolium*, qui est classifié lui-même en huit sections (Tableau 5).

Les nombres chromosomiques dans le genre *Trifolium* sont connus pour au moins 184 espèces (Taylor *et al.* 1979 ; Zohary et Heller 1984 ; Goldblatt et Johnson 2003). Ils forment des séries aneuploïdes, avec des nombres de base $x = 8, 7, 6$ et 5 . Le nombre $x = 9$ est relativement rare (Fernandes et Queiroz 1978). $x = 8$ est le nombre de base inféré du genre avec plus de 80% des espèces étudiées sont $2n = 16$ (Goldblatt 1981). Zohary et Heller (1984) sont d'accord avec Senn (1938) en considérant que $x = 8$ est le nombre chromosomique de base du genre, et à partir duquel les nombres $x = 7, 6$ et 5 sont dérivés.

L'aneuploïdie ($2n = 10, 12$, ou 14) est connu chez 31 espèces, dont 11 sont à la fois aneuploïdes et diploïdes ($2n = 16$) ou polyploïdes. La polyploïdie est connue chez 24 espèces, dont six sont exclusivement tétraploïdes, deux sont hexaploïdes et une espèce est décuploïde ($12x$). Onze espèces présentent les deux niveaux de ploïdie ; diploïdes et polyploïdes, tandis que, trois ont de multiples niveaux polyploïdes ; du tétraploïde et plus (Ellison *et al.* 2006).

Les espèces ayant le nombre chromosomique $x = 8$ appartiennent à toutes les sections, tandis que $x = 7$ se limite aux sections *Chronosemium* Ser., *Trifolium*, et *Trichocephalum* W. D. J. Koch. Les nombres $x = 6$ et 5 concernent les deux dernières sections. Ce sont les sections les plus avancées du genre (Pritchard 1962). Les espèces de la section *Lotoidea* Crantz ont des chromosomes plus longs et une polyploïdie plus élevée que celles des autres sections (Zohary et Heller 1984 ; El Kholy 1990). Les différences en caryotype entre les espèces et les sections ont été décrites plus en détail par Chen et Gibson (1971), Angulo *et al.* (1972), et Petrova et Kozhuharov (1982).

Tableau 5 : Classification du genre *Trifolium* proposée par Ellison et al. (2006) comparée à celle de Zohary et Heller (1984)

Classification de Ellison et al. (2006)	Classification de Zohary et Heller (1984)	Distribution Native	Nombre d'espèces
Sous-genre <i>Chronosemium</i> (Ser.) Reichenb.	Sect. <i>Chronosemium</i>	Région Méditerranéenne	20
Sous-genre <i>Trifolium</i>			
sect. <i>Glycyrrhizum</i> Bertol.	<i>T. alpinum</i> and <i>T. polyphyllum</i> de la sect. <i>Lotoidea</i>	Alpes Européens—Caucase Mts.	2
sect. <i>Paramesus</i> (C. Presl) Berchtold and J. Presl	sect. <i>Paramesus</i>	Région Méditerranéenne	2
sect. <i>Lupinaster</i> (Fabricius) Ser.	<i>T. eximium</i> , <i>T. gordejewii</i> et <i>T. lupinaster</i> de la sect. <i>Lotoidea</i>	Est de l'Europe—Sibérie	3
sect. <i>Trifolium</i>	sect. <i>Trifolium</i>	Région Méditerranéenne Sud de l'Afrique (1)	73
sect. <i>Trichocephalum</i> Koch	sect. <i>Trichocephalum</i>	Région Méditerranéenne	9
sect. <i>Vesicastrum</i> Ser.	sects. <i>Mistyllus</i> , <i>Vesicaria</i> , et une partie de la sect. <i>Lotoidea</i>	Région Méditerranéenne L'Afrique subsaharienne, Madagascar (1)	54
sect. <i>Trifoliastrum</i> S.F. Gray	une partie de la sect. <i>Lotoidea</i>	Région Méditerranéenne	20
sect. <i>Involucrarium</i> Hooker	une partie de la sect. <i>Lotoidea</i>	Amerique du sud et Amerique du nord	72

III.2. Origine et aire de Répartition

La distribution native de *Trifolium* (Figure 9, Tableau 5) englobe les régions tempérées et, dans une moindre étendue, les régions subtropicales des hémisphères Nord et Sud. Il est particulièrement fréquent dans l'hémisphère Nord. Les principaux centres se trouvent en Eurasie (150-160 espèces), en Amérique du Nord (60-65 espèces) et en Afrique (25-30 espèces) (Zohary et Heller 1984). Les espèces de *Trifolium* se produisent dans un large éventail d'habitats, y compris les pâturages, les prairies, les forêts ouvertes, les régions semi-désertiques, les montagnes et les sommets des Alpes. Une caractéristique commune de ces habitats divers est la haute radiation solaire ; peu d'espèces de trèfle tolèrent l'ombre (Ellison *et al.* 2006).

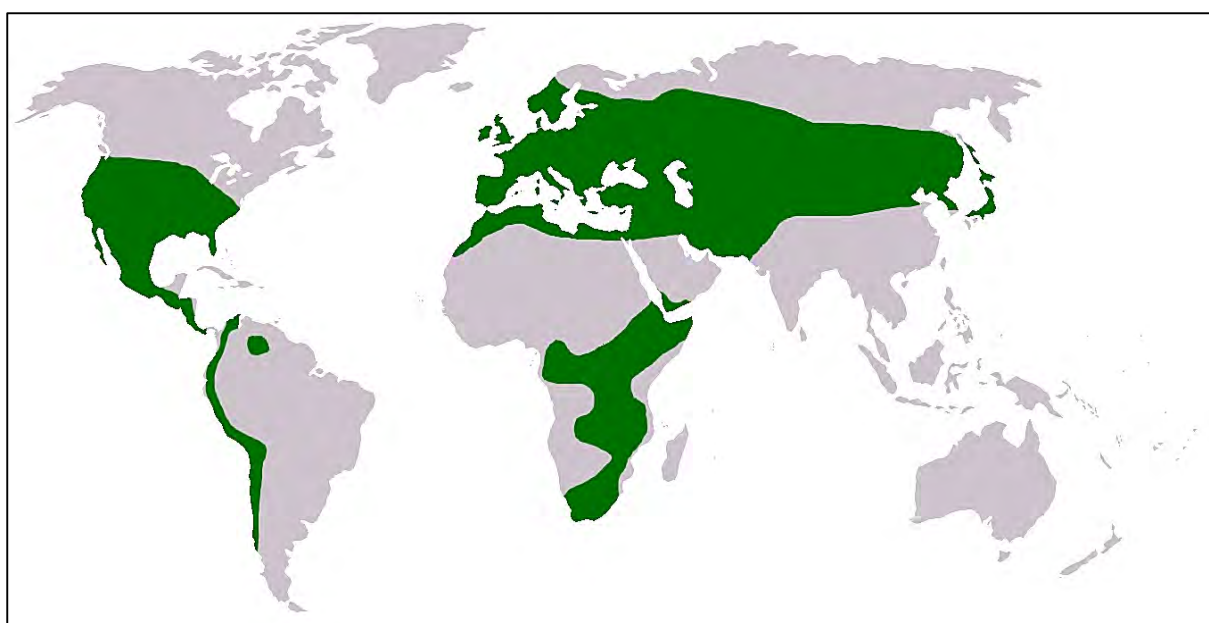


Figure 9: Distribution géographique du genre *Trifolium*

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium_Distribution.png)

Le bassin méditerranéen, le Nord-ouest de l'Amérique et les hauts plateaux de l'Est d'Afrique sont les trois régions géographiques qui présentent la plus grande diversité des espèces du genre *Trifolium* (Zohary et Heller 1984). Des travaux récents soutiennent l'origine méditerranéenne du genre dans la période du Miocène précoce (Ellison *et al.* 2006). Les trèfles autochtones sont absents dans le Sud-est de l'Asie et en Australie.

III.3. Description botanique

Toutes les espèces sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces. Souvent prostrées et rarement de plus de 50 cm de hauteur. En général, les espèces annuelles sont auto-

fertiles et les plantes vivaces auto-incompatibles. Le nom du genre vient du latin Tri = « Trois » et folium = « feuille », et fait référence aux feuilles distinctives habituellement composées de trois folioles (trifoliées). Ces folioles sont presque toujours dentées, parfois maculées en leur centre. L'inflorescence comporte de nombreuses fleurs de taille petite à moyenne (environ 0.3-2.5 cm), groupées en têtes sous forme d'une grappe, et qui ressemble soit à un capitule en boule, soit à un épi. Les pédoncules s'alignant en étages serrés le long de l'extrémité de la tige. Le calice de la fleur compte cinq dents, avec une corolle typique des Fabacées (étendard, ailes et carène), avec des ailes plus longues que la carène et un étendard érigé généralement recourbé vers le haut dans la majorité des espèces. L'androcée est diadelphie (étamines assemblées en deux groupes). Les fruits sont des petites gousses à l'intérieur du calice, contenant de une à quatre graines (Ellison *et al.* 2006).

IV. Diversité génétique

Chez les végétaux, il existe non seulement une abondante diversité des espèces, sauvages ou cultivées, mais également de très nombreuses variantes entre les individus au sein d'une même espèce (variabilité génétique). C'est cette diversité génétique (aussi appelée Ressources génétiques) qui constitue la matière première du sélectionneur pour créer de nouvelles variétés. Ces ressources génétiques représentent un patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux connaître afin de mieux l'utiliser. Ainsi, la collecte, la caractérisation et la conservation de ces ressources sont des activités indispensables à la création des variétés de demain.

IV.1. Biodiversité ou diversité biologique

La biodiversité est définie par convention comme étant "la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie" (Extraits de la Convention sur la diversité biologique (PNUE, 5 juin 1992). Cela inclut la diversité au sein des espèces (diversité génétique) et entre espèces (diversité d'espèces) ainsi que celle des écosystèmes (diversité d'écosystèmes). La biodiversité couvre les trois niveaux d'organisation biologique : génétique, taxonomique et écologique. Elle comprend aussi les relations et interactions existant à l'intérieur et entre ces trois niveaux hiérarchiques (Parizeau 1997).

La biodiversité est dynamique : la composition génétique des espèces change au cours du temps en réponse aux pressions de la sélection naturelle et humaine. La présence et l'abondance

relative d'espèces dans les communautés écologiques sont modifiées sous l'effet de facteurs physiques et écologiques.

IV.2. Diversité génétique : définition et intérêt

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (Parizeau 1997). C'est la diversité intra-spécifique (polymorphisme génétique) qui représente le potentiel et la capacité à répondre aux changements environnementaux, à la fois sur le court terme (faculté d'adaptation) et sur le long terme (potentiel d'évolution). La richesse des espèces est la mesure d'évaluation de la biodiversité la plus largement utilisée (Lewin 1992).

Dans l'agriculture, la diversité génétique est exploitée pour créer des variétés adaptées à différents environnements et conditions de croissance. L'aptitude de telle ou telle variété à résister à la sécheresse ou à l'inondation, à se développer sur un terrain pauvre ou riche, à résister à de nombreuses espèces d'insectes ravageurs ou maladies, à fournir des produits riches en protéines ou ayant de meilleures qualités gustatives, est un caractère transmis par les gènes. Ces ressources génétiques sont la matière première qu'emploient les sélectionneurs de plantes et les spécialistes de la biotechnologie pour produire de nouvelles variétés. Sans cette diversité, nous ne pourrions plus adapter les cultures à l'évolution constante des besoins et des conditions.

La diversité naturelle des plantes a fasciné l'humanité à travers l'histoire, principalement en raison de la variation énorme qui existe pour la morphologie ainsi que d'autres traits de développement. Les effets de forme physique d'une telle variation naturelle présente parmi des espèces (interspécifique) ont conduit à l'évolution de plantes par sélection naturelle, cette diversité de développement étant la base de la taxonomie et de la phylogénie (Cronk 2001).

En outre, une variation comparable liée au développement existe dans beaucoup d'espèces (intraspécifiques), reflétant probablement des adaptations à différents environnements naturels. Cette variation intra spécifique a été employée pour la domestication et l'amélioration génétique de plus de 100 espèces de plantes (Alonso-Blanco *et al.* 2005) en appliquant une sélection dirigée sur des aspects multiples liés au développement. De cette façon, des variétés adaptées à

divers environnements agricoles et avec un rendement accru ont été produites chez beaucoup de plantes cultivées pour la nourriture humaine par exemple le blé dur.

Un défi important de biologie est de comprendre la base génétique et les mécanismes moléculaires de toute cette variation naturelle au niveau du nucléotide, de la protéine et de la cellule (Alonso-Blanco *et al.* 2005). Cette analyse a commencé tout récemment grâce à la disponibilité de séquences entières de génome, qui permettent le développement des outils génomiques visant l'identification des fonctions de gènes dans les espèces modèles comme *A. thaliana* et le riz.

IV.3. La conservation des ressources génétiques

Dans le souci de conserver la diversité génétique de plusieurs espèces de plantes, de nombreuses collections de génotypes ont été assemblées autour du monde. Pour une meilleure évaluation et utilisation de ces collections, il était nécessaire d'identifier un petit nombre d'individus ou une core collection représentative de la variation génétique de la collection entière. D'après Brown (1989b ; 1989a), une core collection de 10% d'accessions contient théoriquement 70% des allèles de la collection entière.

Ces cores collections sont établies par différentes méthodes de maximisation de diversité comme le groupement par la moyenne de la distance Euclidienne entre différents génotypes sur la base de différents caractères agronomiques (Skinner *et al.* 1999). Diwan *et al.* (1995) ont comparé plusieurs méthodes, pour une collection aux Etats Unis d'espèces annuelles de *Medicago*, dans l'objectif d'optimiser l'obtention de cores collections.

IV.4. Les principaux facteurs de la diversité génétique

La source ultime de la diversité biologique réside dans la variabilité inscrite dans le patrimoine génétique des organismes. C'est au niveau de ce patrimoine que l'on doit rechercher les mécanismes fondamentaux qui sont à l'origine de la diversification du vivant (Lévêque et Mounoulou 2001). Le degré de subdivision génétique d'une espèce dépend de l'action respective des quatre forces évolutives : mutation, sélection, dérive et migration. Tout facteur intervenant sur l'une de ces forces peut affecter la subdivision génétique de l'espèce elle-même. Les flux de gènes (migration) interviennent directement sur le degré d'organisation de la diversité génétique des plantes.

IV.4.1. Transfert des gènes

Chez les plantes, les flux de gènes n'ont lieu que lors de la dispersion du pollen et des graines. Cependant, il est nécessaire de différencier les composants pollen et graines car leurs rôles dans la dynamique de la diversité des populations ne sont pas identiques. Ils diffèrent d'un point de vue quantitatif car le pollen et les graines contribuent inégalement aux flux de gènes réalisés mais aussi d'un point de vue qualitatif car ils agissent de manière asymétrique dans la contribution à la diversité génétique. Les contributions relatives des graines et du pollen aux flux des gènes varient très fortement selon les espèces (Ouborg *et al.* 1999). Le pollen est souvent considéré comme la composante majeure des flux des gènes car ses capacités de dispersion sont plus grandes que celles des graines (Ennos 1994). La dispersion du pollen à longue distance a été confirmée par des études (Smouse et Sork 2004 ; Latta *et al.* 2006). Cependant, des études récentes montrent que la dispersion des graines peut être égale ou bien supérieure à celle du pollen chez certaines espèces (Baclers *et al.* 2006 ; Garcia *et al.* 2007). Les flux des gènes par graines et par pollen sont à l'origine de la dynamique d'évolution de la diversité génétique chez les plantes (Gerber *et al.* 2003).

IV.4.2. Les mutations

Les mutations apparaissent toujours d'une manière aléatoire. Lors d'une mutation, l'altération de la séquence des nucléotides engendre une modification de génotype, se traduit ou non par un changement de phénotype observable (Alonso-Blanco *et al.* 2005). Ce changement permet de repérer la mutation, en la rendant perceptible au niveau de l'organisme. Les mutations peuvent se produire à trois niveaux différents (Alberts *et al.* 2002 ; Feuk *et al.* 2006) :

- Les mutations géniques « ponctuelles » impliquent des erreurs de petite taille dues au changement d'une base par une autre ou l'addition ou la délétion de quelques nucléotides dans une séquence d'ADN.
- Les altérations chromosomiques entraînant des modifications importantes de la structure des chromosomes (telles que des translocations, délétions, inversions) par gain, perte ou réarrangement de segments chromosomiques.
- Mutations génomiques concernent le changement du nombre de chromosomes sans changement de structure de ces derniers (aneuploïdie et polyploïdie).

IV.4.3. La transposition

Les éléments transposables ou transposons constituent une autre cause essentielle de variation. Ce sont des séquences du génome qui sont mobiles. Elles sont capables de se transposer d'un endroit génomique à un autre à l'aide de transposases. Les transposons provoquent des réarrangements génomiques tels que l'inversion, la translocation, la duplication, la délétion et l'insertion (Singleton 1994).

IV.4.4. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue désigne l'échange génétique entre des séquences homologues. Cela induit des variations dans les séquences des gènes existants plutôt qu'introduire de nouvelles informations génétiques dans le génome. Les deux types de recombinaisons homologues sont : Le crossing-over qui est une recombinaison réciproque et la conversion du gène qui est une recombinaison non réciproque. C'est la séquence d'ADN d'un segment du chromosome qui est remplacée par une séquence homologue d'un autre chromosome homologue ou non homologue (Lewin 1992).

IV.4.5. Divers processus favorisant et conservant la variabilité

La reproduction sexuée est le principal moteur de la variabilité génétique des populations. Les mécanismes favorables à l'allogamie encouragent la variabilité : c'est le cas des allèles d'auto incompatibilités chez les plantes. La diploïdie conserve la variabilité parce qu'elle la protège de la sélection des allèles récessifs rares. Lorsque l'hétérozygote est avantage, il est sélectionné par rapport à chacun des homozygotes, ce qui conserve, dans la population, les deux allèles récessifs et dominant. Un des meilleurs exemples d'avantage de l'hétérozygotie est l'hétérosis.

Au sein des plantes cultivées et de leurs apparentés sauvages, l'hermaphrodisme est une condition courante et les systèmes de reproduction préférentiellement autogames sont fréquents (blé, riz, orge, soja, etc.). Les espèces autogames présentent, en moyenne, une diversité génétique intra-population plus faible que les espèces allogames et une très forte différenciation inter-population (Hamrick *et al.* 1991). Ces deux caractéristiques sont des conséquences immédiates du système de reproduction. La dérive génétique et les effets de la sélection sont accentués en régime de reproduction consanguin et la dispersion du pollen est réduite (Charlesworth *et al.* 1993). Une caractéristique inattendue, mais qui semble néanmoins générale, est l'existence d'importantes variations de diversité entre les populations d'une même

espèce. Certaines populations présentent des niveaux de variabilité supérieurs à ceux attendus en théorie (Schoen et Brown 1991). Le maintien de forts niveaux de diversité intra-population reste un sujet de débat et pose le problème du fonctionnement des populations autogames.

IV.5. Etude de la diversité génétique

L'utilisation de la diversité génétique dans un programme de sélection passe inévitablement par son estimation et par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. Les marqueurs génétiques sont des caractéristiques héréditaires qui renseignent sur le génotype qui le porte (De Vienne 1998). On appelle un marqueur génétique tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme. Le développement de la biochimie des protéines, de l'enzymologie puis de la biologie moléculaire du gène ont permis d'avoir accès soit au produit du gène, la chaîne peptidique, soit à la séquence du gène lui-même. Aussi, dans bien des cas, les analyses biochimique des protéines ou moléculaire du gène donnent accès à des polymorphismes sans traduction perceptible à l'échelle morphologique ou physiologique et permettent de percevoir, à cette échelle, un polymorphisme génétique non perceptible à l'échelle de l'organisme (Serre 2006). L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leurs distributions et leur évolution historique et aussi bien leur mécanisme d'interaction et leurs coévolutions avec les autres espèces (De Moraes *et al.* 2007).

Un marqueur génétique « idéal » doit être polymorphe (la matière première du généticien est la variabilité), multi-allélique, codominant (l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents), non épistatique (son génotype peut être lu à partir de son phénotype quelque soit le génotype des autres loci), neutre (les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques), insensible au milieu (le génotype peut être inféré à partir du phénotype quelque soit le milieu) (De Vienne 1998).

Trois types de marqueurs sont largement utilisés pour l'évaluation de la variabilité génétique, à savoir les marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires.

IV.5.1. Les marqueurs morphologiques

Dans les programmes de sélection des plantes, les caractères morphologiques sont les premiers à être observés. Ces caractères intéressent diverses parties de la plante, par exemple longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (Cui *et al.* 2001 ; Gomez *et al.*

2004). Ces caractères sont utilisés de même pour estimer la variation intra- et inter-populations. Ils sont généralement limités en nombre de caractères relevés et directement influencés par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson *et al.* 2006).

IV.5.2. Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs à avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (Harry 2001). En 1966, deux avancées, l'une conceptuelle et l'autre technologique, ont permis d'appréhender pour la première fois la variabilité génétique. En effet, l'étude des gènes pouvait être faite de façon indirecte au travers de l'étude de la séquence des acides aminés codés par ces gènes. En partant du principe que toute variation de la séquence d'acides aminés reflète une variation au niveau du gène codant pour cette protéine. L'avancée technologique repose sur la mise au point de l'électrophorèse des protéines (Harry 2001).

Les marqueurs biochimiques, dont les isoenzymes, ont été utilisés pour caractériser la diversité génétique de plusieurs plantes. Les isoenzymes constituent de multiples formes moléculaires de la même enzyme qui catalysent la même réaction dans la cellule. Elles se distinguent les unes des autres par des propriétés de détail, notamment par leurs coefficients cinétiques, leur spécificité, parfois par leur stabilité ou leur sensibilité à certains inhibiteurs (Pelmont 1995). Le terme isoenzyme est généralement utilisé pour désigner plusieurs formes moléculaires dérivées de loci génétiques différents. Cependant, le terme allozyme désigne plusieurs formes moléculaires dérivées de différents allèles situés dans le même locus génétique (Manchanko 2003). Leur révélation se fait par séparation électrophorétique des protéines suivie par une coloration spécifique des enzymes. Les séquences nucléotidiques codant une protéine équivalente partagent communément 40 à 100% d'identité entre elles (Boivin-Masson *et al.* 2006).

Les multiples formes moléculaires d'une enzyme sont causées par trois facteurs principaux qui sont :

- La présence de plus d'un locus de gène qui code l'enzyme,
- La présence de plus d'un allèle dans le même locus qui code l'enzyme,

- Les modifications post-traductionnelles qui sont les résultats d'une formation non génétique (Manchanko 2003). Les isoenzymes générées par les changements post-traductionnels sont appelées isoenzymes secondaires.

Des populations naturelles tunisiennes de *M. ciliaris* et *M. intertexta* ont été évaluées pour leur polymorphisme génétique à l'aide de 7 systèmes enzymatiques. Six loci polymorphes ont été distingués permettant une analyse du polymorphisme génétique existant entre ces deux espèces annuelles (Abdelkefi *et al.* 1997). La diversité génétique d'espèces annuelles de pois chiche a été étudiée par Labadi *et al.* (1996) à l'aide de marqueurs enzymatiques. Ces marqueurs ont également été utilisés en combinaison avec des marqueurs morphologiques pour comparer la structuration de la diversité génétique chez *M. sativa* (Jenczewski *et al.* 1999). Les allozymes ont l'inconvénient d'être lourds et difficiles à manipuler, de même qu'ils présentent une reproductibilité assez faible. Comme les marqueurs morphologiques, ils sont très sensibles à l'environnement.

IV.5.3. Les marqueurs moléculaires

Pendant longtemps, les caractères morphologiques ont été les seuls outils disponibles pour retracer l'histoire des populations. Toutefois, ce type de marqueurs ne rend souvent pas fidèlement compte de l'histoire des populations. En effet, il arrive fréquemment que les variations phénotypiques ne soient pas seulement liées à l'histoire évolutive des populations mais soient également déterminées par des facteurs tels que l'adaptation locale.

Les marqueurs moléculaires, réputés neutres (n'agissant pas sur les caractères sélectionnés), s'affranchissent de ces facteurs confondants et peuvent permettre d'accéder à l'histoire des populations. L'analyse de la diversité génétique neutre permet de comprendre la structuration spatiale de la diversité et de construire des hypothèses sur les différents événements liés à la domestication et à la diffusion de la plante (Nordborg *et al.* 2005).

Les marqueurs moléculaires sont basés sur la mise en évidence de variations de séquences nucléotidiques dans l'ADN entre les individus. Ils présentent comme avantage d'être pratiquement en nombre illimité. Leur niveau de variation (polymorphisme) est plus grand que pour les autres types de marqueurs. D'autre part, ils ne sont pas modifiés par le milieu ambiant ni par la nature de l'échantillon prélevé chez un individu. Les marqueurs moléculaires se classent en trois grands groupes : les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les

marqueurs basés sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) et les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

IV.5.3.1. Les marqueurs RFLP

Les marqueurs RFLP ou polymorphisme de longueur des fragments de restrictions constituent des marqueurs moléculaires basés sur les techniques d'hybridation. Les RFLP sont les premiers marqueurs moléculaires développés et ont été utilisés en 1980 dans la construction de la carte génétique humaine (Bostein *et al.* 1980). Quelques années plus tard, ces marqueurs sont adoptés pour la cartographie du génome végétal (Helentjaris *et al.* 1986) et particulièrement celui du blé *Triticum aestivum* (Chao *et al.* 1989 ; Nelson *et al.* 1995) et des *Aegilops* (*Aegilops tauschii*) (Lagudah *et al.* 1991 ; Gill *et al.* 1993).

Cette technique est basée sur la restriction enzymatique des ADN par des endonucléases reconnaissant des séquences courtes spécifiques. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et sont ensuite transférés sur une membrane selon la procédure de Southern blot. La taille des fragments est déterminée par hybridation des membranes avec des sondes (fragments d'ADN) marquées. Les sondes peuvent être des séquences d'ADN courtes et simples, de faibles copies d'ADN génomique ou encore des clones d'ADN complémentaire. Les mutations dans le génome entraînent la modification de certains sites de restriction d'où la génération de différents profils de restriction entre différents échantillons. Chaque fragment de taille différente engendré est considéré comme allèle et peut être utilisé en analyse génétique.

La technique RFLP est longue à développer et à mettre en œuvre, mais les marqueurs sont reproductibles et révèlent de nombreux allèles (De Vienne et Santoni 1998). En raison des difficultés techniques (clonage de la séquence sonde, son isolement, son amplification dans une cellule hôte et sa purification) et du développement de la PCR, les RFLP sont de moins en moins utilisés.

IV.5.3.2. Les marqueurs basés sur la PCR (Polymerase Chain Reaction)

La majorité des techniques actuelles de marquage moléculaire utilisent la PCR qui a été mise au point en 1985 par Kary Mullis (Cardinet 2000). C'est une technique d'amplification génique, c'est-à-dire qu'elle permet de multiplier un fragment d'ADN ou de gène, même présent en quantité infime (une molécule) dans un mélange. Une réaction PCR

standard correspond à la succession d'une quarantaine de cycles comportant chacun trois étapes à savoir la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Les réactifs nécessaires pour cette technique sont l'ADN, les amorces, l'enzyme Taq polymérase et les quatre nucléotides (dNTPs).

- Les marqueurs RAPD

Les RAPD ou 'Random Amplified Polymorphism DNA' ont été les premiers marqueurs basés sur la PCR (Williams *et al.* 1990 ; Welsh and Mac Clelland 1991). L'amplification des ADN par les marqueurs RAPD constitue l'amplification de séquences sélectionnées au hasard dans le génome par l'utilisation d'amorces non spécifiques. Sa principale variante consiste à utiliser comme amorce un seul oligonucléotide d'une dizaine de bases qui permet d'amplifier par PCR un ou plusieurs segments d'ADN de l'échantillon. Chaque bande de l'amplifié correspond à l'existence sur chacun des brins d'ADN d'un motif complémentaire à l'amorce.

Sur le plan génétique, la technique RAPD ne fournit pas de marqueurs spécifiques de locus, elle révèle conjointement plusieurs loci qui ne sont pas nécessairement conservés lorsqu'on change de fond génétique. En effet, cette technique permet de révéler un polymorphisme de présence /absence. Ainsi pour un locus donné, il y'a ou il n'y a pas d'amplification du fragment.

La technique RAPD jouit d'une grande popularité auprès des généticiens dans le domaine végétal. En effet, cette technique se caractérise par rapport à d'autres techniques (Mini satellites, SSR, RFLP, AFLP... etc.) par sa grande simplicité, rapidité de manipulation et nécessité d'une faible quantité d'ADN. Néanmoins, les RAPD présentent l'inconvénient d'être faiblement reproductibles. De plus, les marqueurs RAPD permettent de générer un taux élevé de polymorphisme qui a été largement utilisé chez les populations (Chalmers *et al.* 1992) et espèces comme le haricot, le pois et le pois chiche (Nesbitt *et al.* 1995 ; Weder 2002). Ces marqueurs ont aussi contribué chez les plantes à la construction de plusieurs cartes génétiques (Reiter *et al.* 1992), à l'identification des cultivars (Nybom 1994) et aussi aux études phylogénétiques chez plusieurs espèces comme le palmier dattier et le blé (Gupta *et al.* 2000).

- Les marqueurs AFLP

La technique AFLP (Amplified Fragments Length polymorphism) est une variante de la PCR développée en 1995 par Vos et ses collaborateurs. Cette technique est basée sur la détection par des amplifications sélectives de fragments d'ADN génomiques digérés. Les ADN

génomique sont doublement digérés par des endonucléases et les fragments obtenus sont sujet à une ligature avec des adaptateurs spécifiques. Les produits de la ligature sont ensuite amplifiés sélectivement moyennant des amorces complémentaires aux adaptateurs utilisés. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturé et révélés par radiographie ou au nitrate d'argent. Le Kit des AFLP a été premièrement optimisé chez les plantes à génome de taille petite (5×10^8 bp à 6×10^9 bp) (Ma et Lapitan 1998). Ces marqueurs se sont révélés très informatifs et ont permis de révéler jusqu'à 16 fois plus de loci que les marqueurs RFLP. Cette technique a été largement utilisée pour la détection du polymorphisme génétique et la détermination des liaisons en analysant des individus de populations isolées.

- Les marqueurs ISSR

Les ISSR ou 'Inter Simple Sequence Repeat' sont une variante de la PCR développés en 1994 par Zietkiewicz et ses collaborateurs. Cette technique exploite l'abondance aléatoire des SSR dans le génome des plantes. Les SSR étant des séquences répétées en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétra-nucléotidique générant un système de marqueurs multi locus très intéressant qui permet d'exploiter la distribution abondante et aléatoire des SSRs dans le génome des plantes. L'intérêt de cette technique est qu'elle ne nécessite aucune connaissance préalable de la séquence utilisée.

Cette technique a connu dans sa méthodologie plusieurs variations avec l'utilisation des gels d'acrylamides ou d'agarose et la révélation au nitrate d'argent, au bromure d'ethidium ou moyennant la radiographie.

Les marqueurs ISSR ont été largement utilisés pour les analyses du polymorphisme génétique au niveau intra- et inter- spécifique chez plusieurs espèces, citons le cas du maïs (Kantety *et al.* 1995), du riz (Joshi *et al.* 2000) des bananes (Godwin *et al.* 1997), la pomme de terre (Huang et Sun 2000) du Sorgho (Yang *et al.* 1996) et du lupin (Talhinhas *et al.* 2003).

Les ISSR se sont révélés très intéressants pour l'identification de certains cultivars comme dans le cas du chrysanthemum (Wolff *et al.* 1995) et encore pour la détermination de l'origine génomique de certaines espèces comme c'est le cas de l'éleusine (*Eleusine corocana*). Ces marqueurs ont contribué à l'évaluation de la diversité génétique chez le genre *Lupinus* et ont permis une séparation claire des espèces du nouveau et de l'ancien monde (Talhinhas *et al.* 2003).

- Les marqueurs microsatellites ou SSR

Les microsatellites ou séquences simples répétées (SSR) sont des loci polymorphes constitués de séquences répétées en tandem (1-6 bp) (Morgante et Olivieri 1993). La variation du nombre de répétitions du motif de base constitue la base du polymorphisme. Les SSR sont 'ubiquitaires' chez les procaryotes et les eucaryotes et sont présents même dans les génomes bactériens les plus petits (Field et wills 1996 ; Hancock 1996). Les microsatellites peuvent être présents aussi bien au niveau des séquences non codantes que codantes.

La technique SSR (Figure 10) se base sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique moyennant des amorces spécifiques flanquant les séquences répétées et la séparation des amplifiats par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

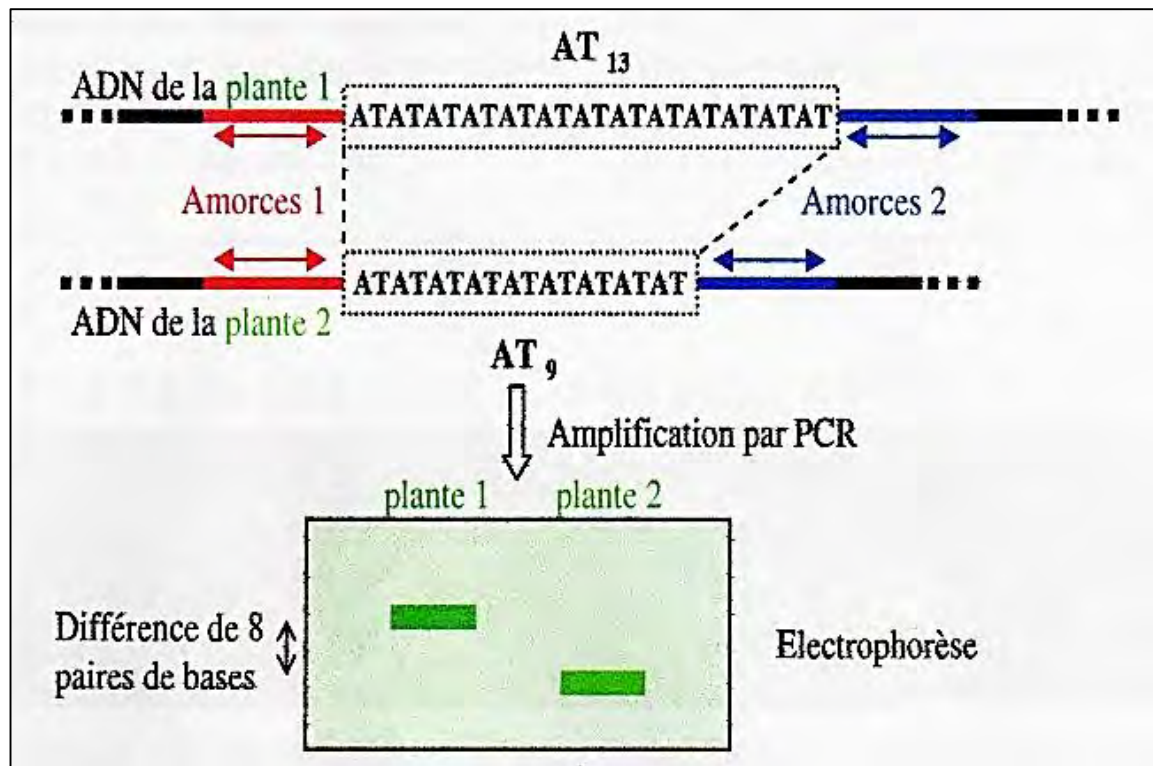


Figure 10: La détection d'un polymorphisme de répétition (SSR) (Moulet *et al.* 2008)

Les SSR se sont révélés des marqueurs moléculaires très utiles dans la sélection assistée par marqueurs, l'analyse de la diversité génétique et l'analyse de la génétique des populations chez plusieurs espèces (Gupta 2000 ; Budak *et al.* 2003).

Chez les légumineuses, des marqueurs microsatellites ont été massivement mis au point chez *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, deux espèces modèles des légumineuses, en utilisant des données de séquences produites dans des programmes de séquençage d'EST (fragment des gènes exprimés) ou d'ADN génomique. Dans le genre *Medicago* le nombre de marqueurs microsatellites disponibles dépasse un millier (Diwan *et al.* 2000 ; Baquerizo-Audiot *et al.* 2001 ; Eujayl *et al.* 2004 ; Chu *et al.* 2009).

Ces marqueurs ont été très utiles pour des recherches concernant la diversité génétique chez l'orge (Struss et Plieske 1998), la construction de cartes génétiques chez le pois chiche (Huttel *et al.* 1999), le blé (Roder *et al.* 1998), le pommier (Maliapaard *et al.* 1997), la canne à sucre (Rae *et al.* 2000), le riz (Temnykh *et al.* 2000), le kiwi (Testolin *et al.* 2001) et le tournesol (Tang *et al.* 2002 ; Mokrani *et al.* 2002 ; Yu *et al.* 2002, 2003 ; Micic *et al.* 2005 ; Poormohammed *et al.* 2007). On les a également utilisés dans l'identification des marqueurs liés à des gènes de résistance, comme le gène Yr15, conférant la résistance à la rouille chez le blé (Chargué *et al.* 1999).

IV.5.3.3. Les marqueurs SNP

Les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont une source importante de polymorphisme de l'ADN. Le changement d'un nucléotide par un autre est un processus bi-allélique codominant. Ceci peut être un processus synonyme n'entraînant pas de changement de l'acide aminé, ou encore non synonyme entraînant la substitution d'un acide aminé par un autre. Le changement au niveau d'un nucléotide peut aussi provoquer la création/abolition d'un site d'épissage ou encore un stop précoce (mutation non-sens) (Gut 2001).

Chez les plantes, les SNP sont des marqueurs génétiques utilisés dans plusieurs études de populations, dans le marquage des germoplasmes, dans la cartographie des gènes et dans les associations génotype/phénotype (Giancola *et al.* 2006).

IV.6. Analyse de la variabilité génétique

L'étude de la variabilité génétique permet de générer des résultats sous forme de tableaux complexes avec un ensemble de variables nombreuses et souvent de typologie diverses.

Les méthodes statistiques uni- ou multi variées permettent l'analyse de la similarité et de la diversité entre les entités étudiées ainsi que le calcul des paramètres génétiques des différentes populations. Les résultats obtenus peuvent aussi être résumés et classés en groupes

grâce à des techniques descriptives telles que les analyses factorielles et les méthodes de classifications.

IV.6.1. Méthodes de classification

La classification hiérarchique permet le regroupement ou le clustering d'un ensemble d'échantillons en se basant sur la notion de distance. En effet, le clustering consiste en le regroupement des échantillons en groupes/sous-groupes ou clusters partageant des caractéristiques communes. Les méthodes de classification sont des méthodes non paramétriques ne considérant qu'une seule hypothèse qui stipule que plus deux entités sont similaires plus elles ont de chance à faire partie du même groupe.

Pour réaliser un bon clustering, nous devons choisir le coefficient ou indice de similarité adéquat. Celui-ci dépend essentiellement du type de données à analyser. On distingue ainsi les indices de similarités binaires traitant les données discrètes de type présence/absence et les indices de similarités quantitatifs. Ces indices sont aussi classés selon qu'ils traitent ou pas la cooccurrence du zéro ou double absence comme étant une ressemblance. On parle ainsi d'indices symétriques pour le cas des indices qui considèrent la double absence comme la double présence, par opposition aux autres indices asymétriques (Sbabou 2009).

- Indices de similarités binaires symétriques :

L'indice représentant cette catégorie est l'indice de Sokal et Michener qui représente le nombre de présences ou d'absences simultanées divisé par le nombre total de relevés.

- Indices de similarités binaires asymétriques :

Les indices représentant cette catégorie sont l'indice de Jaccard et Sorensen. L'indice de Jaccard, le plus utilisé, représente le nombre de cas de présences simultanées des deux échantillons considérés, divisé par le nombre de cas où au moins l'un des deux est présent. L'indice de Sorensen est assez similaire à l'indice de Jaccard, avec une pondération par 2 du terme de cooccurrence.

A partir des indices de similarités binaires nous pouvons calculer les indices de distances D comme suit: $D=1-S$.

- Indices de similarités quantitatifs symétriques :

L'indice fait le rapport entre le nombre de descripteurs ayant le même état pour les deux objets et le nombre total de descripteurs. Exemple de l'indice d'Estabrook et Rogers et l'indice de Gower.

- Indices de similarités quantitatifs asymétriques :

Dans cette catégorie deux indices sont fréquemment utilisés : l'indice de Steinhaus, et la similarité du khi carré.

Pour le cas des données quantitatives, nous distinguons deux catégories d'indices de distance selon leurs propriétés géométriques :

- Les indices de distances métriques qui obéissent aux quatre propriétés suivantes :

- 1- Si deux entités a et b sont similaires ($a=b$), la distance entre a et b est nulle : $D(a,b)=0$.
- 2- Si les deux entités a et b sont différentes, la distance entre elles est supérieure à 0 : $D(a,b)>0$.
- 3- La distance entre les deux entités est la même dans les deux sens, $D(a,b) = D(b,a)$.
- 4- Si on considère trois entités a, b et c alors $D(a,b)+ D(b,c)$ est plus grand ou égal à $D(a,c)$.

La plus courante des distances métriques est la distance Euclidienne. Dans un espace Euclidien, chaque variable est considérée comme une dimension et les différents objets se positionnent selon les valeurs de ces variables. Ces mesures n'ont pas de valeurs maximales et dépendent de l'échelle des variables. En effet, ces valeurs augmentent avec le nombre de variables. Pour ceci, le calcul des distances Euclidiennes nécessite la réduction des variables comme le cas des Analyses en Composantes Principales (ACP).

- Les indices de distance semi métriques : sont des indices qu'on ne peut pas positionner dans un espace Euclidien. Exemple de la distance de Bray et Curtis (Sbabou 2009).

IV.6.2. Analyse factorielle

Les analyses factorielles fournissent un moyen pour décrire l'information générale en considérant les caractères étudiés dans leur ensemble ainsi que les inter-corrélations entre les caractères et leurs effets sur la structuration de la population.

Les analyses factorielles ont été développées en sociologie, en économie et en psychologie avec des données souvent redondantes. Les plus communément utilisées des analyses factorielles sont l'Analyse en Composante Principale (ACP) et l'Analyse Factorielle des Correspondances

(AFC). Ces analyses factorielles permettent la représentation d'une population décrite par un ensemble de caractères dont les modalités sont quantitatives (mesures continues) pour une ACP et qualitatives pour une AFC. Les analyses factorielles permettent de réaliser un décodage et une simplification des données par ajustement matriciel. On obtient alors un tableau plus petit résumant le contenu du tableau initial, ou encore on remplace un grand nombre de variables par un plus petit nombre de variables explicatives appelées "des facteurs". Cette analyse factorielle permet de convertir les tableaux de données en un nuage de points dans un espace de 'n' dimensions généralement supérieure à 3. Le nuage de points est défini par les distances entre les points et la masse affectée à chaque point. Un ajustement du nuage permet de déterminer l'axe qui restitue au mieux la forme géométrique et massique du nuage et constitue le premier axe d'inertie ou premier axe factoriel du nuage. L'axe orthogonal au premier axe présente le deuxième axe factoriel et ainsi de suite pour les trois dimensions. La morphologie du nuage et la répartition des points permettent une meilleure lecture de l'information des données (Sbabou 2009).

L'analyse factorielle des correspondances a été proposée par Benzecri et ses collaborateurs (1973). L'AFC est basée sur l'utilisation de la métrique Chi-deux. Elle sert en particulier à déterminer et hiérarchiser les dépendances entre les lignes et les colonnes d'un tableau. Les analyses d'AFC sont généralement complétées par des essais de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) qui permettent de construire des arbres de classification des lignes ou des colonnes.

L'analyse en composantes principale a été mise au point par Karl Pearson en 1901 en tant qu'une technique de réduction de dimensionnalités. Cette méthode d'analyse de données permet la réduction du nombre de variables et considère les axes qui représentent le mieux les corrélations entre les variables aléatoires. L'ACP est considérée comme un outil de compression linéaire (Sbabou 2009).

Références bibliographiques

1. Abdelguerfi A, Laouar M (2002) Les espèces pastorales et Fourragères, leurs utilisations au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). FAO-RNE. pp. 135.
2. Abdelguerfi-Laouar M, Bouzid L, Zine F, Hamdi N, Bouzid H, Zidouni F (2001) Evaluation de quelques cultivars locaux de pois chiche dans la région de Béjaia. *Recherche Agronomique (INRA)* 9: 31-42.
3. Abdelkefi A, Biborchi A, Boussaid M, Marrakchi M (1997) Marqueurs isoenzymatiques et structures génotypiques de populations spontanées d'espèces du genre *Medicago*. 6ème journées scientifiques du réseau biotechnologies végétales AUPELF UREF, Orsay.
4. Ahmad MH, Rafique Uddin M, McLaughlin W (1984) Characterization of indigenous rhizobia from wild legumes. *FEMS Microbiology Letters* 24: 197-203.
5. Aidoud A, Nedjraoui D (1992) The steppes of alfa (*Stipa tenacissima* L) and their utilization by sheep. In: Plant animal interactions in Mediterranean-type ecosystems. MEDECOS VI, Greece. pp. 62-67.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York.
7. Alonso-Blanco C, Mendez-Vigo B, Koornneef M (2005) From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 717-732.
8. Andersson MS, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano CE (2006) Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406.
9. Angulo MD, Sanchez de Rivera AM, Gonzalez Bernaldez F (1972) Estudios cromosomicos en el genero *Trifolium*. VI. *Lagascalia* 2: 3-13.
10. Annicchiarico P, Perenzin M (1994) Adaptation patterns and definition of macro-environments for selection and recommendation of common-wheat genotypes in Italy. *Plant Breeding* 113: 197-203.
11. Baclers CFE, Lowe AJ, Ennos RA (2006) Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science* 311(5761): 628.
12. Baquerizot-Audiot E, Desplanque B, Prospero JM, Santoni S (2001) Characterization of microsatellite loci in the diploid legume *Medicago truncatula* (barrel medic). *Molecular ecology* 1: 1-3.
13. Bena G, Prospero JM, Lejeune B, Olivieri I (1998) Evolution of annual species of the genus *Medicago*: A molecular phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics Evolution* 9: 552-559.
14. Benson DR, Silvester WB (1993) Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews* 57: 293-319.
15. Benzecri JP (1973) L'analyse des données. L'analyse des correspondances, Dunod.

16. Boissier E (1872-1873) *Flora Orientalis : sive, Enumeratio plantarum in Oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae fines hucusque observatarum Basileae : H. Georg, Geneve & Basel.*
17. Boivin-Masson C, Bontemps C, Golfier G, Gris-Liebe C, Talini L (2006) Détection et typage du gène nodC à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. *Les Actes du BRG 6*: 97-110.
18. Bostein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
19. Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
20. Brown AHD (1989) The case for core collections. In: *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 136-156.
21. Brown AHD (1989b) Core collection: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31: 818-824.
22. Budak H, Pedraza F, Baenziger PS, Cregan PB, Dweikat I (2003) Development and utilization of SSR to estimate genetic diversity in a collection of pearl millet germplasm. *Crop Sciences* 43: 2284-2290.
23. Caratini R (1984) *Les plantes*. Bordas, Paris.
24. Cardinet G (2000) Utilisation de marqueurs microsatellites pour la cartographie génétique de *Medicago truncatula*. Mémoire de stage en biotechnologie végétale. ENFA-Univ. Paul Sabatier, Toulouse.
25. Chalck PM (1998) Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Australian Journal of Research* 49: 303-316.
26. Chalmers K, Waugh JR, Sprent JI, Simons AJ, and Powell W (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465.
27. Chao S, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 495-504.
28. Chargué V, Fahima T, Dahan A, Sun GL, Korol AB, Ronin YI, Grama A, Roder MS, Nevo E (1999) Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Y-15 gene of wheat using Nils and bulked segregant analysis. *Genome* 42: 1050-1056.
29. Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D (1993) The effect of deleterious mutations on Neutral molecular variation. *Genetics* 134: 1289-1303.
30. Chen CC, Gibson PB (1971) Karyotype of 15 *Trifolium* species in section *Amoria*. *Crop Sciences (Madison)* 11: 441-445.
31. Choi HK, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR (2004) A sequence-based genetic map

- of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166: 1463-502.
32. Chu HG, Yan J, Hu Y, Wang HC, Li JQ (2009) Cross-species amplification of 92 microsatellites of *Medicago truncatula*. *Molecular ecology Resources* 10 (1): 150-155.
 33. Crampton B (1985) Native range clovers. In: Clover Science and Technology. American Society of Agronomy, Madison. pp. 579-590.
 34. Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT (2006) Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 99-103.
 35. Cronk QC (2001) Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nature Reviews Genetics* 2: 607-619.
 36. Cui Z, Carter TE, Jr, Burton JW, Wells R (2001) Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sciences* 41: 1954-1967.
 37. Dalechamps J (1587) *Historia generalis plantarum in libros XVII*. Eds. Apud G. Rovillum, Lugduni.
 38. Danso SKA (1995) Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer research* 42: 33-41.
 39. Daussant J, Mosee J, Vaughan J (1983) *Seed Proteins*. Academic Press, London.
 40. De Vienne D (1998) Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris.
 41. De Vienne D, Santoni S (1998) Les principales sources de marqueurs moléculaires. In : Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris. pp. 15-47.
 42. Delalande M, Greene S, Hughes S, Nair R, Huguet T, Aouani ME, Prospero JM (2007) Wild accessions / populations. *Medicago truncatula* handbook 1-27.
 43. Delphine M (2006) Morphology, development and plant architecture of *M. truncatula*. *M. truncatula* handbook 1-6.
 44. Derek Munro B, Ernest S (1997) *Les légumes du Canada*. NRC Research Press, Amazon France.
 45. Diwan N, Bouton JH, Kochert G, Cregan PB (2000) Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Biomedical and life sciences. *Theoretical and Applied Genetics* 101(1-2): 165-172.
 46. Diwan N, McIntosh MS, Baughan GR (1995) Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 755-761.
 47. Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
 48. Downie JA (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology* 15: 6.
 49. Doyle JJ (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* 3(12): 473-478.

50. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15.
51. Doyle JJ, Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131: 900-910.
52. El Kholy MA (1990) Cytology of some *Trifolium* species. [PhD. thesis] Cairo.
53. Ellison NW, Liston A, Steiner JJ, Williams WM, Taylor NL (2006) Molecular phylogenetic of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 688-705.
54. Ennos RA (1994) Estimating the relative the rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
55. Ernest S, Stephen RD, Deborah S, Erica J, Heidi LZ (1998) Multiple independent losses of the plastid rpoC1 intron in *Medicago* (Fabaceae) as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Botany* 76(5): 791-803.
56. Eujayl I, Sledge MK, Wang L, May GD, Chekhovskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR (2004) *Medicago truncatula* EST-SSRs Reveal cross-species genetic Markers from *Medicago* ssp. Biomedical and life sciences. *Theoretical and applied genetics* 108 (3): 414-422.
57. FAO (1996) Food for all. Rome. pp. 64.
58. FAO. 2007. <http://www.fao.org/corp/statistics/fr/>
59. Feillet P (2000) Le grain de blé: Composition et utilisation. Editions Quae, Paris, France .pp. 308.
60. Feliachi K (2002) Le développement des légumineuses alimentaires et les perspectives de Relance en Algérie. Proceedings du 2^{ème} séminaire du Réseau Remafeve/Remala « Le devenir des légumineuses Alimentaires dans le Maghreb ». Hammamet (Tunisie).
61. Fernandes A, Queiros M (1978) Contribution à la connaissance cytotoxonomique des spermatophyta du Portugal. IV. Eeguminosae. *Boletim da Sociedade Broteriana* 52: 79-164.
62. Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural Variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics* 7(2): 8597.
63. Field D, Wills C (1996) Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London* 263: 209-215.
64. Fournier P (1961) Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology* 148: 1985-1995.
65. Foury A (1954) Les légumineuses fourragères au Maroc. In : Les Cahiers de la Recherche agronomique. Service de la Recherche Agronomique et de l'Expérimentation Agricole, Rabat. pp. 289-656.
66. Garcia C, Jordano P, Godoy JA (2007) Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. *Molecular Ecology* 16(9): 1947-1955.

67. Genier G, Guy P, Prosper JM (1992) Les luzernes. In : Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection. INRA Editions, Paris. pp. 323-338.
68. Gepts P (1990) Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 64-82.
69. Gepts P (2004) Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant breeding reviews* 24: 1-44.
70. Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228-1235.
71. Gerber S, Chabrier P, Kremer A, Famoz (2003) A software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Molecular ecology* 3(3): 479-481.
72. Giancola S, McKhann H, Berard A, Camilleri C, Durand S, Libeau P, Roux F, Reboud X, Gut IG, Brunel D (2006) Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1115-1124.
73. Gill BS, Gill KS, Raupp WJ, Delaney J, Kota RS, Mickelson L, Hassawi D, Fritz AK, Cox TS, Hulbert SH, Sears RG, Endo TR, Namuth D, Lapitan NLV (1993) Genetic and physical mapping in *Triticum tauschii* and *Triticum aestivum*. In: Progress in Genome Mapping of Wheat and Related Species Proceedings of the 2nd Public Workshop Intern. *Triticeae* Mapping Initiative. CIM-MYT, Mexico DF. pp. 10-17.
74. Gillet JMX, Taylor NL (2001) The World of Clovers. Iowa State University Press, Ames, USA.
75. Godwin ID, Aitken EAB, Smith LW (1997) Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524-1528.
76. Goldblatt P (1981) Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: Advances in Legume Systematics, Part 2. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 427-463.
77. Goldblatt P, Johnson DE (2003) Tropicos database: index to plant chromosome numbers, Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA. <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>>.
78. Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U (2004) Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sciences* 44: 1412-1418.
79. Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877.
80. Guignard JL, Dupont F (2005) Botanique. 13^{ème} Edition Masson, Paris. pp. 336.

81. Gupta PK, Varshney RK (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.
82. Gut IG (2001) Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation* 17(6): 475-492.
83. Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD (1991) Correlations between species Traits and Allozyme diversity: Implications for conservation biology. In: Genetic and conservation of rare plant. Oxford University Press, Oxford. pp. 75-86.
84. Hancock JM (1996) Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays* 18: 421-425.
85. Harlan JR (1971) Agricultural origins: Centers and noncenters. *Science* 174: 468-474.
86. Harry M (2001) Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.
87. Helentjaris, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J (1986) Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 761-769.
88. Hendrych R (1976) Vorläufige Mitteilung zur Gattung *Chrysopsis* Desvaux (1818). *Preslia* 48: 216-224.
89. Hendrych R (1978) Ein Versuch, die Arealentwicklung der Gattung *Chrysopsis* zu erläutern. *Preslia* 50: 119-137.
90. Heyn CC (1963) The annual species of *Medicago*. Scripta Hierosolymitana. Publications of the Hebrew University, Jerusalem.
91. Hireche Y (2006) Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère, Batna
92. Hossain M (1961) A revision of *Trifolium* in the Nearer East. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 23: 387-481.
93. Houmani M (1999) Situation alimentaire du bétail en Algérie. *INRA* 4: 35-45.
94. Huang J, Sun SM (2000) Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1050-1060.
95. Huttel B, Winter P, Weising K, Choumane W, Weigand F, Kahl G (1999) Sequence tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L). *Genome* 42 (2): 210-217.
96. IUCN (1996) Red list of threatened plants. pp. 510.
97. Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J (1999) Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *American Journal of Botany* 86: 67.
98. Jha PK, Nair S, Gopinathan MC, Babu CR (1995) Suitability of rhizobia-inoculated wild legumes *Argyrolobium flaccidum*, *Astragalus graeolens*, *Indigofera gangetica* and *Lespedeza stenocarpain* providing a vegetational cover in an unreclaimed lime stone quarry. *Plant Soil* 177: 139-149.

99. Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK, Brar DS (2000) Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.
100. Judd WS, Campbell CS, Jules Bouharmont, Kellogg EA, Stevens P (2001) Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Edition de boeck, Amazon France.
101. Jules J (1992) Plant Breeding Reviews. Wiley- Interscience, London.
102. Kantety RV, Zeng XP, Bennetzen JL, Zehr BE (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1: 365-373.
103. Khokhrjakov AP (1998) Bobrovia A. Khokhr: genus *novum familia* Fabaceae. *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii* 137-139.
104. Labadi M, LD R, Singh KB, Charrier A (1996) Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphisms. *Euphytica* 88: 181-188.
105. Labat JN (1996) Biogéographie, endémisme et origine des légumineuses papilionacées de Madagascar. *Biogéographie de Madagascar* 95-108.
106. Lagudah ES, Appels R, McNeil D (1991) The Nor-D3 locus of *Triticum tauschii*: Natural variation and genetic linkage to markers in chromosome 5. *Genome* 34: 387-394.
107. Lapeyronie A (1982) Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose, Paris.
108. Latta RG (2006) Integrating patterns across multiple genetic markers to infer spatial processes. *Landscape ecology* 21(6): 809-820.
109. Laumont P, Chevassus A (1956) Note sur l'amélioration du pois chiche en Algérie. *Institut Agricole d'Algérie* 10(2): 1-23.
110. Laumont P, Chevassus A (1960) Note sur l'amélioration de la lentille en Algérie. Ann. Inst. Agr. Des services de recherche et expérimentation Agricole de l'Algérie, Tome II. Fasc.
111. Laumont P, Erroux J (1961) Inventaire des blés durs rencontrés et cultivés en Algérie. Mémoires de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord. Line Berger et Steponkus.
112. Lesins K, Lesins AI (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. *Plant ecology* 50: 228-229.
113. Lesins KA, Lesins I (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. *Plant ecology* 50(2): 228-229.
114. Lévêque C, Mounoulou JC (2001) Biodiversité, Dynamique biologique et conservation. Edition Dunod, Paris.
115. Lewin B (1992) Genes. Flammarion Médecine Sciences, Paris.
116. Link J, Graeff S, Batchelor WD, Claupein W (2006) Evaluating the economic and environmental impact of environmental compensation payment policy under uniform and variable-rate nitrogen management. *Agricultural Systems* 91: 135-153.

117. Ludwig EM, Hosie AHF, Bourdès A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature* 422: 722-726.
118. Ma ZQ, and Lapitan NLV (1998) A comparison of amplified and restriction fragment length polymorphism in wheat. *Cereal Research Communication* 26: 7-13.
119. Maliepaard C, Jansen J, van Ooijen JW (1997) Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequence for applications. *Genetic Research* 70: 237-250.
120. Manchenko DGP (2003) Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. Second edition, CRC Press.
121. Mathieu M (2003) Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. *France agricole* 11-16.
122. Mediouni K (2000) Stratégie algérienne et plan d'action national d'utilisation durable de la diversité biologique. Tome VIII, M.A.T.E., Alger.
123. Messina MJ (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition* 70: 439S-50S.
124. Michaud R, Lehman WF, Rumbaugh MD (1988) World distribution and Historical Development. In Alfalfa and alfalfa improvement. *Agronomy monograph* N°29. USA 25-89.
125. Micic Z, Hahn V, Bauer E, Schon CC, Melchinger AE (2005) QTL mapping of resistance to Sclerotinia midstalk-rot in RIL of sunflower population NDBLOSsel x CM625. *Theoretical Applied genetics* 110: 1490-1498.
126. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (1992) Statistiques agricoles. Série B
127. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (2005) Statistiques agricoles. Série B
128. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural (1993-2002) Statistiques d'Agricultures d'Algérie. Eds. M.A.P. Alger. pp. 46.
129. Mokrani L, Gentzbittel L, Azanza F, Fitamant L, Al-Chaarani G, Sarrafi A (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower (*Helianthus annuus* L) *Theoretical Applied genetics*. 106(1): 149-56.
130. Moraes PLR, Nehme CJ, Alves MC, Teresa M, Derbyshire MT, Cavalheiro AJ (2007) Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones and the genetic variability of isozymes in natural populations of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae). *Biochemical systematics and Ecology* 35: 233-244.
131. Morgante M, Olivieri A (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182.

132. Moullet O, Fossati D, Mascher F, Schori A (2008) Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales. *Revue Suisse Agriculture* 40(3): 133-138.
133. Myers N (1999) What we must do to counter the biotic holocaust. *International wildlife* 29(2): 30-39.
134. Ndakidemi PA, Dakora FD (2003) Review: legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Functional Plant Biology* 30: 729-745.
135. Nedjraoui D (2000) Country Pasture/Forage Resource Profiles: Algeria Report. FAO. pp. 15.
136. Nègre R (1959) Révision des *Medicago* d'Afrique du Nord. *Bulletin de la Société d'histoire naturelle d'Afrique du Nord* 50: 267-3 14.
137. Nelson JC, Sorrells ME, Van Deynze AE, Lu Atinkson M, Bernard M, Leroy P, Faris JD, and Anderson JA (1995) Molecular mapping of wheat [Major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. *Genetics* 141: 721-731.
138. Nesbitt KA, Potts BM, Vaillancourt RE, West AK, Reid JB (1995) Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity* 74: 628-637.
139. Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, Stahl EA, Weigel D (2002) The Extent of Linkage Disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 30: 190-193.
140. Nybom H (1994) DNA fingerprinting - a useful tool in fruit breeding. *Euphytica* 77: 59-64.
141. Oram RN (1991) Register of Australian Herbage Plant Cultivars. CSIRO Publications, Melbourne, Australia.
142. Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael J (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87(4): 551-568.
143. Parizeau ME (1997) La biodiversité. Edition de boeck, Bruxelles.
144. Pelmont J (1995) Enzymes catalyseurs du monde vivant. Press universitaire de Grenoble, France.
145. Peoples MB, Herridge DF, Ladha JK (1995) Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174: 3-28.
146. Petrova AV, Koluharov SI (1982) Cytotaxonomic study of the genus *Trifolium* L. in Bulgaria. *Fitologija* 19: 3-33.
147. Polhill RM, Raven PH, Stirton CH (1981) Evolution and systematics of the leguminosae. In: Advances in legume systematics Part 1. Royal Botanic Gardens Kew, UK. pp.1-26.
148. Poor Mohammad KS, Talia P, Maury P, Grieu P, Heinz R, Perrault A, Nishinakamasu V, Hopp E, Gentzbittel L, Paniego N, Sarrafi A (2007) Genetic analysis of plant water status

- and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Sciences* 172: 773.
149. Popelka JC, Terry N, Higgins TJV (2004) Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Sciences* 167: 195-206.
150. Presl CB (1831) *Trifolium*. In: *Symbolae Botanicae*. Calve JG, Prague. pp. 44-50.
151. Pritchard AJ (1962) Number and morphology of chromosomes in African species in the genus *Trifolium* L. *Australian Journal of Agricultural Research* 13: 1023-1029.
152. Prolea D (2002) Espèces et utilisations, des ressources en protéines à redécouvrir : les plantes fourragères prairiales – la luzerne. Institut du Végétal et de l'Institut de l'Élevage. GNIS, Paris. pp. 4-7.
153. Prosperi JM, Isabelle O, Angevain M, Génier G, Nansat P (1993) Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. INRA. Mauguio. N°4: 1-5.
154. Quézel P (2000) Les conséquences sur l'évolution et la gestion des zones humides. Réponses de l'élément végétal (flore et végétation du bassin méditerranéen) à d'éventuelles modifications climatiques. In : Actes des Tables Rondes (2^{ème} table ronde) « Changement Climatique : fantasme ou réalité ». pp. 1-6. eid.med@wanadoo.fr
155. Quézel P, Santa S (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS. Paris.
156. Quiros CF, Bauchan GR (1988) The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA-CSSA-SSSA WI. 93-124.
157. Rae J, Aldam C, Dominguez I, Hoebrechts M, Barnes SR, Edwards KJ (2000) Development and incorporation of microsatellite markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* spp). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1240-1248.
158. Ramakrishnan MN, Hughes SJ, Ellwood S, Oliver R, Greene SL, Delalande M, Wen J, Oldroyd G (2006) *Medicago truncatula* stock centres. *Medicago truncatula* handbook. John Innes Centre, UK. pp. 1-18.
159. Raven PH, Evert RF, Eichlorn SE (2000) Biologie végétale. 6^{ème} Edition de boeck, Paris.
160. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, A. Rafalski J, Tingey SV, Scolnik PA (1992) Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 1477-1481.
161. Roder M, Korzun V, Bikram SG, Martin WG (1998) The physical mapping of microsatellite markers in wheat. *Genome* 41(2): 278-283.
162. Roskov YR (1990) The new species and the new nomenclature combinations in the genera *Lupinaster*, *Chrysaspis*, *Trifolium* and *Amoria* (Fabaceae). *Botanicheskii Zhurnal* 75: 715-720.

163. Russelle M (2001) Alfalfa. *American Sciences* 89: 252-259.
164. Sandberg AS (2002) Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition* 3: S281-S285.
165. Schoen DJ, Brown AHD (1991) intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 4494-4497.
166. Schoutteten F (2004) La luzerne. Fiche technique agro-industrie. CRCE/ARIST, Champagen-Ardenne.
167. Senn HA (1938) Chromosome number relationships in the Leguminosae. *Bibliothèque of Genetics* 7: 175-336.
168. Serre JL (2006) Génétique des populations. Edition Dunos, Paris.
169. Singleton P (1994) Bactériologie. 2^{ème} édition Masson, Paris.
170. Skinner D, Bauchan G, Auricht G, Hughes S (1999) A method for the efficient management and utilization of large germplasm collections. *Crop Sciences* 39: 1237-1242.
171. Small E (1987) Reduction of Ursiato *Trifolium*. *Taxon* 36: 578-583.
172. Small E, Jomph M (1989) A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67: 3260-3294.
173. Small E, Lassen P, Broukes BS (1987) an expanded circumscription of *Medicago* (Leguminosae, Trifolieae) based on explosive flower tripping. *Welldenowia* 16: 415-437.
174. Smith BD (1996) The emergence of agriculture. Scientific American library. HPHLP, New York.
175. Smouse PE, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management* 197(1-3): 21-38.
176. Soják J (1986) Nové jméno pro Galearia Presl. *Cas. Nár. Muz. (Prague)* 154, 35.
177. Sprent JI (1995) Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 27(4/5): 401-407.
178. Sprent JI (1999) Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. *Perspective in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 2/2: 149-162.
179. Sprent JI (2001) Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
180. Steiner JJ, Robinson WA, Liston A, Taylor NL (1997) ITS and RAPD phylogenetic hypotheses and the ecological distributions of North American *Trifolium* L. (Fabaceae). *American Journal of Botany* 84: 235-236.
181. Struss D, Plieske J (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barely populations. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 308-315.
182. Talhinhos P, Neves-Martins J, Leitao J (2003) AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding* 122(6): 507-510.
183. Tang S, Yu JK, Slabaugh MB, Shintani DK, Knapp SJ (2002) Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1124-1136.

184. Taylor NL, Quesenberry KH, Anderson MK (1979) Genetic system relationships in *Trifolium*. *Economic Botany* 33: 431-441.
185. Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho Y, Ishli G, McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100: 697-712.
186. Testolin R, Huang WG, Lain O, Messina R, Vecchione A, Cipriani G (2001) A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 30-36.
187. Tuxill J (1998) losing strands in the web of life: Vertebrate declines and the conservation of biological diversity. Worldwatch Paper, Washington DC.
188. Vance CP, Graham PH, Allan DL (2000) Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. In: Nitrogen fixation: from Molecules to crop productivity. Kluwer Academic Publishers, New York. pp. 839-867.
189. Vos PRH, Bleeker M, Rejians M, de Lee T, Hornes M, Freijters A (1995) AFLP: a new technique for DNA finger printing. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
190. Wang TL, Domoney C, Hedley CL, Casey R, Grusak MA (2003) Can we improve the nutritional quality of legume seeds. *Plant Physiology* 131: 886-891.
191. Weder JKP (2002) Influence of experimental conditions on the reproducibility of RAPD-PCR identification of legumes and cereals. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35: 233-238.
192. Welsh J, Peterson C, Clelland MMC (1991) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research* 19: 303-306.
193. Williams J, Kubelik JL, Livak JA, Rafalski, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
194. Wolff KE, Zietkiewicz, Hofstra H (1995) Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 439-447.
195. Yang WAC, de Oliveira I, Godwin K, Schertz, Bennetzen JL (1996) Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sciences* 36: 1669-1676.
196. Young ND, Mudge J, Ellis TH (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 199-204.
197. Yu JK, Mangor J, Thompson L, Edwards KJ, Slabaugh MB, Knapp SJ (2002) Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. *Genome* 45: 652-660.
198. Yu JK, Tang S, Slabaugh MB, Heesacker A, Cole G, Herring M, Soper J, Han F, Chu WC, Webb DM, Thompson L, Edwards KJ, Berry S, Leon AJ, Olungu C, Maes N, Knapp SJ

- (2003) Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sciences* 43: 367-387.
- 199.Zahran HH (1999) Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968-989.
- 200.Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology* 137: 1189-1196.
- 201.Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- 202.Zohary M (1972) Origins and evolution in the genus *Trifolium*. *Botaniska Notiser* 125: 501-511.
- 203.Zohary M, Heller D (1984) The genus *Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem.

Deuxième Partie

*Diversité génétique du genre *Medicago* L.*

L'utilisation de la diversité génétique dans un programme de sélection passe inévitablement par son estimation et par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leurs distributions et leur évolution historique et aussi bien leur mécanisme d'interaction et leurs coévolutions avec les autres espèces.

Notre étude vise à estimer le niveau de la diversité génétique existant au sein et entre des espèces appartenant aux deux genres *Medicago* et *Trifolium*. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs marqueurs génétiques qui mettent en évidence des polymorphismes des caractères biométriques, isoenzymes, protéines de réserve (albumines et globulines), propriétés physiques et marqueurs moléculaires (microsatellites). Les différents résultats de ce travail, sont structurés sous forme d'articles et présentés dans les deux parties suivantes.

Diversité génétique du genre *Medicago* L.

Chapitre I : Variation morphologique et enzymatique des populations naturelles du genre *Medicago* L. prospectées dans le Nord Algérien.

Chapitre II : Polymorphisme des protéines de réserve (albumines et globulines) dans des espèces spontanées du genre *Medicago* L.

Chapitre III : Diversité génétique des espèces Algériennes du genre *Medicago* L. appréciée par quelques propriétés physiques du grain et les marqueurs microsatellites

Diversité génétique du genre *Trifolium* L.

Chapitre I : Evaluation de la variabilité génétique du trèfle Algérien (*Trifolium* L.) par les marqueurs morphologiques et enzymatiques.

Chapitre II : Variation des albumines et des globulines au sein et entre des espèces du genre *Trifolium* L. collectées dans le Nord Algérien.

Chapitre I

*Variation morphologique et enzymatique des
populations naturelles du genre *Medicago* L.
prospectées dans le Nord Algérien.*

Préambule

Les caractéristiques morphologiques et agronomiques tels que la taille des graines et des fruits sont souvent utilisées dans l'estimation de la variabilité génétique. Malgré les critiques de l'utilisation de ces marqueurs, qui sont habituellement polygéniques et influencés par les conditions environnementales (Kongkiatngam *et al.* 1995), ils se sont avérés utiles dans de nombreuses études sur le genre *Medicago* L. (Al-Faifi *et al.* 2013 ; Bonnin *et al.* 1996 ; Bullitta *et al.* 1994 ; Cherifi *et al.* 1993 ; El Hansali *et al.* 2007 ; Radwan *et al.* 1980 ; Tucak *et al.* 2008 ; Zivkovic *et al.* 2012).

Les isoenzymes comme marqueurs codominants fournissent un indice utile pour l'estimation de la structure des populations et les relations phylogénétiques, parce que les profils enzymatiques reflètent directement un système de gène particulier (Ferguson et Robertson 1996 ; Malaviya *et al.* 2008). Il a été bien démontré que la diversité génétique est corrélée avec la distance génétique telle que mesurée par la variation enzymatique (Brown et Weir 1983). Seul un nombre limité d'enzymes peut être détecté en électrophorèse, ce qui limite leur utilité dans l'estimation de la variabilité des génotypes (Zivkovic *et al.* 2012). Néanmoins, les isoenzymes ont été largement utilisées dans les études de la variation génétique du genre *Medicago* (Bullitta *et al.* 1994 ; Chandra *et al.* 2011 ; Chérifi 1996 ; Haddioui *et al.* 2012 ; Jenczewski *et al.* 1999a ; 1999b).

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressée à la variabilité de quelques caractères morphologiques et enzymatiques chez 169 accessions représentées par 14 espèces du genre *Medicago* L. collectées dans 47 sites éco-géographiques couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le Nord Algérien. Dans cette étude, 12 caractères biométriques ont été mesurés et deux systèmes enzymatiques ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide : EST (Estérases) et GOT (Glutamate Oxaloacétate Transaminase). L'analyse statistique a montré que les espèces appartenant à différentes sections ont présenté une large variabilité et la corrélation entre les caractères morphologiques et les paramètres écologiques a été faible. Les deux systèmes enzymatiques ont révélé 6 loci polymorphes, on a compté 2 loci avec 10 bandes et 21 phénotypes pour la GOT, et 4 loci avec 22 bandes et 71 phénotypes pour l'EST. L'indice de polymorphisme et les distances génétiques de Jaccard ont révélé l'existence d'une large variabilité génétique inter- et intra-spécifique, d'où, *M. polymorpha* a été l'espèce la plus polymorphique avec un indice de diversité génétique de 0.57. Ce polymorphisme élevé rend les marqueurs enzymatiques utiles pour la caractérisation et l'évaluation de la variabilité génétique.



Available online: www.notulaebotanicae.ro

Print ISSN 0255-965X; Electronic 1842-4309

Not Bot Horti Agrobo, 2015, 43(1):86-95. DOI:10.15835/nbha4319676



Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria

Imane MEDOUKALI, Ines BELLIL, Douadi KHELIFI*

Université Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, 25000 Constantine, Algérie; imane.kako@hotmail.fr; bines07@yahoo.fr; dkhelifi@yahoo.fr (*corresponding author)

Abstract

As part of the evaluation and enhancement of genetic resources, morphological and isozyme variability within and among 169 accessions, representing 14 species of the genus *Medicago* L. collected in northern Algeria, was assessed using twelve quantitative traits and two enzymatic systems. Phenotype frequencies were scored in six enzyme zones to determine isozyme variability within and among populations. The data analysis resolved a high level of genetic diversity. Ten morphometric characteristics contributed to the discrimination of the species. The relationship between the collection site environment and phenotypic characteristics was also studied. Esterase (EST) enzyme system was more polymorphic than glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) system. Were scored 2 zones with 10 bands and 21 phenotypes for GOT (glutamate oxaloacetate transaminase) and 4 zones with 22 bands and 71 phenotypes for EST (esterase) Polymorphism index and Jaccard's genetic distances revealed the existence of a high genetic diversity within and among the studied populations. The annual species *M. polymorpha* presented an intraspecific polymorphism index of 0.57, which was higher than all other species indices. Clustering of the species based on isozyme markers was in agreement with taxonomic criteria and showed no significant correlation with morphological characteristics. Conservation programs should take into account the level of genetic diversity within and between populations revealed by isozyme markers.

Keywords: genetic diversity, isozymes, *Medicago* L., polymorphism, quantitative traits

Introduction

The *Medicago* genus (medics) is part of the Galeoid phylum that includes a number of important legume (Fabaceae) crops such as pea, chickpea, clover and lentil. It consists of approximately 87 annual and perennial species of herbs and shrubs widespread from the Mediterranean to central Asia (Small and Jomphe, 1989; Small, 2010). It includes the widely cultivated major forage crop and weedy species *M. sativa* L. (alfalfa, lucerne) and the legume model species *M. truncatula* Gaertn. (Bell *et al.*, 2001). *Medicago* has been one of the most widely studied legumes because of numerous agriculturally important and domesticated species (Small, 2010). In addition to alfalfa, which is the most cultivated legume, other species are used as medicine, human food (honey production, sprouts), green manure, sources of industrial enzymes in biotechnology (Lewis *et al.*, 2005), model genomic species (Cannon *et al.*, 2006) and model systems for the study of nitrogen fixation (Bailly *et al.*, 2007). The genus contains a great variety of morphological characteristics (spiny and spineless pods, presence of hairs, corolla colors etc.), of ploidy levels and basic chromosome numbers (Bena *et al.*, 1998). Algeria represents one of the

richest zones in genetic diversity and contains 22 annual and perennial *Medicago* species (Quezel and Santa, 1962). Morphological and agronomic characteristics such as seed and fruit size are often used for estimating genetic variation. Despite criticisms of using these markers, that are usually polygenic and influenced by environmental conditions (Kongkiatngam *et al.*, 1995), they have proven useful in many studies on the genus *Medicago* L. (Al-Faifi *et al.*, 2013; Bonnin *et al.*, 1996; Bullitta *et al.*, 1994; Cherifi *et al.*, 1993; El Hansali *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 1980; Tucak *et al.*, 2008; Ivković *et al.*, 2012). Isozymes as codominant markers provide a useful clue for the estimation of population structures and phylogenetic relationship (Ferguson and Robertson, 1996; Malaviya *et al.*, 2008) because zymographic patterns reflect directly a particular gene system. It has been well demonstrated that genetic diversity is correlated with genetic distance as measured by allozyme variation (Brown and Weir, 1983). Nevertheless, only a limited number of enzymes can be detected in electrophoresis, which limits their usefulness in estimation of genotypes variability (Ivković *et al.*, 2012). However, isozymes have been extensively used in the studies of *Medicago* genetic variation (Bullitta *et al.*, 1994;

Received: 11 Oct 2014. Received in revised form: 09 Dec 2014. Accepted: 15 Apr 2015. Published online: 13 May 2015.

Chandra *et al.*, 2011; Chérifi, 1996; Haddioui *et al.*, 2012; Jenczewski *et al.*, 1999a, 1999b).

Medicago genus is distributed worldwide and grown in highly contrasting environments. This extensive geographical adaptation promotes genetic variation and gives us the opportunity to use diverse gene pools. In this investigation, it was aimed to assess genetic diversity within and among natural populations of the genus *Medicago* L. collected in Northern Algeria at morphological and enzymatic levels. This will be helpful in directing conservation and breeding programs for the improvement of *Medicago* species.

Materials and methods

Plant materials

The study was conducted on 169 accessions representing 14 species of the genus *Medicago* L.: *M. truncatula* (29 acc), *M. polymorpha* var. *polymorpha* (28 acc) and var. *vulgaris* (28 acc), *M. ciliaris* (19 acc), *M. orbicularis* (18 acc), *M. minima* (15 acc), *M. murex* (12 acc), *M. italica* (5 acc), *M. littoralis* (5 acc), *M. rigidula* (3 acc), *M. inverteata* (2 acc), *M. lupulina* (2 acc), *M. sativa* (1 acc), *M. arborea* (1 acc) and *M. arabica* (1 acc). These species were collected from 47 different geographic Algerian sites from 15 May to 15 July 2013. The collecting sites extended from the coastal region to the Atlas Tellian mountains, including the coastal plains and the steppic highlands, along a gradient of increasing aridity from North to South. The studied populations cover a wide range of bioclimatic stages ranging from the humid to the arid in Northern Algeria (Fig. 1). The prospected sites were characterized by their altitude (Alt), the classical Emberger's coefficient (Q2), the average annual rainfall (Pm), the average of the minimum temperature of the coldest month (Tm) and the average of the maximum temperature of the hottest month (TM) (Table 1). Mature seeds of each individual were extracted from pods, scarified, then sterilized with 3% (v/v) sodium hypochlorite solution. Sterile grains were germinated in the dark for 2 days in petri dishes containing 1% water-agar (w/v) at room temperature, then kept under normal daylight for 6 days.

Morphological analysis

Morphological measurements were implemented on only 13 species of the collection. For each accession, twelve quantitative traits related to pod, seed and seedling described by Issolah and

Abdelguerfi (1999) were scored: pod size: length (LP), width (WP); number of seeds per pod (SP); seed size: length (LS), width (WS); weight of 30 pods (WTP); weight of a thousand seeds (WTS) and the ratio weight of seeds/weight of pods (RW); seedling traits: Emergence date of cotyledons (DCOT), length of the first leaf (LFL), breadth of the first leaf (BFL) and Area of the first leaf (AFL=LFL*BFL). DCOT was measured from the moment the seedlings were placed under light. LFL, BFL and AFL were measured after six days of germination. Each trait was scored as a mean value of ten randomly chosen individuals for every accession.

Isozyme analysis

A total of 169 accessions represented by 14 species were assessed using two enzymatic systems: Esterase (EST, E.C. 3.1.1.-) and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1) (Weeden and Wendel, 1990). Isozymes were extracted from seedling leaves using the procedure of Bendiab *et al.* (1993). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed according to Singh *et al.* (1991) on 10 % polyacrylamide gels for the analysis of EST, while GOT system required 7% polyacrylamide gels (Bendiab *et al.*, 1993). The analysis was carried out at 40 mA for 3 hours at 4 °C. Gels were stained according to the methods given by Bendiab *et al.* (1993).

Data analysis

The morphological characteristics were analyzed using the principal component analysis (PCA). Mean, standard deviation (s.d.) and coefficient of variation (CV) of the morphological traits for the 13 studied species were computed. The correlation between morphological variability and bioclimate was examined by another PCA including the most important ecological parameters (Alt, Pm, Tm, TM and Q2). Phenetic relationships among species were evaluated by UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) cluster analysis based on Euclidean distances. All analyses based on morphological markers were performed using Statistica version 6.0 program.

For each enzyme system, Phenotypic polymorphism for each isozyme locus and species was estimated using the P_i index utilized by Kahler *et al.* (1980), Al Mouemar and Gasquez (1983), Warwick and Black (1986) and Bendiab *et al.* (1993): $P_i = \sum_{j=1}^n P_{ij}(1 - P_{ij}) = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$ where P_{ij} is the frequency of the i th phenotype and n is the number of phenotypes observed per locus for each species. The weighted average amount of phenotypic polymorphism \bar{P} over all observed enzyme zones is given by $\bar{P} = \sum_{j=1}^k (1/N_j) P_j / \sum_{j=1}^k (1/N_j) = 1/K \sum_{j=1}^k (1/N_j)$, where N_j is the total number of phenotypes observed (collection wide) per j th locus for k loci. To estimate the isoenzymatic variation among the species UPGMA dendrogram was constructed based on Jaccard's index (Jaccard, 1908) using XLSTAT version 2014.1.09 software package. The reliability of the generated dendrogram was also tested using SPSS version 20.0 and Statistica version 6.0 Software programs. The correlation between the morphological and isozyme distances was tested with Mantel Z-statistic (Mantel, 1967).



Fig. 1. Map indicating the location of the sampled populations of the genus *Medicago* L. in relation to bioclimatic stages in northern Algeria

Table 1. *Medicago* accessions and sampling sites with main bioclimatic parameters used in this study

N°	Localities	Sample size	Alt	Pm	Tm	TM	Q2*
1	Oued Arhmenia	5 (Mt, Mpv, Mc, Mo, Marb)	757	568	2.5	31.3	67.65
2	Bab Trouche	4 (Mt, Mp, Mc, Mmx)	831	742	4.4	31.1	95.32
3	Beni Hemiden	6 (Mt, Mpv, Mc, Mo, Mmx, Mp)	429	704	3.2	31.4	85.63
4	Cherraba	6 (Mt, Mpv, Mmin, Mo, Mmx, Mp)	850	558	3	32.2	65.55
5	Chaaber ersas	7 (Mt, Mpv, Mc, Mo, Mmx, Mp, Mc)	584	624	3.3	32	74.58
6	Oum Bouaghi	3 (Mt, Mpv, Mstv)	883	462	0.4	31.3	51.28
7	Ouled Hemla	2 (Mt, Mpv)	795	454	1.9	31.7	52.26
8	Ain Fakroun	4 (Mt, Mpv, Mo, Mmin)	1010	492	0.4	30.8	55.51
9	Tipaza	7 (Mt, Mo, Mmin, Mp, Mlit, Mit ssp helix, Mit ssp tornata)	196	626	8.4	30.1	98.95
10	Bourdj bouariridj	5 (Mt, Mpv, Mmin, Mo, Mrg)	907	368	1.6	33.4	39.69
11	Mansoura	2 (Mt, Mrg)	504	409	3.1	32.6	47.55
12	Lac ain zada	4 (Mt, Mpv, Mrg, Mmin)	997	495	0.2	31.1	54.95
13	Achir	1 (Mt)	984	420	1.2	33.1	45.16
14	Sidi Belabbes	3 (Mo, Mp, Mc)	465	450	4.8	29.7	61.99
15	Bouira	5 (Mt, Mpv, Mp, Mo, Mmx)	537	506	0.2	30.9	56.53
16	Akhalaria	6 (Mt, Mpv, Mp, Mc, Mint, Mp)	144	711	5.9	31.9	93.80
17	Boumerdès	1 (Mp)	20	739	6.8	30.8	105.62
18	Tizi Ouzou	1 (Mp)	129	896	6.2	32	119.12
19	El madania	3 (Mc, Mp, Mlu)	120	707	8.1	28.5	118.87
20	Mohamadia	4 (Mt, Mc, Mo, Mp)	3	670	7.6	29.8	103.52
21	Sidi Fredj	2 (Mit, Mli)	1	666	8.4	28.3	114.79
22	Ben Aknoun	4 (Mt, Mp, Mmx, Mmin)	172	762	6.9	28.4	121.57
23	Blida	5 (Mt, Mpv, Mp, Mo, Mc)	70	791	7	30.9	113.52
24	Mostaganem	4 (Mp, Mpv, Mmin, Mlit)	94	347	8.3	27.8	61.04
25	Khemis Meliana	4 (Mt, Mpv, Mc, Mp)	396	593	6	33.5	73.96
26	Ain Defla 2	9 (Mt, Mc, Mmin, Mp, Mmx, Mpv, Mp, Mo, Mit ssp corrugata)	257	593	6	33.5	73.96
27	Ain Defla 3	3 (Mpv, Mp, Mc)	382	593	6	33.5	73.96
28	Relizane	3 (Mmin, Mp, Mc)	58	348	6.8	31.1	49.12
29	Chlef	5 (Mt, Mpv, Mp, Mc, Mmx)	135	405	6.6	32.6	53.43
30	Mascara	4 (Mt, Mp, Mc, Mpv)	281	368	7.5	29	58.71
31	Medea	7 (Mt, Mo, Mmin, Mmx, Mc, Mpv, Mp)	385	736	2.5	30.6	89.84
32	Tissemsilt	6 (Mt, Mp, Mpv, Mc, Mmin, Mmx)	575	609	1.1	30.1	72.03
33	Guelma	6 (Mt, Mpv, Mo, Mc, Mmx, Mp)	798	564	1.9	32.1	64.06
34	Annaba	4 (Mp, Mpv, Mo, Mmx)	132	712	8.2	28.1	122.72
35	Akbou	5 (Mc, Mpv, Mh, Mmx, Mint)	207	659	6.2	31.3	90.05
36	Tichy	1 (Mp)	2	856	8.7	28.9	145.35
37	Sétif 1	6 (Mt, Mp, Mpv, Mo, Mmin, Marb)	1022	482	1	31.3	54.56
38	Sétif 2	1 (Mt)	1089	473	0.3	31.7	51.67
39	Eulma	2 (Mmin, Mlu)	1062	473	0.3	31.7	51.67
40	Fesdis	4 (Mp, Mpv, Mo, Mt)	946	335	0.7	32.6	36.02
41	Kissir	1 (Mpv)	166	818	8.2	29.3	132.97
42	Boughdir	2 (Mpv, Mo)	132	818	8.2	29.3	132.97
43	Grand phare	1 (Mlit)	9	818	8.2	29.3	132.97
44	Oran	4 (Mp, Mpv, Mt, Mmin)	87	383	8.2	26.6	71.40
45	Jeanne d'arc	1 (Mlit)	11	767	7.1	28.5	122.94
46	Oued righa	2 (Mpv, Mmin)	32	767	7.1	28.5	122.94
47	Filfila	1 (Mit)	159	794	5.7	29.6	113.95

* The Mediterranean bioclimatic coefficient of Emberger, Q2, is calculated according to Stewart (1974), $Q2 = 3.43 P/(M-m)$, where P is the annual rainfall, M and m are the average of the maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively;

Mt = *M. truncatula*, Mp = *M. polymorpha*, Mpv = *M. polymorpha* var. *vulgaris*, Mc = *M. ciliaris*, Mo = *M. orbicularis*, Marb = *M. arabica*, Mmin = *M. minima*, Mmx = *M. murex*, Mrg = *M. rigidula*, Mit = *M. italica*, Mlit = *M. littoralis*, Mint = *M. intertexta*, Mlu = *M. lupulina*, Mstv = *M. sativa*, Mab = *M. arborea*

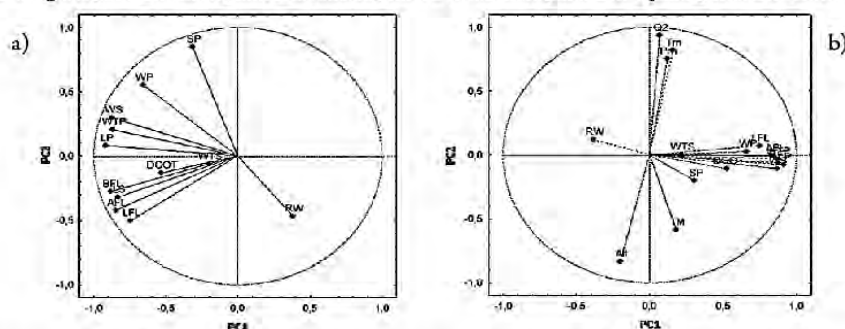


Fig. 2. Principal component analysis of twelve morphological characteristics (a) and their relationship with ecological parameters (b)

Table 2. Mean, range, standard deviation and coefficient of variation of the analyzed traits for the 13 *Medicago* species

Traits	Mean	Min.	Max.	s.d.	CV (%)
LP (mm)	6.42	2.39	13.28	2.91	2.37
WP (mm)	9.20	2.01	15.53	2.95	2.43
WTP (g)	2.84	0.06	9.45	2.24	1.41
SP (score)	6.23	1	28	4.48	5.61
LS (mm)	3.34	1.81	5.37	0.80	0.18
WS (mm)	1.96	1.08	2.98	0.46	0.06
WTS (g)	5.53	1.03	15.64	3.74	3.91
RW (g/g)	2.64	0.64	21.33	2.16	1.31
DCOT (score)	1.62	1	4	0.84	0.20
LFL (mm)	7.63	3.39	15.10	2.24	1.40
BFL (mm)	3.32	1.74	6.80	1.08	0.33
AFL (mm ²)	27.19	6.17	94.55	16.99	80.79

Min: Minimum, Max: Maximum, s.d.: Standard deviation, CV: Coefficient of Variation, LP: Length of pod, WP: Width of pod, WTP: Weight of 30 pods, SP: Number of seeds per pod, LS: Length of seed, WS: Width of seed, WTS: Weight of thousand seeds, RW: Ratio weight of seeds/Weight of pods, DCOT: Emergence date of cotyledons, LFL: Length of the first leaf, BFL: Breadth of the first leaf, AFL: Area of the first leaf

Table 3. Correlation matrix between the 12 morphological characteristics analyzed ($p < 0.05$)

Traits	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LFL	BFL	AFL
LP	1.00	0.59	0.88	0.31	0.82	0.81	0.12	-0.34	0.46	0.55	0.74	0.68
WP	1.00	0.57	0.62	0.31	0.74	0.20	-0.38	0.29	0.24	0.45	0.35	0.35
WTP		1.00	0.41	0.74	0.80	0.10	-0.42	0.35	0.49	0.64	0.60	0.60
SP			1.00	-0.09	0.54	-0.03	-0.38	0.09	-0.12	0.10	-0.02	-0.02
LS				1.00	0.66	0.19	-0.24	0.37	0.73	0.71	0.73	0.73
WS					1.00	0.13	-0.31	-0.42	0.48	0.66	0.58	0.58
WTS						1.00	-0.09	-0.02	0.20	0.14	0.16	0.16
RW							1.00	-0.03	-0.14	-0.20	-0.15	-0.15
DCOT								1.00	0.33	0.52	0.46	0.46
LFL									1.00	0.78	0.91	0.91
BFL										1.00	0.94	0.94
AFL											1.00	1.00

LP: Length of pod, WP: Width of pod, WTP: Weight of 30 pods, SP: Number of seeds per pod, LS: Length of seed, WS: Width of seed, WTS: Weight of thousand seeds, RW: Ratio weight of seeds/Weight of pods, DCOT: Emergence date of cotyledons, LFL: Length of the first leaf, BFL: Breadth of the first leaf, AFL: Area of the first leaf.

Results

Morphological markers

Morphometric characteristics analysis

Mean, range, s.d. and CV values of the morphological characteristics studied are shown in Table 2. Area of the first leaf (AFL) was found to be the most variable characteristic with CV of 80.79 %. Forty-five accessions showed AFL greater than the overall mean. It ranged from 6.17 mm² to 94.55 mm² with an average of 27.19 mm² across all species. Followed by SP with CV value of 5.61 %, whence the lowest SP was 1, while the highest was 28. Seed size characteristics (LS and WS), DCOT and BFL displayed the lowest CV values with 0.18, 0.06, 0.20 and 0.33, respectively.

Fig. 2a shows the principal component analysis performed on the twelve quantitative traits analyzed. According to Kaiser Standard, we elected the first three axes, which accounted for 76.47 % of the total variation with 50.84 %,

16.68 % and 8.94 % for axis 1, 2 and 3, respectively. The component values of each variable were projected in the two first principal components (PC1 and PC2). The characteristics were distributed along PC2 and in the negative values of PC1, except RW, which was negatively correlated with all other characteristics (Table 3). The traits: LP, WP, WTP, LS, WS, LFL, BFL and AFL displayed a relative correlation between them (Table 3) and showed the highest contribution to PC1 which differentiates the majority of species. PC2 was influenced essentially by SP characteristic. WTS was misrepresented in the plan 1-2, but contributed highly to the construction of PC3.

Correlation between morphological characteristics and ecological parameters

In order to ascertain the relationship between morphological traits studied and bioclimate, another PCA (Fig. 2b) was performed taking into account both morphometric characteristics and the five ecological parameters (Alt, Pm, Tm, TM and Q2). The first four axes explained 74.22% of the total variation (36.40%, 19.08%, 11.74% and 6.99%, respectively). All the characteristics formed a group strongly contributed to the formation of PC1, excluding SP and WTS that showed high loadings in relation to PC3 and PC4, respectively, whereas climatic parameters displayed another group along PC2. This distribution of variables indicates a very low correlation between morphological characteristics and bioclimate. Whence, the closest relationship was found between TM and WTS with $r = 0.26$ and the strongest negative correlation was shown between Alt and WP with $r = -0.19$ when $p < 0.05$ (data not shown).

Cluster analysis based on morphological characteristics

Euclidean distances values based on the twelve quantitative traits were represented in a UPGMA phenogram (Fig. 3). The topology of the phenogram subdivided the species at a distance level $d = 33.09$ into two major clusters. Cluster I included six species with highest values of morphological characteristics (*M. ciliaris*, *M. rigidula*, *M. intertextata*, *M. murex*, *M. italica* and *M. arborea*) and was especially characterized by the highest WTS. The second cluster is subdivided into three main groups at a high distance level $d = 24.17$. All species presented intermediate

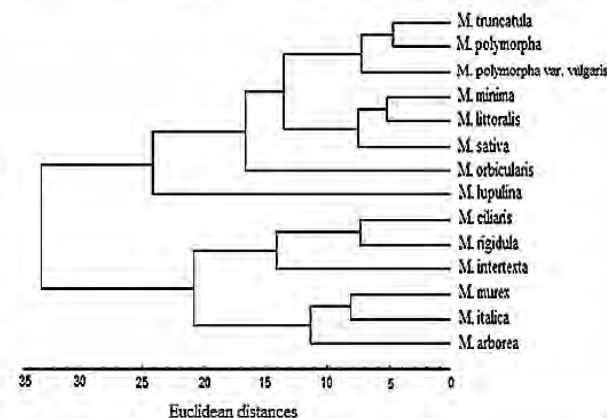


Fig. 3. UPGMA dendrogram based on morphological characteristics of 13 species of the genus *Medicago* L.

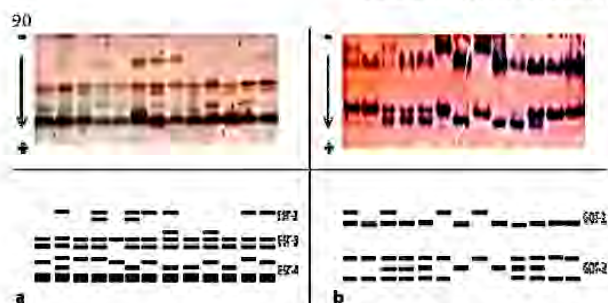


Fig. 4. Zymograms in some accessions of *M. truncatula* esterase (a) and *M. polymorpha* glutamate oxaloacetate transaminase (b)

dimensions of morphological characteristics (*M. truncatula*, *M. polymorpha*, *M. polymorpha* var. *vulgaris*, *M. minima*, *M. littoralis* and *M. sativa*) form the group I at distance value $d = 13.51$. The second group (II) linked to the first one at the level $d = 16.69$; was composed of one species (*M. orbicularis*) which was different from the other species by the highest SP. The third group (III) was formed by the most distant species (*M. lupulina*); this one was characterized by the lowest morphological traits. According to the morphometric markers, the smallest genetic distance was observed between *M. truncatula* and *M. polymorpha* (4.8) followed by *M. minima* and *M. littoralis* (5.2).

Isozyme markers

The revealed zymograms displayed a number of variable bands according to the system and analysed species. Examples of zymograms for the two enzymatic systems studied (EST and GOT) and their diagrammatical representations are shown in Fig. 4. A total of six isozyme loci with 32 bands were detected and 92 isoenzyme phenotypes were recorded for the two enzymes analyzed. Frequencies of isoenzyme phenotypes are given in Table 4.

Phenotype frequencies

Ten bands were scored based on the GOT enzyme system, attributed to 2 loci with 9 and 12 types of zymograms for *Got-1* and *Got-2*, respectively. The number of bands varies from 1 to 3 at the 2 loci (Fig. 4b). The *Got-1* isozyme type A, which is characterized by only one allozyme (band 4) was the most common and present in all the fourteen species analyzed with 0.77 frequency (Table 4). All other isozyme types of this locus were considered to be rare. At the *Got-2* locus, the most frequent isozyme type was *Got-2A* (encoding the allozyme 9) with 0.36 frequency. This one was absent in five species but present in all accessions of *M. truncatula*, *M. littoralis* and *M. rigidula* (1.00), followed by isozyme types D and F with frequencies 0.17 and 0.14, respectively. The lowest frequency (0.01) was observed for the isozyme types C, I, K and L, which were only present in one accession of *M. polymorpha*, varieties *M. polymorpha* var. *vulgaris* and *M. ciliaris*, respectively.

Four zones of activity considered as product of four EST loci were observed among all 169 accessions. In total twenty-two EST bands attributed to 6, 20, 23 and 22 isozyme types for *Est-1*, *Est-2*, *Est-3* and *Est-4*, respectively were recorded. All species represented by several accessions showed intra-specific variation for esterase system. The *Est-1* locus was only observed in the two *M. polymorpha* varieties and *M. intertexta*. A and B phenotypes

represented the two varieties: *M. polymorpha* and *M. polymorpha* var. *vulgaris* with frequencies 0.09 and 0.11, respectively. *M. intertexta* was characterized by the presence of the isozyme type C, which was also present in *M. polymorpha* var. *polymorpha* at a low frequency. The *Est-1* phenotype F was very rare; hence, it was present in uniquely one accession of *M. polymorpha*. The loci *Est-2*, *Est-3* and *Est-4* were present across the collection with a high phenotypes number and variability. The isozyme types: C of *Est-2*, C of *Est-3* and F of *Est-4* were the most frequent with 0.15, 0.21 and 0.27 frequencies, respectively. The *Est-4* phenotype (F) was characteristic of *M. polymorpha* and *M. polymorpha* var. *vulgaris* and it was present with high frequencies: 0.68 and 0.96 in the two varieties, respectively. A considerable number of rare and species-specific phenotypes with relatively low frequencies were recorded in these three loci (Table 4); as an example, phenotypes P, E and N of *Est-2*, *Est-3* and *Est-4* respectively, were only observed in two species, *M. ciliaris* and *M. intertexta*, hence, the phenotypes E and N exhibited two bands (11 and 22, respectively), which were species-specific to these two species.

Phenotypic polymorphism

The amounts of phenotypic polymorphism for each isozyme locus in each species (P_j) are reported in Table 5. The two GOT enzyme system loci (*Got-1* and *Got-2*) were monomorphic in some species and polymorphic in others, presenting average phenotypic polymorphism values (\bar{P}) of 0.18 and 0.21 respectively. However, these loci were highly polymorphic within the two varieties *M. polymorpha* and *M. polymorpha* var. *vulgaris* followed by *M. minima* with lower values of phenotypic polymorphism (P_j), but considered monomorphic in the four species *M. truncatula*, *M. orbicularis*, *M. littoralis* and *M. intertexta* with values of phenotypic polymorphism (P_j) ranging from 0.00 to 0.10. The *Est-1* isozyme had the lowest polymorphism value because it was present only in the two *M. polymorpha* varieties, but with a high level of genetic variation in each. The highest polymorphism indices (\bar{P}) were recorded in the three EST loci: *Est-2*, *Est-3* and *Est-4* with values of 0.39, 0.44 and 0.38 respectively, since all species were polymorphic for these EST loci with relatively high levels of variation, with P_j values ranging from 0.07 to 0.75 (Table 5). Based on the polymorphism values for each locus, differences between species could be observed. Generally, all the species displayed more or less important genetic diversity. The two varieties of *M. polymorpha* species showed the highest intraspecific variation across all the loci with \bar{P} of 0.57 for each, followed by *M. italica* and *M. ciliaris* with \bar{P} of 0.44 and 0.41, respectively. The three species *M. sativa*, *M. arborea* and *M. arabica* disclosed a null phenotypic polymorphism amount ($\bar{P}=0.00$) because they were represented by only one accession in the study.

Cluster analysis based on isozyme variability

Interesting information in interspecific variability is obtained with cluster analysis. The UPGMA dendrogram based on distances matrix of the species wise pooled zymogram (Fig. 5) agrees with taxonomic criteria and showed two major clusters. The first one was composed of two species belonging to the subsection *Leptospireae* of the section *Spirocarpos*, namely *M. polymorpha* and *M. arabica*. The second cluster was the largest and embodied the remaining species belonging to five sections namely *Spirocarpos*, *Orbicularis*, *Medicago*, *Lupularia* and

Table 4. Isozyme types frequencies at six loci in fifteen species of the genus *Medicago*

Loci	Phenotypes	Total	Species														
			Mt	Mp	Mpv	Mc	Mo	Mbn	Mnc	M#	M#	MRg	Mlu	Mou	Mvo	Mdr	Mab
Gat-1	A:4	0.77	0.97	0.68	0.50	1.00	1.00	0.87	0.08	1.00	1.00	0.67	0.50	1.00	100	100	100
	B:5	0.02	0.03	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C:3+4	0.08	-	0.18	0.25	-	-	-	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-
	D:1+4	0.01	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E:3+4+5	0.01	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F:3	0.05	-	0.07	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G:2+4	0.05	-	-	-	-	-	-	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-
	H:4+6	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-
	I:2+5	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-	-
Gat-2	A:9	0.36	1.00	0.07	0.07	-	-	0.93	-	0.60	1.00	1.00	-	-	100	100	100
	B:7+8	0.03	-	0.11	-	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C:7+9	0.01	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D:8+9	0.17	-	0.14	0.18	0.21	-	-	1.00	0.20	-	-	1.00	-	-	-	-
	E:7+8+9	0.02	-	0.11	0.00	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F:8+10	0.14	-	0.25	0.39	0.16	0.06	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
	G:8	0.08	-	0.11	0.14	0.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H:8+9+10	0.06	-	0.18	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I:9+10	0.01	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J:10	0.11	-	-	-	-	0.94	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K:7+8+10	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L:7	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
Est-1	A:1+2+3	0.09	-	0.29	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B:2+3	0.11	-	0.54	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C:3	0.02	-	0.07	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-	-
	D:1+2	0.05	-	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E:2	0.04	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F:1+3	0.01	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G:Null	0.67	1.00	0.07	0.04	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-	100	100	100
Est-2	A:5+6	0.02	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B:5	0.13	0.45	-	-	0.05	-	0.47	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-
	C:6	0.15	0.07	0.07	0.14	-	0.72	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	-
	D:5+6+7	0.09	-	0.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E:6+7	0.09	-	0.25	0.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F:7	0.03	-	0.07	0.04	-	-	-	0.08	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	G:4+6+7	0.06	-	-	0.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H:4+6	0.01	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I:8	0.09	-	-	-	0.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J:5+9	0.05	-	-	-	-	-	0.53	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
	K:9	0.07	-	-	-	-	0.11	-	0.58	-	-	0.33	1.00	-	-	-	-
	L:4	0.03	-	-	0.04	-	-	-	-	0.40	-	-	-	-	100	100	-
	M:8+9	0.02	-	-	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	N:7+9	0.02	-	-	-	0.05	-	-	0.08	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	O:6+9	0.02	-	-	-	-	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P:5+8	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
	Q:5+7	0.01	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R:4+7	0.01	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S:5+8+9	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T:4+5+6	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
U:Null	0.08	0.38	-	-	-	-	-	-	0.20	-	0.67	-	-	-	-	-	
Est-3	A:12+14	0.08	0.45	-	-	-	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	B:10+12+14	0.09	0.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C:12	0.21	0.03	0.68	0.43	-	-	-	-	0.20	0.67	-	-	-	-	-	-
	D:11+14	0.07	-	-	-	0.58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E:11+13	0.04	-	-	-	0.32	-	-	-	-	-	-	-	0.50	-	-	-
	F:10+15	0.05	-	-	-	-	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G:10+14+15	0.04	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H:15	0.04	-	-	-	-	0.17	0.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I:13+15	0.04	-	-	-	-	-	0.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J:14	0.05	-	-	-	-	-	-	0.58	-	-	-	0.50	-	100	-	-
	K:10+14	0.02	-	-	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
	L:10+12	0.02	-	-	-	-	-	-	-	0.20	0.60	-	-	-	-	-	-
	M:13	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33	-	0.50	-	-	-
	N:12+16	0.01	-	-	-	-	-	-	-	0.40	-	-	-	-	-	-	-
	O:12+13	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
	P:10+13	0.01	-	-	-	-	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	Q:10+12+13+16	0.01	-	-	-	-	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
	R:13+15+16	0.01	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S:10+13+15+16	0.01	-	-	-	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T:10+13+15	0.01	-	-	-	-	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
	U:14+15	0.01	-	-	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V:11+14+16	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	W:11+13+14	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	X:Null	0.17	-	0.32	0.57	-	-	-	0.17	-	-	-	0.50	-	-	-	100

92

Est-4	A: 18+20	0.10	0.48	-	-	-	0.06	-	-	0.20	0.20	-	-	-	-	-	-	-	-
	B: 17+20	0.06	0.14	-	-	-	-	-	-	0.40	0.80	-	-	-	-	-	-	-	-
	C: 19+20	0.08	0.28	-	-	-	-	-	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D: 17+19+20	0.07	0.03	0.32	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E: 20	0.02	0.07	-	-	-	-	-	-	0.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F: 17+19	0.27	-	0.68	0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G: 18+19	0.07	-	-	-	-	0.06	0.73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H: 19	0.04	-	-	0.04	-	-	0.27	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	1.00
	I: 18+21+22	0.02	-	-	-	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J: 22	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K: 17+18+20	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	L: 17+18+22	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M: 17+18+21	0.02	-	-	-	0.11	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	N: 18+19+21	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	O: 19+20+21	0.03	-	-	-	-	-	-	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P: 18+21	0.15	-	-	-	0.42	0.83	-	-	-	-	-	0.67	-	-	-	-	-	-
	Q: 17+18+19+21	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R: 18+20+21	0.01	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00
	S: 17+18+19	0.01	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T: 17+21	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	U: 17+20+21	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50
	V: 18+19+21+22	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50

Mt = *M. truncatula*, Mp = *M. polymorpha*, Mpv = *M. polymorpha* var. *vulgaris*, Mc = *M. ciliaris*, Mo = *M. orbicularis*, Marb = *M. arabica*, Mmin = *M. minima*, Mmx = *M. murex*, MRg = *M. rigidula*, Mit = *M. italica*, Mlit = *M. littoralis*, Mint = *M. intertexta*, Mlu = *M. lupulina*, Mstv = *M. sativa*, Mabrt = *M. arborea*.

Table 5. Phenotypic polymorphism for each of the six loci in each of the studied species

Species	Isozymes						Mean
	Got-1	Got-2	Est-1	Est-2	Est-3	Est-4	
<i>M. truncatula</i>	0.07	0.00	0.00	0.64	0.53	0.66	0.32
<i>M. polymorpha</i>	0.50	0.84	0.62	0.59	0.44	0.44	0.57
<i>M. polymorpha</i> var. <i>vulgaris</i>	0.62	0.75	0.75	0.74	0.49	0.07	0.57
<i>M. ciliaris</i>	0.00	0.77	0.00	0.36	0.56	0.75	0.41
<i>M. orbicularis</i>	0.00	0.10	0.00	0.43	0.66	0.29	0.25
<i>M. minima</i>	0.23	0.12	0.00	0.49	0.68	0.39	0.32
<i>M. murex</i>	0.40	0.00	0.00	0.58	0.57	0.64	0.37
<i>M. italica</i>	0.00	0.56	0.00	0.72	0.72	0.64	0.44
<i>M. littoralis</i>	0.00	0.00	0.00	0.32	0.56	0.32	0.20
<i>M. rigidula</i>	0.44	0.00	0.00	0.44	0.44	0.44	0.30
<i>M. lupulina</i>	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.25
<i>M. intertexta</i>	0.00	0.00	0.00	0.50	0.50	0.50	0.25
<i>M. sativa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. arborea</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>M. arabica</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mean	0.18	0.21	0.09	0.39	0.44	0.38	0.28

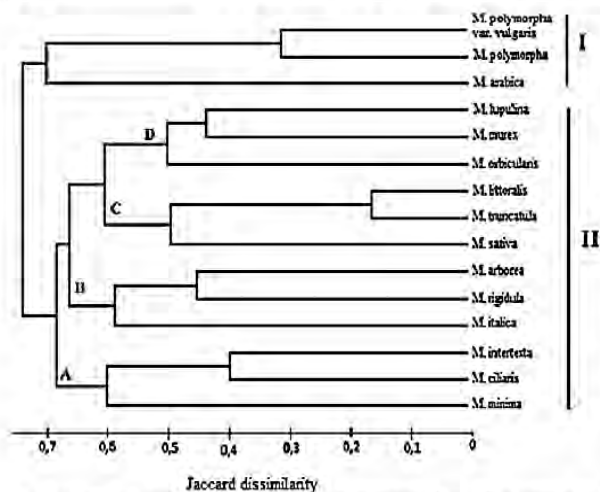


Fig. 5. UPGMA dendrogram based on isozyme data of 14 species of the genus *Medicago* L.

Dendrotelis. This cluster is subdivided at high close distances into four sub-clusters (A, B, C and D) each having three species only (Fig. 5). *M. intertexta*, *M. ciliaris* and *M. minima* formed the

sub-cluster A at a distance level of 0.69. The sub-cluster B comprised of *M. arborea*, *M. rigidula* and *M. italica* joined with the sub-clusters C (*M. littoralis*, *M. truncatula* and *M. sativa*) and D (*M. lupulina*, *M. murex* and *M. orbicularis*) at 0.66 level of distance. These last sub-clusters (C and D) were distinguished from one another at distance of 0.61. *M. truncatula* and *M. littoralis* both belonging to subsection *Pachyspireae* of the section *Spirocarpos* showed the highest similarity between them, with Jaccard's index of 0.17, followed by the two varieties of *M. polymorpha* at dissimilarity value of 0.32, then *M. ciliaris* and *M. intertexta* both belonging to subsection *Intertextae* of the section *Spirocarpos*, with Jaccard's index of 0.4. Despite the fact that are belonging to different sections, the two species *M. lupulina* and *M. murex* as well as *M. arborea* and *M. rigidula* showed a significant similarity between them.

Finally, Mantel Z-statistical analysis based on Pearson correlation showed no significant correlation ($r = 0.092$, $p = 0.395$) between morphological and isozyme distance matrices.

Discussions

In this screening of genetic divergence in natural populations of the genus *Medicago* L., morphological and isozyme markers were compared for fourteen species represented by 169 accessions collected in wide range of climatic stages in Northern Algeria. The importance of morphological variation among the examined species is demonstrated by the PCA analysis on twelve quantitative traits and the topology of the dendrogram based on Euclidean distance that showed the discrimination of the species under study.

The majority of morphological characteristics analyzed in this study were important in the differentiation of the species. Pod size (LP and WP), WTP, seed size (LS and WS) and seedling traits (DCOT, LFL, BFL and AFL) participated strongly to the discrimination of all the species into two mean groups: a group included species with high measured values of morphological characteristics (*M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. rigidula*, *M. murex*, *M. italica* and *M. arborea*) and a second group embodied the remaining species characterized by intermediate to low measured values of morphological characteristics.

The importance of these traits is evidenced by its high loadings in the first principal component. Seedling traits: LFL, BFL and AFL had large genetic correlations among them (Table 2); this finding was also observed by Bonnin *et al.* (1996) when analyzing *Medicago truncatula* population structure by quantitative genetic markers. The characteristic SP which contributed strongly to PC2 differentiates the two species (*M. orbicularis* and *M. lupulina*) from one another and from the other species. Hence, it is known that *M. orbicularis* is characterized by a high number of seeds per pod, while *M. lupulina* is characterized by only one seed per pod (Lesins and Lesins, 1979). Another characteristic with great contribution to PC3 was WTS, it allowed the ingathering of species with high seed size, e.g. *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. murex* and *M. rigidula*. Lesins and Lesins (1979) noted the relationship between these traits and reported that the weight of 1,000 seeds give *a priori* a fair idea about the size of the seeds.

Our results showed that there were significant morphological variations within and among species in terms of pod, seed and seedling traits. Moreover, all taxonomists used fruit traits (pod and seed) as an important key for distinguishing species of the genus *Medicago* L. (Heyn, 1963; Lesins and Lesins, 1979; Quezel and Santa, 1962; Small and Jomphe, 1989). This high morphological variation is consistent with findings of many genetic diversity studies on *Medicago* L. germplasm collections (Al-Faifi *et al.*, 2013; Bonnin *et al.*, 1996; Bullitta *et al.*, 1994; Cherifi *et al.*, 1993; El Hansali *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 1980; Tucak *et al.*, 2008; Zivković *et al.*, 2012).

The even large differentiation among and within these Algerian wild pool for quantitative characteristics is probably due to the vast geographic area that is represented, and thus the large heterogeneity among habitats encountered. Nonetheless, this hypothesis is rejected by our finding about the relationship between environment and phenotypic features, whence no significant correlation was appreciated. Various studies on the genus *Medicago* L. revealed positive correlation between morphological traits and climatic factors (Abdelguerfi and Laouar, 1999; Al-Faifi *et al.*, 2013; Zivković *et al.*, 2012). Prosperi *et al.* (2006) when evaluating morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. in Spain found low significant correlations between the two sets of variables (morphology and bioclimate) and noticed that the environmental characteristics that influence more the phenotypic traits of the natural populations studied were the altitude, summer rainfall and latitude.

Because morphological traits only represent a part of the genetic diversity, and because the organization of this diversity is highly subject to natural selection and environmental factors, knowledge of the evolution and dynamics of populations requires analysis of more neutral markers such as isozymes that should help to specify the genetic structure of populations. The two enzymatic systems (EST and GOT) revealed high genetic diversity within and among the species studied, hence, six loci with 32 bands and 92 phenotypes were detected.

This result is in agreement with findings of many enzymatic variation studies on *Medicago* populations (Bullitta *et al.*, 1994; Chandra *et al.*, 2011; Cherifi, 1996;

Haddioui *et al.*, 2012; Jenczewski *et al.*, 1999a, 1999b). This important enzymatic variability could be the result of the fact that the majority of these species are annual reputed to be autogamous (Hamrick and Godt, 1990).

EST are a complex and heterogeneous enzyme group with multiple substrate specificity (Scandalios, 1969) and one of the enzymatic systems with a high polymorphism in plants (Weeden and Wendel, 1990). In the current study, the estimate showed highest variability for EST isozymes, recording four loci with 71 types and all 22 bands contributed this difference. A lower genetic diversity was detected based on GOT enzymatic system, thus, two loci and 10 bands attributed to 21 phenotypes were scored across the collection. However, in addition to EST enzyme, high intra-specific variation was observed in the two varieties of *M. polymorpha* for GOT enzyme too. Similar results were found by Bullitta *et al.* (1994), Hannachi (1998), Paredes *et al.* (2002), suggesting that the high levels of autogamy in this species result in a strong pattern of among population genetic differentiation.

The topology of the dendrogram based on Jaccard's index generated from the isozyme binary data matrix was logical and the mean Jaccard's indices of the fourteen species ranged from 0.18 to 0.59 with an average of 0.37. This wide range of similarity indices reflects a high degree of polymorphism at isozyme level. This type of clustering was used also by Chandra *et al.* (2011) who estimated a high level of similarity among accessions and species of the genus *Medicago* L. The most similar species were *M. truncatula* and *M. littoralis*. This is in agreement with taxonomic criteria; hence, this two species belong to the same subsection (*Pachyspireae*). Valizadeh *et al.* (1996) when estimated genetic distances among nine species of *Medicago* based on RFLP markers, showed that *M. truncatula* and *M. littoralis* were the most similar, that makes isozyme markers as important as molecular ones. Strong similarity was observed also between the two *M. polymorpha* varieties (*polymorpha* and *vulgaris*) which were characterized by the presence of band 4 and band 5, respectively, based on EST enzyme system. *M. ciliaris* and *M. intertexta* showed also a high similarity between them, since belonging to the subsection *Intertextae* (Small and Jomphe, 1989). The close isozyme relationship among these two species was already elucidated (Cherifi, 1996).

The Mantel test ($r = 0.092$, $p = 0.395$) indicated no significant correlation between the matrix based on morphological characteristics and that derived from the enzymatic analysis. Therefore, clustering of accessions based on morphological characteristics was inconsistent with that derived from the isozyme markers analysis. The result suggests that the two marker systems give different estimates of genetic relations among populations. A large number of studies have been published that detail the comparative divergence of phenotypic and allozymic characteristics (Bonnin *et al.*, 1996; Jenczewski *et al.*, 1999a; Long and Singh, 1995; Podolsky and Holtsford, 1995; Spitze, 1993; Yang *et al.*, 1996). Most of these have reported stronger differences with analyses of quantitative traits data than with electrophoretic ones and have suggested that natural selection acting upon the quantitative traits is responsible for the different patterns of differentiation revealed by neutral and quantitative traits.

Conclusions

In conclusion, the present study gives an insight into the rich variability and relationships present within and between Algerian *Medicago* species at morphological and enzymatic levels. This may allow greater understanding of the evolution of morphological and biochemical characteristics in this genus. In addition, the studied accessions can prove to be a good genetic source for further improvement programs. Moreover, certain species were having specific zymograms, hence, could serve as markers for species identification. In order to define more the genetic diversity of this *Medicago* collection, it is necessary to include protein and molecular analysis to have a complete understanding of the starting material for breeding purposes.

References

- Abdelguerfi A, Laouar M (1999). Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral: possibilités de valorisation en région Méditerranéenne. [Autecology and variability of some legumes of fodder and/or pastoral interest: valorization possibilities in Mediterranean region]. *Pastagens e Forragens* 20:81-112.
- Al-Faifi SA, Migdadi HM, Al-Doss A, Ammar MH, El-Harry EH, Khan MA, Muhammad JM, Alghamdi SS (2013). Morphological and molecular genetic variability analyses of Saudi lucerne (*Medicago sativa* L.) landraces. *Crop & Pasture Science* 64:137-146.
- Al-Mouemar A, Gasquez J (1983). Environmental conditions and isozyme polymorphism in *Chenopodium album* L. *Weed Research* 23:141-149.
- Bailly X, Olivieri I, Brunel B, Cleyet-Marel JC, Bena G (2007). Horizontal gene transfer and homologous recombination drive the evolution of the nitrogen-fixing symbionts of *Medicago* species. *Journal of Bacteriology* 189:5223-5236.
- Bell C, Dixon R, Farmer A (2001). The *Medicago* genome initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Research* 29(1):114-117.
- Bena G, Prosperi JM, Lejeune B, Olivieri I (1998). Evolution of annual species of the genus *Medicago*: A molecular phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics Evolution* 9:552-559.
- Bendiab K, Baaziz M, Brakez Z, Sedra MyH (1993). Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. *Euphytica* 65:23-32.
- Bonnin I, Prosperi JM, Olivieri I (1996). Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. *Genetics* 143:1795-1805.
- Brown AHD, Weir BS (1983). Measuring genetic variability in plant populations. In: Tanksley SD, Orton TJ (Eds). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Elsevier Science Publishing Co, Amsterdam pp 219-239.
- Bullitta S, Floris R, Hayward MD, Loi A, Porqued du C, Veronesi F (1994). Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. *Euphytica* 77:263-268.
- Cannon SB, Sterck L, Rombauts S, Sato S, Cheung F, Gouzy J, Wang X, et al. (2006). Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. *Proceeding of the National Academy of Sciences United States of America* 103:14959-14964.
- Chandra A, Verma S, Pandey KC (2011). Genetic similarity based on isozyme banding pattern among fifty species of *Medicago* representing eight sections (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 39:711-717.
- Cherifi K (1996). Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill. [Enzymatic polymorphism of some natural populations of *Medicago ciliaris* (L.) Krock and *Medicago intertexta* (L.) Mill]. *Acta Botanica Gallica* 143:155-165.
- Cherifi K, Boussaid M, Marrakchi M (1993). Diversité génétique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill. I. Analyse de la variabilité morphologique. [Genetic diversity of some natural populations of *Medicago ciliaris* (L.) Krock and *Medicago intertexta* (L.) Mill. I. Morphological variability analysis]. *Agronomie* 13:895-908.
- El Hansali M, Zinelabidine LH, Haddioui A (2007). Variabilité des caractères morphologiques des populations naturelles de *Medicago truncatula* Gaertn. au Maroc. [Morphological characters variability of some natural populations of *Medicago truncatula* Gaertn. in Morocco]. *Acta Botanica Gallica* 154:643-649.
- Ferguson ME, Robertson LD (1996). Genetic diversity and taxonomic relationships within the genus *Lens* as revealed by allozyme polymorphism. *Euphytica* 91(2):163-172.
- Haddioui A, Zinelabidine LH, Nouri M, Ajal EA, El Hansali M, Hanine H (2012). Genetic diversity of natural populations of *Medicago truncatula* in Morocco using isozyme polymorphism. *World Journal of Agricultural Sciences* 8:13-19.
- Hamrick JL, Godt NJ (1990). Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (Eds). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates Inc, Sunderland pp 43-63.
- Hannachi AS, Boussaid M, Marrakchi M (1998). Genetic variability organization and gene flow in natural populations of *Medicago polymorpha* L. prospected in Tunisia. *Genetics Selection Evolution* 30:121-135.
- Heyn CC (1963). *The Annual Species of Medicago*. Magnes Press, Jerusalem.
- Issolah R, Abdelguerfi A (1999). Variability within 31 spontaneous populations of *Trifolium scabrum* L., nature of relations with factors of the site of origin. In: Etienne M (Ed).

- IX Meeting of the Fao-Ciheam Sub-Network on Mediterranean Pastures and Fodder Crops. Ciheam-Jamz, Badajoz pp 123-127.
- Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles 44:223-270.
- Jenczewski E, Prospero JM, Ronfort J (1999a). Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. American Journal of Botany 86:677-687.
- Jenczewski E, Prospero JM, Ronfort J (1999b). Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. Molecular Ecology 8:1317-1330.
- Kahler AL, Allard RW, Krzakow AM, Wehrhahn CG, Nevo E (1980). Associations between isozyme phenotypes and environment in the slender wild oat (*Avena barbata*). Theoretical and Applied Genetics 56:31-47.
- Kongkiatngam P, Waterway MJ, Fortin MG, Coulman BE (1995). Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. Euphytica 84:237-246.
- Lesins KA, Lesins I (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae). A Taxogenetic Study. The Hague, London.
- Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens Kew, UK.
- Long AD, Singh AS (1995). Molecules versus morphology: the detection of selection acting on morphological characteristics along a cline in *Drosophila melanogaster*. Heredity 74:569-581.
- Malaviya DR, Roy AK, Kaushal P, Kumar B, Tiwari A (2008). Genetic similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding pattern. Plant Systematics and Evolution, 276(1-2):125-136.
- Mantel N (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27:209-220.
- Paredes M, Becerra V, Rojo C, Del Pozo A, Ovalle C, Aronson J (2002). Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. RAPDs studies show little genetic divergence. Euphytica 123:431-439.
- Podolsky RH, Holtsford TP (1995). Population structure of morphological traits in *Clarkia dudleyana* L. comparison of FST between allozymes and morphological traits. Genetics 140:733-744.
- Prospero JM, Jenczewski E, Angevainand M, Ronfort J (2006). Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. Genetic Resources and Crop Evolution 53:843-856.
- Quezel P, Santa S (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. [New flora of Algeria and the southern desert regions]. CNRS, Paris.
- Radwan MS, Alfakhry AK, Al-Hasan AM (1980). Variation between and within species of annual medics from northern Iraq. Egyptian Journal of Agronomy 5:153-159.
- Scandalios JG (1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochemical Genetics 3:37-79.
- Singh NK, Shepherd KW, Cornish GB (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. Journal of Cereal Science 14:203-208.
- Small E (2010). Alfalfa and relatives: Evolution and classification of *Medicago*. NRC Research Press, Canada.
- Small E, Jomphe M (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). Canadian Journal of Botany 67:3260-3294.
- Spitze K (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. Genetics 135:367-374.
- Stewart P (1974). Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. Bulletin de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord 65:239-248.
- Tucak M, Popović S, Čupić T, Grljušić S, Bolarić S, Kozumplik V (2008). Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characteristics. Periodicum Biologorum 110:243-249.
- Valizadeh M, Kang K, Kanno A, Kameya T (1996). Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphism. Breeding Science 46:7-10.
- Warwick SI, Black LD (1986). Electrophoretic variation in triazine-resistant and susceptible populations of *Amaranthus retroflexus* L. New Phytologist 104:661-670.
- Weeden NF, Wendel JF (1990). Genetics of plant isozymes, In: Soltis DE, Soltis PE (Eds). Isozymes in Plant Biology. Dioscorides Press, Portland pp 46-72.
- Yang RC, Yeh FC, Yanchuk AD (1996). A comparison of isozyme and quantitative genetic variation in *Pinus contorta* ssp. *latifolia* by FST. Genetics 142:1045-1052.
- Zivković B, Radović J, Sokolović D, Ćiler B, Banjanac T, Strbanović R (2012). Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. Industrial Crops and Products 40:285-291.

Chapitre II

*Polymorphisme des protéines de réserve
(albumines et globulines) dans des espèces
spontanées du genre *Medicago* L.*

Préambule

Le polymorphisme des protéines de réserve des graines a été mis en évidence chez un nombre considérable d'espèces de différents groupes taxonomiques, en particulier chez les plantes cultivées et leurs apparentées sauvages (daussant *et al.* 1983).

Leur stabilité biochimique et leur déterminisme génétique relativement simple, ont suscité leur utilisation dans les analyses de la diversité supra et infra spécifique. Ce sont des marqueurs moléculaires souvent sous le contrôle de quelques gènes liés codominants constitués d'une série d'unités codantes qui découleraient de la duplication et de la divergence de gènes ancestraux. Les multiples expressions de la diversité allélique qui en résultent, confèrent aux espèces une grande souplesse adaptative (Gepts 1990).

Caractérisés par une grande spécificité taxonomique et un polymorphisme remarquable, ces marqueurs génétiques s'avèrent des outils rapides et efficaces qui ont permis, notamment chez les légumineuses et les graminées, d'élucider un bon nombre de questions sur l'homologie inter-génomique, l'identification parentale et les processus de domestication.

Dans le présent travail, 169 accessions représentant 14 espèces du genre *Medicago* L. ont été caractérisées en terme de leurs protéines de réserve de graines : albumines et globulines (séparées par SDS-PAGE) comme un moyen d'évaluer la variation génétique à des niveaux intra et interspécifiques. Ces accessions ont été recueillies dans différentes régions dans le Nord Algérien. Les résultats reflètent la grande diversité des deux fractions dans ce genre, d'où, 67 et 92 bandes ont été détectées pour les albumines et les globulines, respectivement. La plupart des espèces étudiées ont montré un polymorphisme intra-spécifique intéressant, avec le plus élevé a caractérisé les deux variétés de l'espèce *M. polymorpha*. Les dendrogrammes basé sur la méthode de clustering UPGMA généralement concordent avec les données déjà disponibles sur les relations interspécifiques du genre *Medicago* en fonction des caractéristiques morphologiques. Les indices de similarité de Jaccard varient de 0,39 à 0,94 avec une moyenne de 0,67 pour la fraction albumine, et de 0,55 à 0,91 avec une moyenne de 0,75 pour la fraction globuline. L'analyse électrophorétique des protéines de réserve des graines s'est avérée utile pour évaluer la diversité génétique, la distinction des espèces et la description de leurs similarités.

Polymorphism in seed Albumin and Globulin protein fractions from *Medicago* species naturally grown in Algeria

MEDOUKALI I. and KHELIFI D.*

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25 000, Constantine, Algérie.

*Corresponding author: Prof. Douadi KHELIFI, E-mail: dkhelifi@yahoo.fr

Accepted for publication in: World Applied Sciences Journal

Abstract

The characterization of plant genetic resources is the first step towards improving their use. In the present work, 169 accessions representing 14 species of the genus *Medicago* L. were characterized in terms of their albumin and globulin seed protein fractions (separated by SDS-PAGE) as a means of assessing the genetic variation at intra and interspecific levels. These accessions were collected from different regions in Northern Algeria. The results reflect the great diversity of albumin and globulin proteins in this genus; hence, 67 and 92 bands were detected for the two fractions respectively. Most of the studied species showed an interesting intraspecific polymorphism based on both protein fractions, with the highest characterized the species *M. polymorpha*. Dendrograms based on UPGMA clustering method generally agreed with data already available on interspecific relationships in *Medicago* based on morphological characteristics. Jaccard's similarity indices ranged from 0.39 to 0.94 with a mean of 0.67 for albumin fraction, and from 0.55 to 0.91 with an average of 0.75 for globulin one. Electrophoretic analysis of seed proteins proved to be useful for assessing genetic diversity, for distinguishing species and describing their similarity.

Keywords: *Medicago*, genetic diversity, albumin, globulin, seed storage proteins, SDS-PAGE.

INTRODUCTION

Seed storage proteins have been used as genetic markers in plants for evaluating the genetic variability of many species. Their main advantages as markers are a high polymorphism level, simple genetic control, environmental independency and their economic, easy and fast analysis [1]. These proteins are present in seeds of all plant species, because they are sources of amino acids for synthesis processes that occur during germination. Moreover, their variations have no repercussion on any physiological function, thus allowing these random changes to be maintained.

The seed storage proteins are classified in four fractions according to their solubility: albumins, globulins, prolamins and glutelins [2]. The most abundant class of storage proteins in grain legumes are the globulins. They are generally classified as 7S and 11S globulins according to their sedimentation coefficients (S). The 7S and 11S globulins of pea are named vicilin and legumin, respectively, so that the corresponding proteins of other legume seeds are often indicated as vicilin-and legumin-like globulins [3]. These proteins are also referred to by trivial names according to the plant from which they were extracted [4, 5, 6, 7]. Albumin proteins of legumes have been less extensively researched than globulins. This fraction has generally been regarded as the metabolic and enzymatic protein fraction with molecular weight of 6 to 100 kDa [8].

It was reported that electrophoretic analyses of seed storage proteins as revealed by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) have provided valid evidence for investigating genetic diversity and evaluating taxonomic and genetic associations in legumes at generic, specific and intra specific levels [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Leguminosae (Fabaceae) is third largest family of flowering plants comprises about 269 genera and 5100 species in the world [17]. The genus *Medicago* is placed in the tribes of *Trifolieae* of Fabaceae family and divided into 12 sections [18]. It has 87 species that are typically either perennial or annual [19]. The genus offers a wide range of diversity. Some species are diploids, tetraploids or even hexaploids (*M. cancellata*, *M. saxatilis*, and some populations of *M. arborea*). The chromosome number is often 8, but it can also be 7 (*M. constricta*, *M. polymorpha*, *M. praecox*, *M. rigidula* or certain taxons of *M. murex*) [20]. Increased resolution of relationships within *Medicago* will allow greater understanding of the evolution of morphological, molecular, and biochemical characters in this genus.

The aim of this study was to investigate both inter and intraspecific variations and relationships in 15 taxa of the genus *Medicago* represented by 169 accessions belonging to different geographic distributions in Algeria, based on albumin and globulin seed storage proteins as markers.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Fifteen taxa (13 species and 2 varieties) of the genus *Medicago* L. represented by 169 accessions already studied using morphological and enzymatic markers [21] were used in this study. This collection originate from pods collected from 47 sites representative of the Algerian diversity in eco-geographical profiles. The major characteristics of each site [altitude (Alt), latitude (Lat), longitude (Lon)] are detailed in Table 1. Mature seeds of each individual were extracted from pods, peeled and ground with a mortar and pestle at room temperature until a fine powder was obtained. The resulting meal was used as source of proteins in all experiments.

Albumins and globulins isolation

The sequential extraction process was carried out according to Freitas *et al.* [22], with small modifications. The resulting powder of each sample (10 mg) was defatted with *n*-hexane (0.35 ml) with stirring for 30 min, the hexane was decanted and air-dried after centrifugation of 15 min at 14 000 rpm. The albumin fraction was extracted from the defatted powder by stirring with 0.35 ml distilled water (pH 8) containing 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min at 4°C. The albumin-containing solution was centrifuged at 14 000 rpm, 4°C for 20 min and the supernatant was conserved at 4°C as the albumin fraction. This extraction was repeated twice to eliminate as possible as the remaining albumin fraction. The total globulins were extracted by stirring the pellet with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8, containing 10 % (w/v) NaCl, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM ethylene glycol bis (β-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) and 1 mM PMSF for 30 min at 4°C. The suspension was centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant contained the globulin fraction.

Electrophoretic analysis

Extracted albumin and globulin fractions were precipitated with 1 ml cold acetone (1:4 (v/v)) for 1 h at -20°C and centrifuged at 10 000 rpm for 15 min, then, acetone was decanted

Table 1. Localities of investigated *Medicago* species.

N°	Localities	Sample size	ALT	LAT	LON
1	Oued Athmenia	5	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
2	Bab Trouche	4	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
3	Beni Hemiden	6	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
4	Chettaba	6	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
5	Chaabet ersas	7	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
6	Oum Bouaghi	3	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E
7	Ouled Hemla	2	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E
8	Ain Fakroun	4	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E
9	Tipaza	7	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
10	Bourdj bouariridj	5	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
11	Mansoura	2	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E
12	Lac ain zada	4	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E
13	Achir	1	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E
14	Sidi Belabbes	3	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
15	Bouira	5	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
16	Akhdaria	6	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
17	Boumerdès	1	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
18	Tizi Ouzou	1	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
19	El madania	3	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
20	Mohamadia	4	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
21	Sidi Fredj	2	1	36°45'41,62"N	2°50'47,66"E
22	Ben Aknoun	4	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
23	Blida	5	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
24	Mostaganem	4	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E
25	Khemis Meliana	4	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E
26	Ain Defla 2	9	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
27	Ain Defla 3	3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E
28	Relizane	3	58	35°56'37,06"N	0°51'00,37"E
29	Chlef	5	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
30	Mascara	4	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O
31	Medea	7	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
32	Tissemsilt	6	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
33	Guelma	6	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
34	Annaba	4	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
35	Akbou	5	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
36	Tichy	1	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
37	Sétif 1	6	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
38	Sétif 2	1	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E
39	Eulma	2	1062	36°09'54,41"N	5°32'48,61"E
40	Fesdis	4	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N
41	Kissir	1	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
42	Boughdir	2	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
43	Grand phare	1	9	36°48'56,16"N	5°42'04,92"E
44	Oran	4	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
45	Jeanne d'arc	1	11	36°53'28,07"N	7°00'04,58"E
46	Oued righa	2	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
47	Filfila	1	159	36°53'11,44"N	7°04'56,50"E

and evaporated, and the pellet was suspended in 100 µl of sample buffer. Nonreducing SDS-PAGE was carried out in 12,5 % polyacrylamide resolving gel and 5 % polyacrylamide stacking gel according to Singh *et al.* [23] at 60 V over the night.

Data analysis

Protein bands for each fraction were analyzed as binary characteristics considering all the accessions and then, by pooling up diagrams for various species, i.e., all the bands present in any or all the accessions of a species were considered as the band present for that species. Band frequencies were calculated across all accessions and within each species. Relationship among species was assessed by elaborating a pairwise dissimilarity matrix and UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) dendrogram based on Jaccard's coefficient [24]. In order to examine the degree of association between Albumin and globulin dissimilarity matrices, Mantel test [25] based on Pearson's correlation was applied. Statistical analyses were carried out using Xlstat version 2014.5.03 program [26].

RESULTS

Albumin electrophoresis

Analysis of the albumin fraction (Figure 1a) revealed 67 bands across all the collection, with molecular weight (MW) ranging from 125.37 to 10.48 kDa. The most frequent albumin band (MW = 37.34 kDa) was present in 160 accessions with frequency value of 0.95, followed by three bands (MW of 23.09, 94.26 and 54.04 kDa) with frequency values of 0.82, 0.72 and 0.70, respectively (data not shown). Out of these, all other albumin bands were present with variable frequency values, which range from 0.0059 (for bands present uniquely in one accession of the collection) to 0.68.

Number of bands per species varied from 10 for *M. lupulina* and *M. sativa* to 41 for *M. polymorpha var. polymorpha* (Table 2). None band was present in all species, but bands with molecular weights of 94.26 and 65.59 kDa were the most common and detected in 13 taxa, followed by bands with molecular weights of 54.04, 37.34, 37.08 and 23.09 kDa in 12 taxa. Twelve species-specific albumin bands were registered (Table 2) viz. 4 bands for *M. truncatula*, 3 for *M. polymorpha var. polymorpha*, 2 for *M. ciliaris* and one species-specific band for *M. orbicularis*, *M. littoralis* and *M. rigidula*. Remaining bands were shared by at least two taxa.

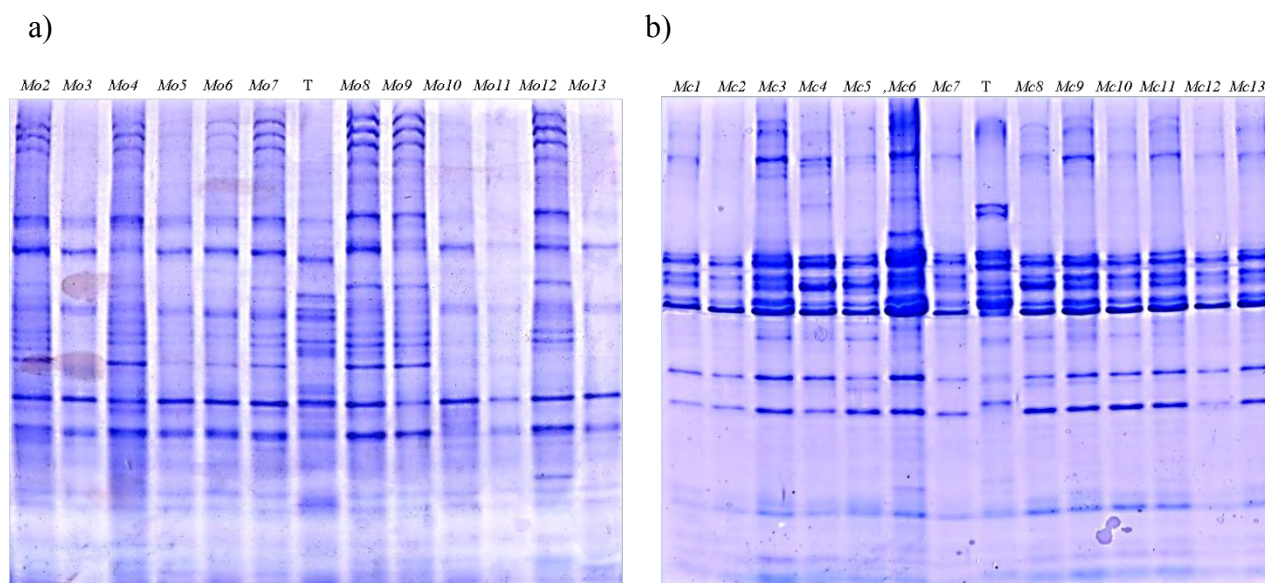


Figure 1. Electrophoretic banding pattern of albumin fraction in some accessions of *M. orbicularis* (a) and globulin fraction in some accessions of *M. ciliaris* (b). Mo2 to Mo13 = *M. orbicularis* accessions. Mc1 to Mc13 = *M. ciliaris* accessions. T = *M. truncatula* accession used as control.

Table 2. Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism in each *Medicago* species for the albumin fraction.

Species	No. of Accessions	No. of bands	No. of specific bands	No. of polymorphic bands	Amount of Polymorphism (%)
<i>M. truncatula</i>	29	24	4	13	54.17
<i>M. polymorpha</i>	28	41	3	32	78.05
<i>M. polymorpha</i> var. <i>polymorpha</i>	28	36	0	23	63.89
<i>M. polymorpha</i> var. <i>vulgaris</i>					
<i>M. ciliaris</i>	19	36	2	28	77.78
<i>M. orbicularis</i>	18	35	1	26	74.29
<i>M. minima</i>	15	34	0	23	67.65
<i>M. murex</i>	12	25	0	10	40.00
<i>M. littoralis</i>	5	25	1	4	16.00
<i>M. italica</i>	5	23	0	4	17.39
<i>M. rigidula</i>	3	37	1	11	29.73
<i>M. lupulina</i>	2	10	0	/	/
<i>M. intertexta</i>	2	19	0	/	/
<i>M. sativa</i>	1	10	0	/	/
<i>M. arborea</i>	1	12	0	/	/
<i>M. arabica</i>	1	15	0	/	/

Generally, all the species displayed more or less intra-specific variation for albumin banding pattern with an average polymorphism of 51.89 %, excluding species represented by only one or two accessions (Table 2). *M. polymorpha* var. *polymorpha* showed the highest intraspecific diversity with polymorphism value of 78.05 %, followed by *M. ciliaris* (77.78 %), *M. orbicularis* (74.29 %), *M. minima* (67.65 %) and *M. polymorpha* var. *vulgaris* (63.89 %). Moderate polymorphism was observed in *M. truncatula* species with 54.17 %. The lowest intraspecific diversity was registered in *M. littoralis* with polymorphism value of 16 %.

Similarity among species

The dendrogram based on Jaccard's dissimilarity matrix of the pooled albumin pattern of the species (Figure 2) showed the presence of five major clusters at $J = 0.64$. The first one regrouped four species belonging to the two subsections *Pachyspireae* Urb. (*M. italica* and *M. murex*) and *Intertextae* (*M. ciliaris* and *M. intertexta*) of the section *Spirocarpos* ser. Cluster 2 was composed of six *Medicago* species, five of them represent the two subsections *Pchyspireae* Urb. (*M. rigidula*, *M. littoralis*) and *Leptospireae* (*M. minima*, *M. polymorpha* var. *polymorpha* and var. *vulgaris*) of the section *Spirocarpos* ser., the sixth one (*M. orbicularis*) belongs to section *Orbiculares* Urb. The species *M. truncatula* formed independent cluster (3) at Jaccard's dissimilarity coefficient of 0.71. The fourth cluster ($J = 0.73$) consisted of two species belonging to different sections (*Spirocarpos* ser. and *Lupularia* ser.). *M. arborea* (section *Dendrotelis*) and *M. sativa* (section *Medicago*) were clustered in cluster 5 at $J = 0.76$.

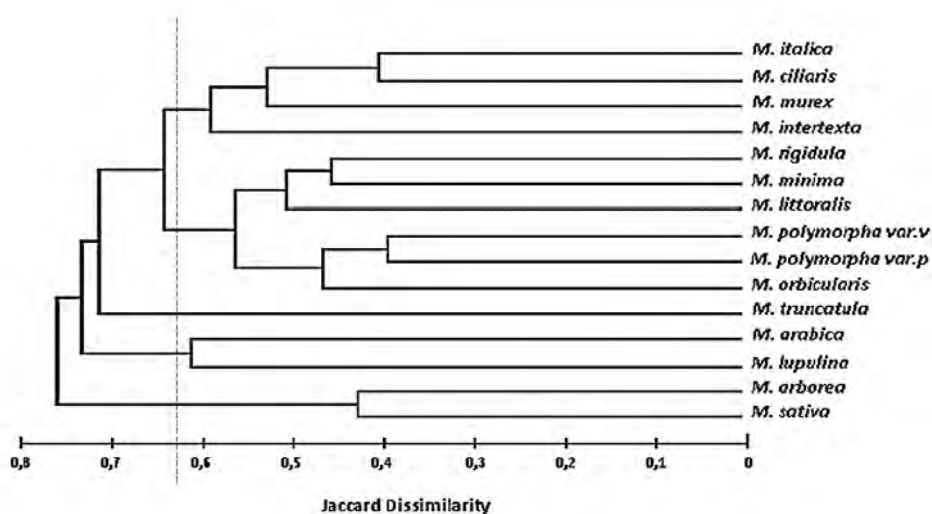


Figure 2. Dendrogram based on UPGMA clustering of albumin data showing relatedness among the studied *Medicago* species.

Pairwise comparison was performed among all studied species. The average Jaccard's dissimilarity coefficient calculated from albumin data was assessed as $J = 0.67$. The highest similarity was observed between the two varieties of *M. polymorpha* with $J = 0.36$, followed by *M. italica* and *M. ciliaris* with Jaccard's index value of 0.40, and between *M. arborea* and *M. sativa* with $J = 0.42$. However, the lowest similarity was found between *M. sativa* and *M. truncatula*, and between *M. sativa* and *M. orbicularis* with Jaccard's indices of 0.93 and 0.92, respectively, followed by *M. arborea* and *M. orbicularis* with dissimilarity value of 0.90.

Globulin electrophoresis

The globulin bands obtained were not identified as legumin-like or vicilin-like globulins; rather, all bands were simply identified by their position in the gels (Figure 1b), depending upon their molecular weight. A set of 92 globulin bands were detected, with molecular weight ranging from 11.32 to 115.73 kDa. The most frequent globulin band, having molecular weight of 31.62 kDa, was present in 157 accessions with frequency of 0.93, succeeded by bands with molecular weights of 36.58 and 46.97 kDa, with frequency values of 0.80 and 0.71, respectively. The other bands exhibited different frequencies that varied between 0.0059 and 0.63 values.

M. rigidula was the richest species in globulins with 38 bands, followed by *M. murex* species with 29 globulin bands, then, *M. truncatula* and the two varieties of *M. polymorpha* with 28 bands each. However, *M. arborea* was represented by only 7 globulin bands in its profile, followed by *M. sativa* with 9 protein bands (Table 3). Similar to albumin fraction, no band was present in all taxa for globulin proteins, nevertheless, the band having molecular weight of 31.62 kDa, was present in 14 taxa and absent in *M. lupulina* solely. Followed by the globulin band of $MW = 36.58$ kDa that was present in 13 taxa and absent in *M. sativa* and *M. lupulina*. Thirteen species-specific bands was recorded for globulin fraction ranging from 1 (*M. truncatula*, *M. polymorpha* var. *polymorpha*, *M. orbicularis* and *M. lupulina*) to 5 (*M. polymorpha* var. *vulgaris*).

Including only taxa represented by more than two accessions, the average intraspecific polymorphism was estimated 49.3 %. The two varieties of *M. polymorpha* species showed the highest intraspecific variation for globulin fraction with polymorphism values of 77.78 % and 75 % for var. *polymorpha* and var. *vulgaris*, respectively (Table 3). Followed by *M. minima* and *M. ciliaris*. Moderate polymorphism was noticed for *M. truncatula* and *M. rigidula* (57.14

% and 50 %, respectively). The species *M. italica* displayed the lowest intraspecific diversity for globulin fraction with polymorphism value of 4.35 %.

Similarity among species

Jaccard's dissimilarity values based on globulin data were represented in UPGMA dendrogram (Figure 3), which subdivided the studied species into four main clusters at $J = 0.75$. The first cluster, being at beginning of the dendrogram assembled three species (*M. arabica*, *M. arborea* and *M. sativa*) belonging to three different sections (*Spirocarpos ser.*, *Dendrotelis* and *Medicago*, respectively) at $J = 0.73$. This cluster joined the second one at $J = 0.72$, which was composed of three species of the same section (*Spirocarpos ser.*) viz. *M. intertexta*, *M. ciliaris* (subsection *Intertextae*) and *M. italica* (subsection *Pachyspireae*). Cluster 3 ($J = 0.70$) was the largest and embodied eight species belonging all to section *Spirocarpos ser.* excluding *M. orbicularis* which represents section *Orbiculares Urb.* The longest branch separated *M. lupulina* (section *Lupularia ser.*) from the rest of the species at Jaccard's coefficient 0.83; this species was the lone member of cluster 4.

The mean Jaccard's dissimilarity index among *Medicago* species based on globulin variation was found to be 0.75. *M. polymorpha var. polymorpha* and *M. lupulina* was the most distant taxa with $J = 0.91$, followed by *M. intertexta* and *M. orbicularis* with $J = 0.89$. The highest similarity was registered with Jaccard's index value of 0.55, between *M. rigidula* and *M. littoralis*; *M. truncatula* and *M. polymorpha var. polymorpha*; and between *M. intertexta* and *M. italica*.

Correlation between albumin and globulin variation

The Mantel test based on Pearson's coefficient was carried out in order to estimate the correlation between albumin and globulin polymorphism. A strong significant positive relationship was found between the two protein fraction's diversity. A normalized Mantel statistic of $r = 0.49$ was obtained, and the probability for this observed correlation was estimated as $p < 0.0001$ ($\alpha = 0.05$).

Table 3. Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism in each *Medicago* species for the globulin fraction.

Species	No. of Accessions	No. of bands	No. of specific bands	No. of polymorphic bands	Amount of Polymorphism (%)
<i>M. truncatula</i>	29	28	1	16	57.14
<i>M. polymorpha</i> var.	28	27	1	21	77.78
<i>M. polymorpha</i> var. <i>vulgaris</i>	28	28	5	21	75.00
<i>M. ciliaris</i>	19	28	4	19	67.86
<i>M. orbicularis</i>	18	25	1	8	32.00
<i>M. minima</i>	15	27	3	20	74.07
<i>M. murex</i>	12	29	4	13	44.83
<i>M. littoralis</i>	5	20	0	2	10.00
<i>M. italica</i>	5	23	4	1	4.35
<i>M. rigidula</i>	3	38	4	19	50.00
<i>M. lupulina</i>	2	11	1	/	/
<i>M. intertexta</i>	2	16	0	/	/
<i>M. sativa</i>	1	9	0	/	/
<i>M. arborea</i>	1	7	0	/	/
<i>M. arabica</i>	1	15	2	/	/

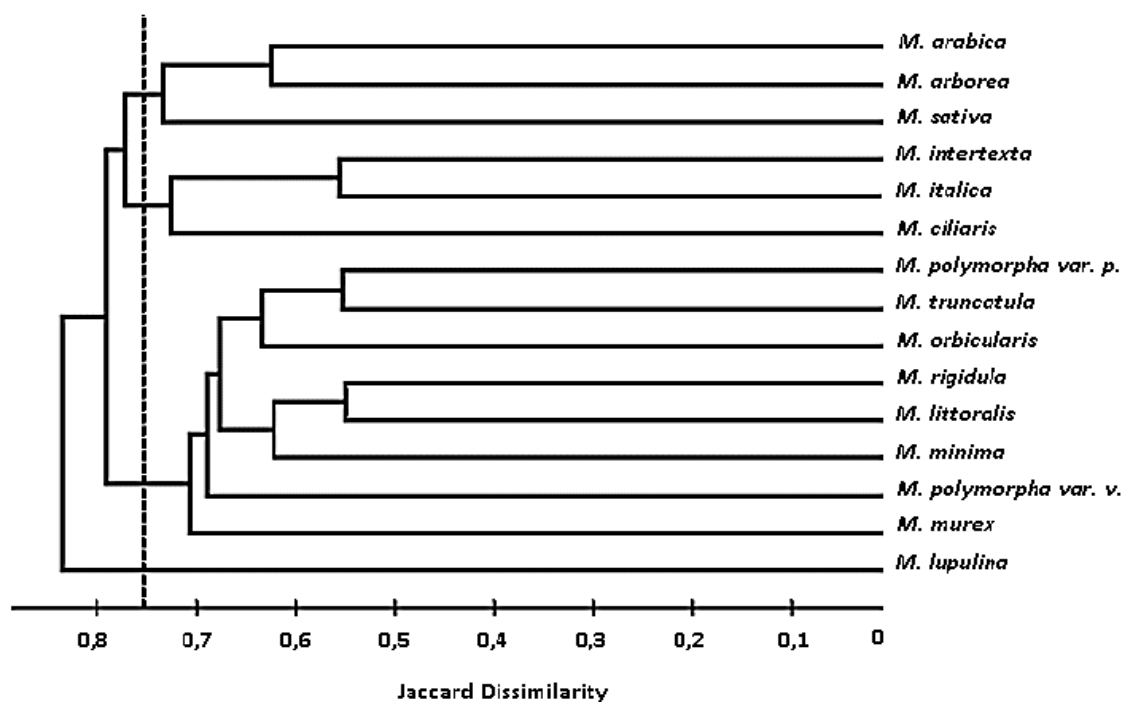


Figure 3. Dendrogram based on UPGMA clustering of globulin data showing relatedness among the investigated *Medicago* species

DISCUSSION

Comparative analysis of seed protein profiles has been a powerful tool for species identification, for clarifying taxonomic and evolutionary problems, and for studying genetic diversity [9]. In the present study, seeds from *Medicago* species collected in Northern Algeria were subjected to sequential extraction procedure, to analyze by NR-SDS-PAGE the albumin and globulin diversity. This analysis revealed that seeds of *Medicago* species are very rich in albumin and globulin proteins with the large number of stable bands on the gels. These two protein fractions showed heterogeneity at inter and intraspecific levels with 67 and 92 bands for albumin and globulin, respectively. Such large number of bands reflects the high level of genetic variation within and among the studied species.

Although, all studied species showed an interesting intraspecific polymorphism based on both protein fractions, this result was not expected since annual *Medicago* species are self-fertilizing and it is known that self-fertilization decreases gene flow and consequently increases local differentiation between populations [27]. The highest intraspecific variation was observed in the two varieties of *M. polymorpha*. Bullitta *et al.* [28] suggested that the high levels of autogamy in this species result in strong pattern of among population genetic differentiation. Also, highest variation within *M. polymorpha* was observed in our previous research when analyzing the same collection using enzymatic markers [21]. However, *M. truncatula* species showed modest intraspecific diversity based on both albumin and globulin markers. Le signor *et al.* [29] when studied 50 genotypes of *M. truncatula* from various origins based on total protein composition reported that, despite morphological and ecological differences, genotypes possessed very similar protein profiles; however, extensive polymorphism was found in more minor proteins. Similar results were observed by Krochko and Bewely [30] for *M. sativa*. In addition, many studies on plants revealed a higher percentage of polymorphism for albumin and globulin fractions than total proteins with a higher number of specific bands [31]. Our results exhibited a higher number of species-specific bands for globulin fraction (30 bands) than the albumin one (12 bands). These could be used to differentiate between species but only if they were present at reasonably high frequencies. In this study, most of the specific bands detected for the two fractions were present at high frequencies. The low frequencies for species-specific bands at the intraspecific level make them less useful for species identification since large number of plants must be assayed to obtain accurate results [32].

SDS-PAGE and analysis of similarity are routinely used to solve or verify taxonomic data based usually on the morphological observations. Molecular markers usually are used for these purposes [33, 34, 35]. Our research based on protein markers resulted in dendrograms generally agreed with data already available on interspecific relationships in *Medicago* based on morphological characteristics [18, 19].

The importance of albumin variation among the examined species is demonstrated by the topology of the dendrogram based on Jaccard's coefficient that ranged from 0.39 to 0.94 with a mean of 0.67, this wide range of similarity indices reflects a high degree of polymorphism at this protein fraction. Species included in this study represented 10 species from section *Spirocarpos ser.* (*M. truncatula*, *M. littoralis*, *M. italica*, *M. murex*, *M. rigidula* belong to *Pachyspireae* subsection; *M. polymorpha*, *M. minima*, *M. arabica* belong to *Leptospireae* subsection and *M. ciliaris*, *M. intertexta* belong to *Intertextae* subsection) and one each from section *Medicago* (*M. sativa*), *Dendrotelis* (*M. arborea*), *Orbiculares Urb.* (*M. orbicularis*) and *Lupularia ser.* (*M. lupulina*) [18]. Most of species belonging to different subsections of *Spirocarpos ser.* were clustered together. Similar results were found by Steele *et al.* [35] when analyzing various species representing all *Medicago* sections based on Plastid trnK/matK and nuclear GA3ox1 sequences. The two species *M. sativa* and *M. arborea* which belong to different sections (*Medicago* and *Dondrotelis*, respectively) were clustered together showing similarity between them. These species are the only tetraploid perennial species included in this study, and *M. arborea* is the only shrubby species within this collection [19]. This is consistent with findings of Steele *et al.* [35] who reported that *M. arborea* is part of a group with other species of section *Medicago*, although it is often unresolved as part of a basal polytomy within that group. It is likely that the common ancestor of these shrubby, polyploid species is an herbaceous perennial in section *Medicago*, thus woodiness is a derived character state in these species.

Based on globulin variation, Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.55 to 0.91 with an average of 0.75. The most distant species based on globulin clustering was *M. lupulina*, the only species with single-seeded indehiscent fruits, in addition to *M. secundiflora*, which are presently placed in section *Lupularia* [19]. Similar result was described by Valizadeh *et al.* [33] when estimated genetic distances among nine species of *Medicago* using restriction fragment length polymorphism (RFLP) band patterns detected by chloroplast DNA variation. Similarity of species within sections reflects their common origin. However, in the present study *M. orbicularis* species belonging to *Orbiculares Urb.* Section was clustered

with the species of section *Spirocarpos ser.* in both phylogenetic trees based on albumin and globulin fractions showing similarity with these species. Hence, band contributing to similarity among these species must have been contributed from common source.

The clustering of the studied species based on both albumin and globulin fractions was consistent since Mantel test ($r = 0.49$, $P < 0.0001$) indicated a strong correlation between the matrix based on albumin polymorphism and that derived from globulin one. This result suggests that the two protein markers give close estimates of genetic relations among populations.

The current study highlighted the level of genetic diversity existing within and among species of the genus *Medicago* collected in Northern Algeria based on albumin and globulin seed storage protein fractions. The wide geographic ranges may explain the high degree of variation observed in this collection and should be taken into account both in conservation programs and in the genetic improvement of these economically important *Medicago* species. Electrophoretic analysis of seed proteins proved to be useful for assessing genetic diversity, for distinguishing species and describing their similarity. The use of molecular data is strongly recommended in further studies.

REFERENCES

1. Gepts, P., 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: Weir, B.S., A.H.D. Brown, M.T. Clegg and A.L. Kahler (ed.). Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates Inc.
2. Osborne, T.B., 1924. The vegetable proteins. Longmans green and Co.
3. Duranti, M., 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77: 67-82.
4. Ferreira, R.B., R.L. Freitas and A.R. Teixeira, 2003. The structure of *Lupinus* seed storage proteins. Recent developments. *Current Topics in Plant Biology*, 4: 139-150.
5. Freitas, R.L., A.R. Teixeira and R.B. Ferreira, 2004. Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 1682-1687.
6. Rosa, M.J.S., R.B. Ferreira and A.R. Teixeira, 2000. Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 5432-5439.

7. Krochko, J.E. and J.D. Bewley, 1990. Identification and characterization of the seed storage proteins from alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Experimental Botany*, 41: 505-514.
8. Boulter, D., D.A. Thurman and E. Derbyshire, 1967. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. *New Phytologist*, 66: 27-33.
9. Ladizinsky, G. and T. Hymowitz, 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and applied Genetics*, 54: 145-151.
10. Valizadeh, M., 2001. Seed Storage Protein Profile of Grain Legumes Grown in Iran, Using SDS-PAGE. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 3: 287-292.
11. Mirali, N., S. El-Khoury, and F. Rizq, 2007. Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. *Biologia Plantarum*, 51(4): 660-666.
12. Hameed. A., T.M. Shah, B.M. Atta, N. Iqbal, M.A. Haq and H. Ali, 2009. Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2): 703-710.
13. Emre, I., D. Turgut-Balık, H. Genç and A. Şahin, 2010. Total seed storage protein patterns of some *Lathyrus* species growing in Turkey using SDS-PAGE. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5): 3157-3163.
14. De la Rosa, L. and J.M. Gonzalez, 2010. The genetic diversity associated with seed proteins in a collection of Spanish underground vetches (*Vicia sativa* L. subsp. *amphicarpa* (Dorthe) Asch. et Graebn.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57: 565-573.
15. Emre, I., 2011. Determination of genetic diversity in the *Vicia* L. (section *Vicia*) by using SDS-PAGE. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3): 1429-1432.
16. Ranjan, S., A. Poosapati, H.B.V. Vardhan and R. Matcha, 2013. Seed storage protein profile of few leguminous grains grown in india using SDS-PAGE. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 4: 505-510.
17. Ellison, N.W., A. Liston, J.J. Steiner, W.M. Williams and N.L. Taylor, 2006. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 688-705.

18. Lesins, K.A. and I. Lesins, 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae). A Taxogenetic Study. The Hague.
19. Small, E. and M. Jomphe, 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). Canadian Journal of Botany, 67: 3260-3294.
20. Prosperi, J.M., P. Guy, G. Genier and M. Angevain, 1995. Les luzernes ou le genre *Medicago*. In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. INRA Editions.
21. Medoukali, I., I. Bellil and D. Khelifi, 2015. Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 43(1): 86-95.
22. Freitas, R.L., R.B. Ferreira and A.R. Teixeira, 2000. Use of a single method in the extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to analyze structural comparisons within the major classes of globulins. International Journal of Food Science and Nutrition, 51: 341-352.
23. Singh, N.K., K.W. Shepherd and G.B. Cornish, 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. Journal of Cereal Science, 14: 203-208.
24. Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223-270.
25. Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209-220.
26. Addinsoft, 2007. XLSTAT, Analyse de données et statistique avec MS Excel. New York, Addinsoft.
27. Charlesworth, D., 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 358:1051-1570.
28. Bullitta, S., R. Floris, M.D. Hayward, A. Loi, duC. Porqued and F. Veronesi, 1994. Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. Euphytica, 77: 263-268.
29. Le Signor, C., K. Gallardo, J. M. Prosperi, C. Salon, L. Quillien, R. Thompson and G. Duc, 2005. Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. Plant Genetic Resources, 3(1): 59-71.

30. Krochko, J.E. and J.D. Bewley, 2000. Seed storage proteins in cultivars and subspecies of alfalfa (*Medicago sativa*). *Seed Science Research*, 10: 423-434.
31. Rizkalla, A.A., S.A.A. Attia, E.A.A. Abd El-Hady, N.S. Hanna and J.E. Nasseef, 2012. Genetic Diversity Based on ISSR and Protein Markers Associated with Earliness Trait in Wheat. *World Applied Sciences Journal*. 20 (1): 23-33.
32. Kongkiatngam, P., M.J. Waterway, M.G. Fortin and B.E. Coulman, 1995. Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. *Euphytica*, 84: 237-246.
33. Valizadeh, M., K. Kang, A. Kanno and T. Kameya, 1996. Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphism. *Breeding Science*, 46: 7-10.
34. Bena, G., J.M. Prosperi, B. Lejeune and I. Olivieri, 1998. Evolution of annual species of the genus *Medicago*: A molecular phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 9: 552-559.
35. Steele, K.P., S.M. Ickert-Bond, Sh. Zarre, and M.F. Wojciechowski, 2010. Phylogeny and character evolution in *Medicago* (leguminosae): evidence from analyses of plastid trnK/matK and nuclear ga3ox1 sequences. *American Journal of Botany*. 97(7): 1142-1155.

Chapitre III

*Diversité génétique des espèces algériennes du genre
Medicago L. appréciée par quelques propriétés
physiques du grain et les marqueurs microsatellites*

Préambule

Les avancées technologiques réalisées au cours de ces dernières années, permettent de disposer d'un grand nombre de méthodes et de marqueurs moléculaires en biologie fondamentale et appliquée. L'une d'entre elles, La méthode SSR « Simple Sequence Repeats » ou microsatellites. Ces marqueurs se sont révélés très utiles dans la sélection assistée par marqueurs, l'analyse de la diversité génétique et l'analyse de la génétique des populations chez plusieurs espèces (Gupta 2000 ; Budak *et al.* 2003). Chez les légumineuses, les SSRs ont été massivement mis au point chez *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, deux espèces modèles des légumineuses. Dans le genre *Medicago* le nombre de marqueurs microsatellites disponibles dépasse le millier (Diwan *et al.* 2000 ; Baquerizo-Audiot *et al.* 2001 ; Eujayl *et al.* 2004 ; Chu *et al.* 2009).

Comme l'accent est mis sur la qualité des semences, la nécessité de l'identification et/ou la classification variétale deviendra plus importante. La connaissance des propriétés physiques des grains des produits agricoles, est importante dans la fourniture de données techniques essentielles pour la conception et le développement des machines, des structures et de l'équipement pour la manutention, le décorticage, le traitement, le transport et le stockage des produits agricoles (Oh *et al.* 2001 ; Urena *et al.* 2002).

Dans le cadre de ce chapitre, nous envisageons d'utiliser quelques propriétés physiques du grain et deux marqueurs microsatellites comme sources de données phénotypiques et moléculaires complémentaires aux d'autres marqueurs déjà utilisés pour déterminer la diversité génétique au sein des 14 espèces du genre *Medicago*. L'analyse des données a résolu un niveau élevé de diversité génétique. Toutes les propriétés physiques ont contribué à la discrimination des individus et des espèces. La sphéricité des graines a été la caractéristique la plus importante avec le coefficient de variation le plus élevé. Les produits d'amplification des SSRs ont été 17-198 pb pour l'amorce AFct1 et 25-166 pb pour l'amorce AFct32. L'espèce annuelle *M. polymorpha* a présenté le polymorphisme intraspécifique le plus élevé, en se basant sur les deux SSRs étudiés. La valeur de distance génétique la plus élevée obtenue était de 0,80 entre *M. polymorpha* var. *vulgaris* et *M. arabica*, tandis que la valeur la plus faible ($J = 0,00$) a été obtenu entre *M. rigidula* et *M. italica*. Les espèces appartenant aux différentes sections ont été mélangées dans le dendrogramme suggérant l'origine polyphylétique des différentes sections. Ce regroupement supporte plus ou moins les classifications précédentes du genre basées sur des marqueurs morphologiques et moléculaires. Cette étude souligne la nécessité de l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs et de taxons pour des résultats plus fiables.

Some seed physical properties and Microsatellite (SSR) diversity in Algerian *Medicago* species

Imane MEDOUKALI ^a, Mohammed CHEKARA-BOUZIANI ^{a, b} and Douadi KHELIFI ^{a,*}

^a Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères MENTOURI, Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie

^b Faculté des Sciences Exactes, des Sciences de la Nature et de la vie, Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi, 04000 Algérie

*Corresponding Author. Prof. Douad KHELIFI. E-mail address: dkhelifi@yahoo.fr

Submitted in: Industrial Crops and Products Journal

ABSTRACT

Seed physical properties and SSR (Simple sequence Repeats) markers were used to determine the genetic diversity of 15 taxa (14 species) of the genus *Medicago* L. collected from different regions in Northern Algeria. The analyses were carried out using nine physical properties of seeds and two SSR loci. The data analysis resolved a high level of genetic diversity. All physical properties contributed to the discrimination of *Medicago* taxa. Seed sphericity was the most important characteristic with high coefficient of variation. The SSR amplification products were 17-198 bp with AFctt1 and 25–166 bp with AFct32 locus. The annual species *M. polymorpha* presented a high intraspecific polymorphism based on both SSR markers. The bands were scored as absence and presence for all taxa. Data obtained were used to estimate genetic dissimilarity using Jaccard's coefficient, and dendrogram was constructed by the UPGMA method. The highest genetic dissimilarity value obtained was 0.80 between *M. polymorpha* var. *vulgaris* and *M. arabica*, while the lowest ($J = 0.00$) was obtained between *M. rigidula* and *M. italica*. Species from different sections were mixed in the dendrogram suggesting polyphyletic origin of various sections. This clustering more or less supported previous classifications of the genus based on morphological and molecular markers. This study emphasized the necessity of the use of high numbers of markers and taxa for reliable results.

Keywords: *Medicago*, Algeria, physical properties, microsatellite, genetic diversity, genetic relationship

1. Introduction

The Fabaceae (Leguminosae) is the third largest family of Angiosperms in terms of agricultural and economical importance. It includes more than 650 genera and 20,000 species, with a large number of domesticated species harvested as crops for human and animal consumption, as well as for oils, fuel, fertilizers, and medicinal and horticultural varieties (Lewis et al., 2005). Belonging to the tribe Trifolieae and the subtribe Trigonellinae, *Medicago* (Fabaceae) is an extensive genus comprising more than 83 different species, which are annuals (66%) or perennials (33%), including two important forage crops, *M. sativa* and *M. truncatula* (Small and Jomphe, 1989). Twenty two wild species of *Medicago* are found in Algeria (Quezel and Santa, 1962). They are adapted to a diverse range of habitats located in different geographical regions, from the coastal region to the Atlas Tellian mountains and along a gradient of increasing aridity from North to South. These wild species hold a rich source of natural variation for the better understanding of plant population dynamics and for the improvement of *Medicago* cultivars. With rapid urbanization and overgrazing in Algeria, however, these wild *Medicago* populations are threatened by severe reductions in number and size. Thus, there is an urgent need to investigate the population genetics and evolutionary dynamics of wild relatives of important forage crops. The evaluation of the genetic diversity among populations is an essential prerequisite for the preservation of endangered species (Park et al., 2009).

Because molecular markers show Mendelian inheritance, it is possible to trace the fingerprint of each individual and determine the evolutionary history of the species by phylogenetic analysis and population genetic structures (Hoshino et al., 2012). Molecular analysis of germplasm diversity will provide information for use in plant improvement programs regarding the level of genetic variation within and between species. This information could then be used for interspecific crosses, to increase heterozygosity, and to incorporate desirable genes from more diverse backgrounds into elite germplasm (Phansak et al., 2005).

Various molecular methods for assessing genetic diversity and germplasm characterization have been developed. In addition to restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Botstein et al., 1980), many polymerase chain reaction (PCR) based technologies have been developed and among them simple sequence repeats or microsatellite (SSRs) are widely used in plant population genetics. SSRs are short stretches of DNA sequences occurring as tandem repeats of mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, and hexa-nucleotides in both protein coding and non-coding regions of DNA sequences (Lai et al., 2012; Toth et al., 2000). The

polymorphism in microsatellite sequences consists of variation in the length of the repeated motif (Phansak et al., 2005). Compared with other DNA-based markers, SSR markers occur frequently in plants and are multi-allelic, co-dominant, highly reproducible (Wang et al. 1994; Morgante and Olivieri, 1993) and thought to play an active role in genome evolution by creating and maintaining genetic variability due to their high mutability, which can be exploited in conservation and improvements of forage production (Jayashree et al., 2006). Many SSR markers have been developed and are widely used in plants for genetic mapping, genetic diversity assessment, population genetics and marker-assisted selection (Gupta and Varshney, 2000).

As more emphasis is placed on seed quality, the need for varietal identification and/or classification will become more prominent. Strict botanical classification is generally unable to provide sufficient criteria that embrace the diversity of particular seeds. By contrast, selected engineering properties of particulate material can support the identification and classification of different forms and varieties (Majumdar and Jayas, 2000 a,b,c,d; Zapotoczny et al., 2008). The knowledge of physical characteristics of seeds such as shape, size, volume and surface area are useful in determining the efficiency of machines and operations, evaluating final product quality, classifying and distinguishing between different varieties or different kinds of kernels, grains and seeds (Coskuner and Karababa, 2007). The physical properties of seeds have been studied in various species (Bakhtiari et al., 2011; Sharma et al., 2011; Ixtaina et al., 2008; Garnayak et al., 2008; Dursun and Dursun, 2005; Yalcin and Ozarlan, 2004; Ozarlan, 2002; Vilche et al., 2003; Sahoo and Srivastava, 2002). However, no published work seems to have been carried out on such properties in *Medicago* species.

In this context, the determination of some physical properties and SSR markers, were used to investigate the genetic diversity at both intra- and inter-specific levels and to determine systematical relationships among 15 taxa of the genus *Medicago*. These taxa were collected in various eco-geographical regions in Northern Algeria. The obtained results were compared with those previously reported based on morphological and molecular markers.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and preparation

Fifteen taxa (13 species and 2 varieties) of the genus *Medicago* L., already studied using morphological and enzymatic markers (Medoukali et al., 2015) were used in this study. This

collection originate from pods collected from 47 sites representative of the Algerian diversity in eco-geographical profiles. The major characteristics of each site [altitude (Alt), latitude (Lat), longitude (Lon)] are detailed in Table 1. Mature seeds of each individual were extracted from pods, scarified and sterilized with 3% (v/v) sodium hypochlorite solution. Sterile grains were germinated in the dark for 2 days in petri dishes containing 1% water-agar (w/v) at room temperature, then kept under normal daylight for 10 days. Young leaves from every sample (0.3 g) were ground into a very fine powder using liquid nitrogen and frozen at -20°C for further DNA extraction.

2.2. Determination of physical properties

The properties of seeds are generally determined by moisture content (Dursun and Dursun, 2005; Yalcin and Ozarslan, 2004). In this paper, variations in moisture content relative to seed properties have not been studied. Nine physical properties of seeds were carried out on 131 accessions of the collection. To determine the average seed size, 10 *Medicago* seeds were randomly selected for each accession, and three linear dimensions namely; length (L), width (W) and thickness (T) were measured using a dial-micrometer with an accuracy of 0.01 mm.

The average diameter of the seeds was calculated by using the arithmetic mean and geometric mean of the three axial dimensions. The arithmetic mean diameter (D_a) and geometric mean diameter (D_g) of the seeds were calculated by using the following relationships (Mohsenin, 1970):

$$D_a = \frac{L + W + T}{3}$$

$$D_g = (LWT)^{1/3}$$

The sphericity (Φ), of *Medicago* seeds was calculated by using the following equation (Mohsenin, 1970):

$$\Phi = \left[\frac{(LWT)^{1/3}}{L} \right] \times 100$$

The surface area (S) of *Medicago* seeds was found by analogy with a sphere of the same geometric mean diameter, using the following relationship (Sacilik et al., 2003; Tunde-Akintunde and Akintunde, 2004; Altuntaş et al., 2005):

$$S = \pi D_g^2$$

Table 1Localities of investigated *Medicago* taxa.

N°	Localities	ALT	LAT	LON
1	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
2	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
3	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
4	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
5	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
6	Oum Bouaghi	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E
7	Ouled Hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E
8	Ain Fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E
9	Tipaza	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
10	Bourdj bouariridj	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
11	Mansoura	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E
12	Lac ain zada	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E
13	Achir	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E
14	Sidi Belabbes	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
15	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
16	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
17	Boumerdès	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
18	Tizi Ouzou	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
19	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
20	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
21	Sidi Fredj	1	36°45'41,62"N	2°50'47,66"E
22	Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
23	Blida	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
24	Mostaganem	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E
25	Khemis Meliana	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E
26	Ain Defla 2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
27	Ain Defla 3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E
28	Relizane	58	35°56'37,06"N	0°51'00,37"E
29	Chlef	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
30	Mascara	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O
31	Medea	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
32	Tissemsilt	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
33	Guelma	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
34	Annaba	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
35	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
36	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
37	Sétif 1	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
38	Sétif 2	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E
39	Eulma	1062	36°09'54,41"N	5°32'48,61"E
40	Fesdis	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N
41	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
42	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
43	Grand phare	9	36°48'56,16"N	5°42'04,92"E
44	Oran	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
45	Jeanne d'arc	11	36°53'28,07"N	7°00'04,58"E
46	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
47	Filfila	159	36°53'11,44"N	7°04'56,50"E

The unit volume (V) was determined by using the following equation (Mohsenin, 1986):

$$V = (\pi LWT) / 6$$

Where L is the length, W is the width and T is the thickness, all in mm.

The thousand seeds mass (WTS) was determined using an electronic balance having an accuracy of 0.001 g. To evaluate the thousand seeds mass, 100 seeds were randomly selected from the bulk sample and averaged.

2.3.SSR analysis

The experiment comprised 153 accessions of the *Medicago* collection (Table 1). Total genomic DNA was isolated according to a Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol described by Doyle and Doyle (1990). DNA quality was tested using 0.8% agarose gel electrophoresis. After measuring DNA concentration with NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), samples were diluted to 50 ng/μl for PCR amplification.

A number of five SSR primer pairs were screened and on the basis of this preliminary data, two SSR primers were selected according to the quality of fragment amplification (Table 2).

Table 2

Sequences and linkage group of five microsatellite primers tested in *Medicago* taxa.

Primer	Linkage group	Motif	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AFctt1*	4	(CTT) ₉ (CAA) ₃	CCCATCATCAACATTTTCA	TTGTGGATTGGAACGAGT
AFct11	7	(CT) ₁₂	GGACAGAGCAAAGAACAAT	TTGTGTGGAAAGAATAGGAA
AFct32*	3	(CT) ₁₄	TTTTTGTCACCTCATTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC
AFca1	4	(CT) ₄ (CA) ₁₀	CGTATCAATATCGGGCAG	TGTTATCAGAGAGAGAAAGCG
AFca11	6	(CA) ₁₁	CTTGAGGGAACTATTGTTGAGT	AACGTTTCCCAAACATACTT

*Primers used in this study

PCR amplification was carried out in a 20 μl final volume containing 3 μl of genomic DNA (50 ng/μl) as template, 2.4 μl of dNTP mix containing 2.5 mM of each of the four nucleotides, 3 μl of 10 x reaction buffer, 1.2 μl of MgCl₂ (25 mM), 1.8 μl of each SSR forward and reverse primer (10 μM) and 0.3 μl of Taq DNA polymerase Thermo Scientific (2.5 U). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, with

a final 72°C extension for 10 min. Amplification products (10 µl per lane) were resolved on 8% non-denaturing polyacrylamide gel, using an acrylamide/bis-acrylamide ratio of 19:1 and a 0.5X TBE buffer. Electrophoresis was performed at 175 V constant voltage for approximately 2 h 30 min at 4°C, and revealed with ethidium bromide for 5 min.

2.4. Statistical analyses

The physical properties were analyzed by ANOVA using MS-Excel 2013 and a principal component analysis (PCA) of the nine seed properties for the 15 studied taxa was performed. Phenetic relationships among species were evaluated by UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) cluster analysis based on Euclidean distances. PCA and UPGMA dendrogram were carried out using Statistica version 6.1 program (Statsoft, Inc., 1995).

Fragments amplified by SSR primers were scored as 1 or 0 for presence or absence of bands, respectively. Only reproducible well-marked amplified bands were scored. Bands with the same mobility were considered as identical fragments, irrespective of band intensity. Band frequencies were calculated across all accessions and within each species. Relationship among species was assessed by elaborating a pairwise similarity matrix and UPGMA dendrogram based on Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908). In order to examine the degree of association between physical properties and SSR similarity matrices, Mantel test (Mantel, 1967) based on Pearson's correlation was applied. Statistical analyses were carried out using Xlstat version 2014.5.03 program (Addinsoft, 2007).

3. Results

3.1. Physical properties analysis

Mean, range, Standard deviation (S.D.) and coefficient of variation (CV) values of seed properties studied are shown in Table 3. Seed sphericity (ϕ) was found to be the most variable across all the collection (CV = 55.42%) ranging from 40.38 to 82.43% with a mean of 57.19%. Followed by seed surface area (S) with CV of 23.45% ranging from 3.93 to 26.13 mm² and the weight of thousand seeds (WTS) with CV of 13.53 % fluctuating between 1.03 and 15.64 g. The lowest CV (0.05%) was recorded for seed thickness (T), succeeded by the average diameter of seeds with CV of 0.15 and 0.19% for D_g and D_a , respectively. The remaining properties displayed a margin variation across all the species.

Table 3

Mean, range, standard deviation and coefficient of variation of the analyzed properties for the 15 *Medicago* taxa.

Physical properties	Min	Max	Mean	S.D.	CV (%)
<i>L</i> (mm)	1,81	5,37	3,35	0,80	0,62
<i>W</i> (mm)	1,08	2,98	1,96	0,46	0,21
<i>T</i> (mm)	0,38	1,67	1,04	0,24	0,05
<i>D_a</i> (mm)	1,22	3,22	2,12	0,45	0,19
<i>D_g</i> (mm)	1,12	2,88	1,89	0,39	0,15
ϕ (%)	40,38	82,43	57,19	7,57	55,42
<i>S</i> (mm ²)	3,93	26,13	11,65	4,92	23,45
<i>V</i> (mm ³)	0,73	12,57	3,98	2,56	6,36
<i>WTS</i> (g)	1,03	15,64	5,55	3,74	13,54

The first three axes of PCA (Fig. 1) accounted for 96.13% of the total variation with 70.21%, 15.34% and 10.58% for PC1, PC2 and PC3 respectively. The seven physical properties: *L*, *W*, *T*, *D_a*, *D_g*, *S* and *V* contributed highly to the formation of PC1 and showed relative strong correlations between them, especially between *D_a*, *D_g*, *S* and *V*. Seed sphericity (ϕ) contributed mainly to PC2 and exhibited negative correlations with other seed properties, except with the second and the third seed axial dimensions (*W* and *T*), that displayed weak relationships (data not shown). *WTS* was misrepresented in the plan 1-2, but contributed highly to the construction of PC3.

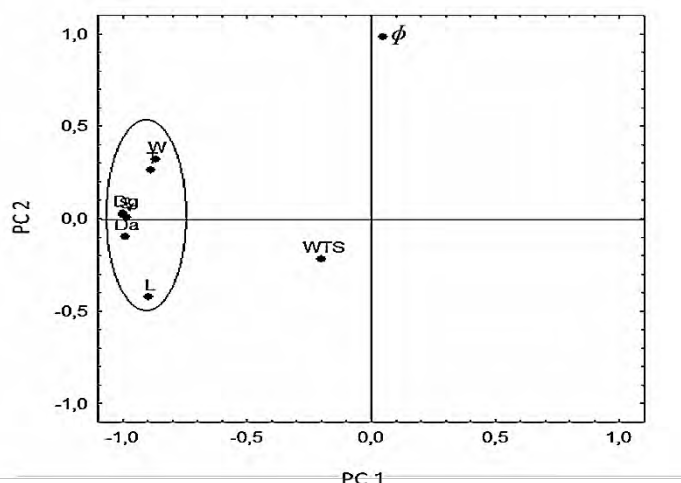


Fig. 1. Principal component analysis of the nine studied seed physical properties.

The UPGMA dendrogram based on Euclidean distances (Fig. 2) subdivided the studied species into three major clusters at distance value $d = 14.08$. The first one ($d = 7.02$) was the largest with eight taxa belonging principally to sect. *Spirocarpos ser.* (*M. truncatula*, *M. italica*,

M. littoralis of subsection *Pachyspireae* and *M. polymorpha* var. *polymorpha* and var. *vulgaris*, *M. minima*, *M. arabica* of subsection *Leptospireae*) and only one species belonging to sect. *Medicago* (*M. sativa*). The second cluster consisted of five species at $d = 10.40$, and could be further divided into two sub-clusters; the two species *M. ciliaris* and *M. intertexta* members of subsection *Intertextae* of sect. *Spirocarpos* ser. formed the first one at $d = 7.25$, the other sub-cluster represented sect. *Spirocarpos* ser. subsection *Pachyspireae* with two species (*M. murex* and *M. rigidula*) and sect. *Dendrotelis* (*M. arborea*). The third cluster joined the other ones at distance value 21.25, and assembled the two species *M. orbicularis* (sect. *Orbiculares* Urb.) and *M. lupulina* (sect. *Lupularia* ser.). Pairwise Euclidean distances calculated from seed physical properties data varied from 1.4 (between *M. polymorpha* var. *polymorpha* and *M. italica*) to 29.5 (between *M. lupulina* and *M. intertexta*) with an average of 13.0.

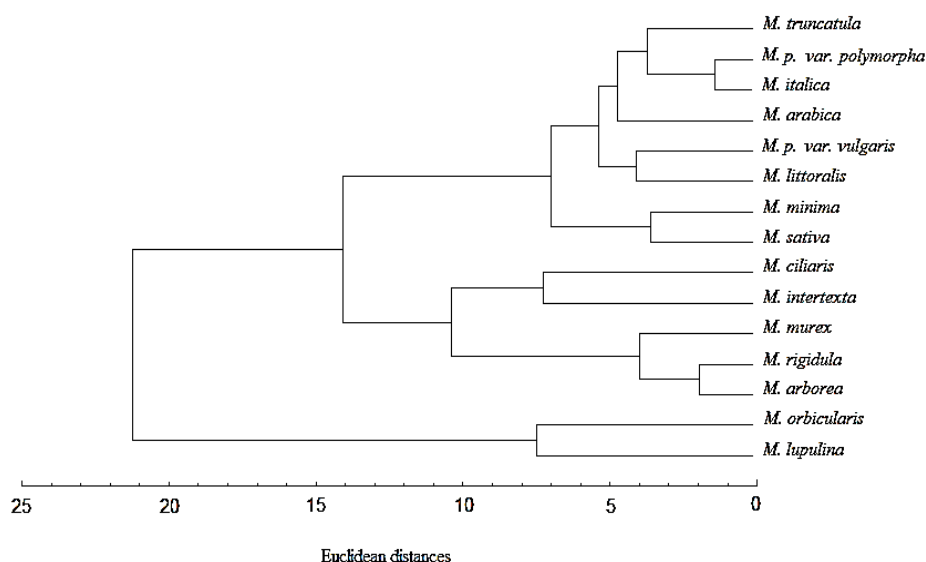


Fig. 2. UPGMA dendrogram based on physical properties data of 15 *Medicago* taxa

3.2. SSR markers

Initially, five SSR markers were selected for the testing of polymorphism with 15 *Medicago* taxa. Three of them, did not produce any fragments in taxa. Therefore, two (AFctt1 and AFct32) of the five SSR markers gave a total of 37 fragments ranged from 17 to 198 bp, with 21 (17-198 bp) and 16 (25-166 bp) bands for AFctt1 and AFct32, respectively (Table 4). An example of SSR banding patterns based on each of the primers is given in Fig. 3. The 52 bp AFctt1 fragment was omnipresent in all the accessions and taxa, followed by the 22 bp fragment which were absent in uniquely one accession of *M. polymorpha* var. *vulgaris*. Regarding AFct32 SSR primer, the 25 bp fragment was ubiquitous across all the collection, followed by

the 37 bp fragment which characterized 103 accessions of 9 taxa. The number of generated fragments and their arrangement differed within and between taxa (Table 4). The highest number of alleles (12) was generated with the primer AFctt1 in the two varieties of *M. polymorpha* with an average of 5.48 and 4.17 for var. *polymorpha* and var. *vulgaris*, respectively. While the lowest number (3) with the primer AFct32 in *M. intertextata*, *M. sativa* and *M. arabica*, and in the latest species with the primer AFctt1. Only one species-specific band was registered for AFctt1 primer found in one accession of *M. truncatula*, and a total of five specific bands were recorded for AFct32 primer viz. one band for *M. truncatula*, three bands for *M. p.* var. *polymorpha* and one band for *M. littoralis*.

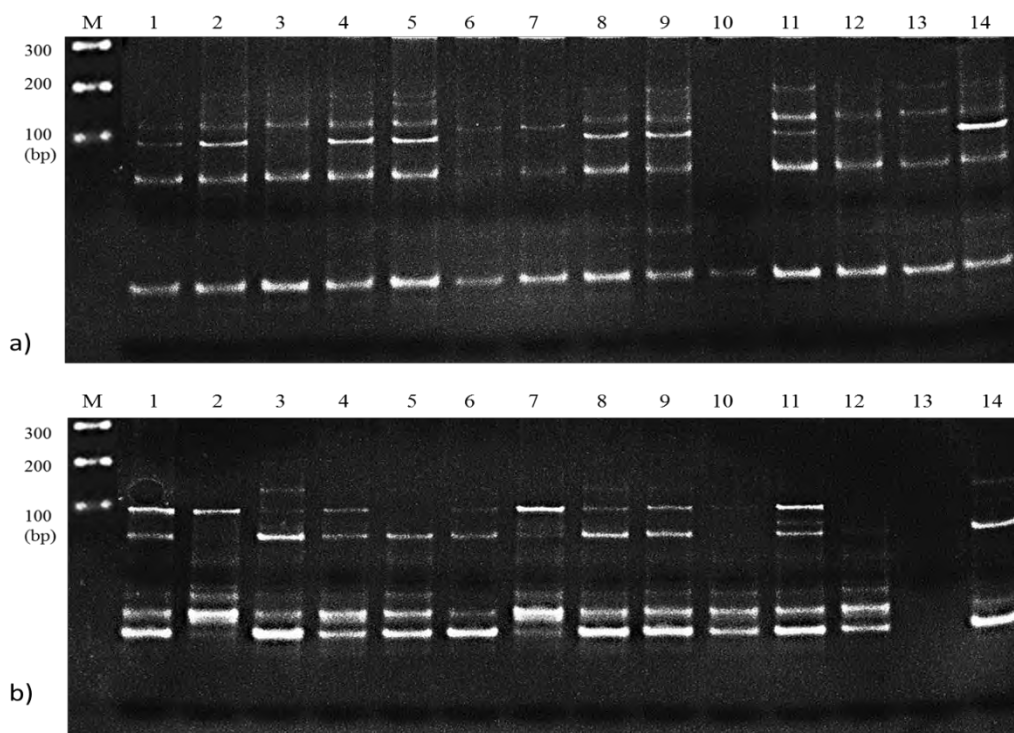


Fig. 3. SSR banding patterns of *Medicago* taxa revealed by: a) AFctt1 primer in *M. minima* accessions and b) AFct32 marker in *M. p.* var. *polymorpha* accessions (Numbers from 1 to 14 in each gel represent fourteen different accessions). M: 100 bp DNA ladder plus marker (Fermentas).

The average number of polymorphic bands per primer varied between 5.70 and 4.40, with mean amount of polymorphism of 59.16 and 52.18% for AFctt1 and AFct32 primers, respectively. Generally, all the species displayed more or less intra-specific variation for the two studied SSR markers, excluding species represented by only one or two accessions (Table 4). The two varieties of *M. polymorpha* showed the highest intraspecific diversity for AFctt1 SSR primer, with polymorphism value 83.33%, followed by *M. rigidula* and *M. truncatula* with polymorphism values of 75.00 and 72.73%, respectively. However, *M. murex* was the lesser polymorphic species with 10.00% amount of polymorphism. AFct32 SSR primer was more

Table 4Total number of amplified bands, specific bands and polymorphism in each *Medicago* taxa for each SSR marker.

Species / Loci	Sample size	Total no. of amplified bands		Average no. of bands per species (range)		Approx. band size range (pb)		No. of species specific bands		No. of polymorphic bands		Amount of Polymorphism (%)	
		AFctt1	AFct32	AFctt1	AFct32	AFctt1	AFct32	AFctt1	AFct32	AFctt1	AFct32	AFctt1	AFct32
<i>M. truncatula</i>	25	11	8	4,32 (3-6)	3,32 (2-6)	17-187	25-132	1	1	8	6	72,73	75,00
<i>M. polymorpha</i> <i>var. polymorpha</i>	25	12	9	5,48 (2-7)	5,24 (2-7)	17-188	25-132	0	3	10	7	83,33	77,77
<i>M. polymorpha</i> <i>var. vulgaris</i>	23	12	6	4,17 (2-6)	2,91 (1-5)	22-198	25-107	0	0	10	5	83,33	83,33
<i>M. ciliaris</i>	17	11	8	4,71 (3-7)	4,71 (2-6)	22-154	25-166	0	0	7	6	63,64	75,00
<i>M. orbicularis</i>	17	8	9	6,65 (5-7)	4,18 (1-7)	17-188	25-166	0	0	2	8	25,00	88,89
<i>M. minima</i>	14	7	7	4,57 (2-6)	3,50 (2-6)	22-171	25-132	0	0	5	4	71,43	57,14
<i>M. murex</i>	12	10	8	8,75 (8-10)	6,67 (5-7)	17-198	25-166	0	0	1	2	10,00	25,00
<i>M. littoralis</i>	5	7	7	4,00 (3-5)	3,40 (2-5)	22-151	25-98	0	1	4	5	57,14	71,43
<i>M. italica</i>	5	8	4	4,80 (4-7)	3,40 (3-4)	22-151	25-98	0	0	4	1	50,00	25,00
<i>M. rigidula</i>	3	8	4	4,00 (3-6)	4,00 (4)	22-151	25-98	0	0	6	0	75,00	0,00
<i>M. lupulina</i>	2	8	7	8,00 (8)	7,00 (7)	17-198	25-166	0	0	/	/	/	/
<i>M. intertexta</i>	2	7	3	5,00 (4-6)	3,00 (3)	22-151	25-98	0	0	/	/	/	/
<i>M. sativa</i>	1	7	3	/	/	22-151	25-98	0	0	/	/	/	/
<i>M. arborea</i>	1	6	4	/	/	22-151	25-98	0	0	/	/	/	/
<i>M. arabica</i>	1	3	3	/	/	22-92	25-98	0	0	/	/	/	/
Total	153	21	16	-	-	17-198	25-166	1	5	-	-	-	-
Average	-	8,33	6,00	-	-	-	-	-	-	5,70	4,40	59,16	52,18

polymorphic within *M. orbicularis* species with polymorphism percentage 88.89%, succeeded by *M. polymorpha* varieties with 83.33 and 77.77% of polymorphism for var. *vulgaris* and var. *polymorpha*, respectively. Nevertheless, *M. rigidula* was monomorphic based on this SSR marker.

An UPGMA dendrogram based on SSR markers was drawn using Jaccard's dissimilarity coefficient (Fig. 4). There were three main clusters at $J = 0.58$, with the first one containing seven species representing three sections: sect. *Spirocarpos ser.*; Subsection *Pachyspireae* (*M. truncatula*, *M. murex*), subsection *Leptospireae* (*M. minima*, *M. p. var. polymorpha*) and subsection *Intertexteae* (*M. ciliaris*), sect. *Lupularia ser.* (*M. lupulina*) and sect. *Orbiculares Urb.* (*M. orbicularis*). The two taxa *M. littoralis* (sect. *Spirocarpos ser.* Subsection *Pachyspireae*) and *M. p. var. vulgaris* (sect. *Spirocarpos ser.* Subsection *Leptospireae*) characterized mainly the second cluster at $J = 0.54$. The third cluster was linked to the first and the second ones at $J = 0.65$, and assembled six species belonging to three sections: sect. *Spirocarpos ser.* Subsection *Pachyspireae* (*M. rigidula* and *M. italica*), subsection *Intertexteae* (*M. intertexta*) and subsection *Leptospireae* (*M. arabica*), sect. *Medicago* (*M. sativa*) and sect. *Dendrotelis* (*M. arborea*). Pairwise comparison was performed among all studied taxa. The average Jaccard's dissimilarity coefficient calculated from SSR data was assessed as $J = 0.53$. The two species *M. rigidula* and *M. italica* was similar with $J = 0.00$, followed by *M. lupulina* and *M. murex* with $J = 0.17$. While the highest distance was observed between *M. arabica* and *M. p. var. vulgaris* with $J = 0.80$.

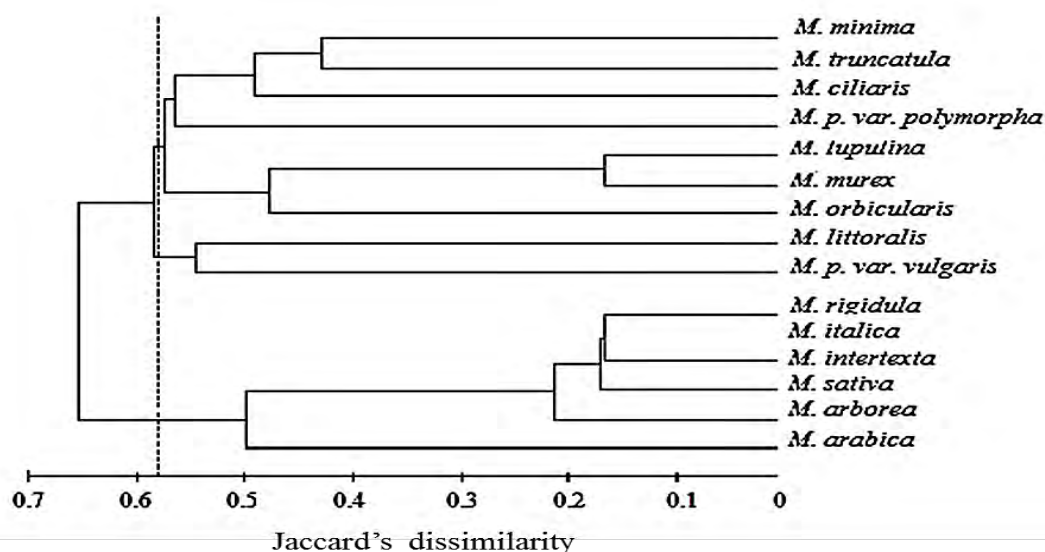


Fig. 4. UPGMA dendrogram based on SSR data of 15 *Medicago* taxa

1. Discussion

Determination of genetic diversity within and among 15 *Medicago* taxa involved the use of seed physical properties and SSR markers. The knowledge of physical properties of agricultural products is important in providing essential engineering data required for design and development of machines, structures and equipment for handling, dehusking, processing, transporting and storage of agricultural product. Shape and size are relevant in designing equipment for grading, sorting, cleaning, dehulling and packaging. Density with specific gravity are used for calculating thermal diffusivity in heat transfer, terminal velocity, mass, bulk density and porosity are employed in storage, transportation and separation system (Oh et al., 2001; Urena et al., 2002). As more emphasis is placed on seed quality, the need for varietal identification and/or classification will become more prominent. Therefore, the objective of this study was to identify selected physical properties in distinguishing between accessions and species, and to investigate the relationships between the properties of *Medicago* seeds.

The importance of seed properties variation among the examined taxa is demonstrated by the PCA analysis on nine physical characteristics and the topology of the dendrogram based on Euclidean distances that showed the discrimination of taxa under study. The seeds of all examined taxa differed significantly in terms of shape, size and weight of thousand seeds (*WTS*), hence taxa were classified into three main groups: a group included taxa with low values of physical properties and characterized by their small seeds having all a same shape. The second group assembled species (*M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. rigidula*, *M. arborea*, and *M. murex*) characterized by high values of seed properties in shape, size and *WTS*. Lesins and Lesins (1979) noted the relationship between these traits and reported that the weight of thousand seeds give *a priori* a fair idea about the size of the seeds. The importance of these properties is evidenced by its high loadings in the first and the third (*WTS*) principal component. The seed sphericity characteristic which contributed strongly to the formation of PC2 differentiated *M. orbicularis* and *M. lupulina* from all other taxa. Since this two species are characterized by their spherical seeds comparing with other studied species (Lesins and Lesins, 1979).

Molecular markers allow the selection of desired traits based on genotype and can therefore complete and accelerate plant breeding programs. The efficiency of a molecular marker technique depends on the amount of polymorphism and its ability to distinguish differences between germplasms. Also, markers with large number of alleles are informative

for population studies. Surveying a core collection of Algerian species with two microsatellite loci, we revealed a large amount of genetic variability in *Medicago* species. In fact, a total of 37 different alleles were identified with 21 and 16 alleles for AFctt1 and AFct32 markers, respectively. This result was expected considering the power of the microsatellite markers to display high mutation rates, which generally reveal fairly high amounts of polymorphisms, especially when used at the species level (Ronfort et al., 2006). In contrast to our results, only one allele per locus per plant was observed using the same SSR loci in annual medics (Falahati-Anbaran et al., 2006).

All studied species showed an interesting intraspecific polymorphism based on both SSR markers, this is not surprising since annual *Medicago* species are self-fertilizing and it is known that self-fertilization decreases gene flow and consequently increases local differentiation between populations (Charlesworth, 2003). A high intraspecific variation was observed in the two varieties of *M. polymorpha*. Bullitta et al. (1994) suggested that the high levels of autogamy in this species result in strong pattern of among population genetic differentiation. Also, highest variation within *M. polymorpha* was observed in our previous research when analyzing the same collection using enzymatic markers (Medoukali et al., 2015) and seed storage Proteins variation (data not published).

The importance of the studied SSR markers is demonstrated by the topology of the dendrogram based on Jaccard's coefficient that ranged from 0.00 to 0.80 with a mean of 0.53, this wide range of dissimilarity indices reflects a high degree of polymorphism among *Medicago* Taxa. Species included in this study represented 10 species from section *Spirocarpos ser.* (*M. truncatula*, *M. littoralis*, *M. italica*, *M. murex*, *M. rigidula* belong to *Pachyspireae* subsection; *M. polymorpha*, *M. minima*, *M. arabica* belong to *Leptospireae* subsection and *M. ciliaris*, *M. intertexta* belong to *Intertextae* subsection) and one each from section *Medicago* (*M. sativa*), *Dendrotelis* (*M. arborea*), *Orbicularis Urb.* (*M. orbicularis*) and *Lupularia ser.* (*M. lupulina*) (Small and Jomphe, 1989). Therefore, the low interspecific similarity found supports the classification of the species under study in different sections of the genus *Medicago*. On the other hand, groupings with such low similarity do not necessarily reflect relationships between the species but may be occasional clustering. Similarity of species within sections reflects their common origin, *M. rigidula* and *M. italica* belonging to section *Spirocarpos ser.* subsection *Pachyspireae* were having similar SSR profiles ($J = 0.00$). Nevertheless, despite the fact that belonging to the same subsection (*Leptospireae*), *M. p. var. vulgaris* and *M. arabica* were found to be the most distant taxa.

Phylogeny of the genus *Medicago* based on molecular studies using Plastid trnK/matK and nuclear GA3ox1 sequences variability showed that clustering of species into distinct groups coincides with botanical section Steele et al. (2010). In the present study, the species from different sections were mixed in the dendrogram suggesting polyphyletic origin of various sections. Clustering together of species belonging to different sections indicates some similarities between them, hence, band contributing to similarity among these species must have been contributed from common source. Further, intermixing of species of two or more than two sections in one cluster in the presented dendrogram can be attributed to the similarity of different species of diverse sections (Malaviya et al., 2008).

In conclusion, Algerian *Medicago* species investigated in this study revealed considerable genetic diversity at intra and interspecific levels, regarding seed physical properties and SSR markers. Therefore, these *Medicago* populations could be considered as valuable genetic material for cultivated species improvement programs. SSR diversity enabled the division of species into three main clusters, which more or less supported previous classifications of the genus based on morphological and molecular markers. This finding supplements earlier studies that realized different groups of populations based on molecular markers. This study emphasized the necessity of the use of high numbers of molecular markers and taxa for reliable results.

References

- Addinsoft, 2007. XLSTAT, Analyse de données et statistique avec MS Excel. New York, Addinsoft.
- Altuntaş, E., Özgöz, E., Taser, Ö.F., 2005. Some physical properties of fenugreek (*Trigonella foenumgraceum* L.) seeds. J. Food. Eng. 71, 37-43.
- Bakhtiari, M.R., Ahmad, D., Othman, J., Ismail, N., 2011. Physical and mechanical properties of kenaf seed. Appl. Eng. Agric. 27 (2), 263-268.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32, 314-331.
- Bullitta, S., Floris, R., Hayward, M.D., Loi, A., Porqued, duC., Veronesi, F., 1994. Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. Euphytica. 77, 263-268.

- Charlesworth, D., 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 358, 1051-1570.
- Coskuner, Y., Karababa, E., 2007. Physical properties of coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *J. Food. Eng.* 80, 408-416.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12 (1), 13-15.
- Dursun, E., Dursun, I., 2005. Some physical properties of caper seed. *Biosyst. Eng.* 92 (2), 237-245.
- Falahati-Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfahany, M., Mohammadi, S.A., Ghareyazie, B., 2006. Study of genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid annual medics using microsatellite markers. *J. Sci. Tech. Agri. Nat. Res.* 10, 349-358.
- Garnayak, D.K., Pradhan, R.C., Naik, S.N., Bhatnagar, N., 2008. Moisture-dependent physical properties of jatropha seed (*Jatropha curcas* L.). *Ind. Crops Prod.* 27 (1), 123-129.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica.* 113, 163-185.
- Hoshino, A.A., Bravo, J.P., Macedo, N.P., Morelli, K.A., 2012. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. *Genet. Divers. Microorganisms* 6, 149-170.
- Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M., Tomas, M.C., 2008. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Ind. Crops Prod.* 28(3), 286-293.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223-270.
- Jayashree, B., Punna, R., Prasad, P., Bantte, K., et al., 2006. A database of simple sequence repeats from cereal and legume expressed sequence tags mined in silico: survey and evaluation. *In Silico Biol.* 6, 607-620.
- Lai, K., Lorenc, M.T., Edwards, D., 2012. Genomic databases for crop improvement. *Agronomy.* 2, 62-73.
- Lesins, K.A., Lesins, I., 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae). A Taxogenetic Study. The Hague.

- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Majumdar, S., Jayas, D.S., 2000a. Classification of cereal grains using machine vision. I. Morphology models. T. ASAE. 43 (6), 1669-1675.
- Majumdar, S., Jayas, D.S., 2000b. Classification of cereal grains using machine vision. II. Colour models. T. ASAE. 43 (6), 1677-1680.
- Majumdar, S., Jayas, D.S., 2000c. Classification of cereal grains using machine vision. III. Texture models. T. ASAE. 43 (6), 1681-1687.
- Majumdar, S., Jayas, D.S., 2000d. Classification of cereal grains using machine vision. IV. Combined morphology, colour, and texture models. T. ASAE. 43 (6), 1689-1694.
- Malaviya, D.R., Roy, A.K., Kaushal, P., Kumar, B., Tiwari, A., 2008. Genetic similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding pattern, Plant. Syst. Evol. 276, 125-136.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27, 209-220.
- Medoukali, I., Bellil, I., Khelifi, D., 2015. Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria. Not. Bot. Hort. Agr. Cluj-Napoca. 43(1), 86-95.
- Mohsenin, N.N., 1986. Physical Properties of Plant and Animal Materials. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- Mohsenin, N.N., 1970. Physical Properties of Plant and Animal Materials. Gordon and Breach Science Publishers, New York.
- Morgante, M., Olivieri, A.M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3, 175-182.
- Oh I.H., S. H. Jo, and K. S. Rhim (2001). A new method of determining apparent density and void fraction in a tobacco column, Trans. of the ASAE, 44(3), 651-654.
- Ozarslan, C., 2002. Physical properties of cotton seed. Biosyst. Eng. 76 (2), 169-174.
- Park, Y.J., Lee, J.K. Kim, N.S., 2009. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops. Molecules. 14, 4546-4569.

- Phansak, P., Taylor, P.W.J., Mongkolporn, O., 2005. Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. *Sci. Hortic.* 106, 137-146.
- Quezel, P., Santa, S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. [New flora of Algeria and the southern desert regions]. CNRS, Paris.
- Ronfort, J., Bataillon, T., Santoni, S., Delalande, M., et al. 2006. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume : building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 6, 28.
- Sacilik, K., Ozturk, R., Keskin, R., 2003. Some physical properties of hemp seed. *Biosyst. Eng.* 86 (2), 191-198.
- Sahoo, P.K., Srivastava, A.P., 2002. Physical properties of okra seed. *Biosyst. Eng.* 83 (4), 441-448.
- Sharma, V., Das, L., Pradhan, R.C., Naik, S.N., Bhatnagar, N., Kureel, R.S., 2011. Physical properties of Tung seed: an industrial oil-yielding crop. *Ind. Crops Prod.* 33 (2), 440-444.
- Small, E., Jomphe, M., 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Can. J. Bot.* 67, 3260-3294.
- Statsoft, Inc., 1995. STATISTICA for Windows. Tulsa, StatSoft, Inc. Available at <http://www.statsoftinc.com>
- Steele, K.P., Ickert-Bond, S.M., Zarre, Sh., Wojciechowski, M.F., 2010. Phylogeny and character evolution in *Medicago* (leguminosae): evidence from analyses of plastid trnk/matk and nuclear ga3ox1 sequences. *Am. J. Bot.* 97(7), 1142-1155.
- Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10, 967-981.
- Tunde-Akintunde, T.Y., Akintunde, B.O., 2004. Some physical properties of sesame seed. *Biosyst. Eng.* 88 (1), 127-129.
- Urena, M.O., Galvin, M.G., Teixeira, A.A., 2002. Measurement of aggregate true particle density to estimate grain moisture composition. *Trans. of the ASAE.* 45(6), 1925-1928.

- Vilche, C., Gely, M., Santalla, E., 2003. Physical properties of quinoa seed. *Biosyst. Eng.* 86 (1), 59-65.
- Wang, Z., Weber, J.L., Zhang, G., Tanksley, S.D., 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* 88, 1-6.
- Yalcin, I., Ozarslan, C., 2004. Physical properties of vetch seed. *Biosyst. Eng.* 88 (4), 507-512.
- Zapotoczny, P., Zielinska, M., Nita, Z., 2008. Application of image analysis for the varietal classification of barley. Morphological features. *J. Cereal Sci.* 48, 104-110.

Troisième Partie

*Diversité génétique du genre *Trifolium* L.*

Chapitre I

*Evaluation de la variabilité génétique du trèfle
Algérien (*Trifolium L.*) par les marqueurs
morphologiques et enzymatiques.*

Préambule

La diversité génétique des populations joue un rôle vital pour un programme d'amélioration réussie. La conservation et l'utilisation durable des ressources phylogénétiques nécessitent une identification précise de leurs accessions (Asci 2011). La caractérisation morphologique est la première étape dans la description et la classification des ressources génétiques (Smith et Smith 1989). Lorsque divers ensembles de populations de trèfle ont été analysées, une grande diversité génétique a été déterminée à l'aide des traits morphologiques (Kongkiatngam *et al.* 1995 ; Greene *et al.* 2004 ; Dias *et al.* 2008a ; Asci 2011).

Les marqueurs enzymatiques lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec d'autres approches sont d'une valeur considérable dans la compréhension de l'évolution des plantes (Malaviya *et al.* 2008). Malgré l'utilisation des marqueurs d'ADN, le polymorphisme enzymatique est également utilisé efficacement dans la délimitation et la conservation des espèces, les relations génétiques entre populations et entre des espèces étroitement apparentées. Des travaux sporadiques au sein du genre *Trifolium* basées sur des études enzymatiques sont disponibles (Kongkiatngam *et al.* 1995 ; Lange et Schifino-Wittmann 2000 ; Malaviya *et al.* 2005 ; 2008 ; Dias *et al.* 2008b.).

Dans le cadre de ce chapitre, nous tenterons d'appréhender l'ampleur de la variation génétique intra et interspécifique, au sein des espèces du genre *Trifolium* représentés par 157 accessions, par les marqueurs morphologiques et enzymatiques. Dix caractères biométriques concernent la morphologie de l'infrutescence, de la gousse et de la graine, ainsi que celle des cotylédons ont été analysés. L'analyse factorielle discriminante réalisée sur ces variables a montré leurs grandes contributions dans la différenciation des espèces. Aucune relation significative entre l'environnement du site de collecte et la morphologie n'a été détectée. Les deux systèmes enzymatiques analysés, estérase (EST) et glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), se sont avérés polymorphes. L'indice de diversité de marqueurs enzymatiques varie entre 0,07 et 0,61 avec une moyenne de 0,31. Le coefficient de similarité Jaccard s'étend de 0,10 à 0,60, ce qui indique que la collection représente des espèces génétiquement différentes. Un nombre considérable de zymogrammes spécifiques aux espèces ont été détectés, qui peuvent être utilisés pour l'identification interspécifique. Les résultats fournis par les deux types d'analyses, biométrique et enzymatique, sont en désaccord sur les distances interspécifiques. La grande variabilité enzymatique présente entre les espèces algériennes du trèfle fournit de bonnes ressources génétiques pour la sélection.

Evaluation of Genetic Variability in Algerian Clover (*Trifolium* L.) Based on Morphological and Isozyme markers

IMANE MEDOUKALI, INÈS BELLIL and DOUADI KHELIFI

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine, Constantine, Algérie

Abstract

Medoukali I., Bellil I., Khelifi D. (2015): Evaluation of genetic variability in Algerian clover (*Trifolium* L.) based on morphological and isozyme markers. Czech J. Genet. Plant Breed., 51: 50–61.

Genetic variation within and among fifteen *Trifolium* species represented by 157 accessions was assessed using morphological and isozyme markers. Most of morphometric characters contributed to the discrimination of the species. No significant relationship between the environment of the collection site and morphological features was detected. The two isozyme systems analysed, esterase (EST) and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), proved polymorphic. Phenotype diversity of isozyme markers ranged from 0.07 to 0.61 with an average of 0.31 based on the polymorphic information content. The pairwise Jaccard's similarity coefficient ranged between 0.10 and 0.60, indicating that the collection represents genetically diverse species. A considerable number of species-specific zymograms were detected which can be used for the species identification. The clustering pattern of isozyme markers was incongruent with the groupings based on quantitative traits. The rich isozyme variability present among the Algerian clover species indicates that they can provide good gene resources for breeding.

Keywords: clover; isozymes; morphology; PAGE; polymorphism

The genus *Trifolium* L. (Leguminosae) or clover includes 250–300 annual and perennial species, distributed throughout the temperate and subtropical regions (ALLEN & ALLEN 1981; ZOHARY & HELLER 1984; ELLISON *et al.* 2006). About 10% (20–30) of them are used as forage plants in commercial agriculture, and a greater number is used locally for fodder in their native zones (WILLIAMS & NICHOLS 2011). In particular, *Trifolium repens* (white clover), *Trifolium pratense* (red clover) and *Trifolium alexandrinum* (berseem clover) are widely used in the temperate livestock agriculture (ABBERTON 2007).

The genus has been divided into eight sections: *Lotoidea*, *Paramesus*, *Mystillus*, *Vesicaria*, *Chronosemium*, *Trifolium*, *Tricocephalum* and *Involucrarium*. *Lotoidea* is the largest and has served as a source taxon for the evolution of other sections (ZOHARY & HELLER 1984).

Trifolium species occur in a wide range of habitats, including meadows and prairies, open woodlands,

semi-deserts, mountains, and alpine peaks. A common feature of these diverse habitats is high solar radiation, hence, few clover species tolerate shade. The greatest species diversity is found in three geographic regions: the Mediterranean basin, western North America, and the highlands of eastern Africa (ELLISON *et al.* 2006).

Population genetic diversity and variability play a vital role for a successful breeding program. The conservation and sustainable use of plant genetic resources require accurate identification of their accessions (ASCI 2011). Morphological characterization is the first step in description and classification of genetic resources (SMITH & SMITH 1989). When various sets of clover populations were analysed, large genetic diversity was determined among and within populations using morphological traits (KONGKIATNGAM *et al.* 1995; GREENE *et al.* 2004; DIAS *et al.* 2008a; ASCI 2011).

Isozyme markers when used in combination with other approaches are of considerable value in un-

doi: 10.17221/10/2015-CJGPB

derstanding the crop plant evolution (MALAVIYA *et al.* 2008). Despite the use of DNA markers, isozyme polymorphism is also used effectively in species delimitation and conservation, genetic relationship between individual populations and closely related species. Sporadic reports within the genus *Trifolium* based on isozymic studies are available (KONGKIATNGAM *et al.* 1995; LANGE & SCHIFINO-WITTMANN 2000; MALAVIYA *et al.* 2005, 2008; DIAS *et al.* 2008b).

Algeria is one of the Mediterranean countries rich in genetic diversity; it is represented by 37 clover species in its natural flora (QUEZEL & SANTA 1962). However, there are few reports regarding the interrelationships of Algerian *Trifolium* species based on works using morphological and agronomic traits (GHOUBAY & ABDELGUERFI 1991; ISSOLAH & ABDELGUERFI 2000, 2003). Therefore, the present investigations were carried out to determine the similarity and differences between populations of the genus *Trifolium* L., which naturally grow in Northern Algeria by using both morphological and isozyme markers.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection. The study was conducted on 15 species of the genus *Trifolium* L. (*T. angustifolium*, *T. lappaceum*, *T. resupinatum*, *T. tomentosum*, *T. scabrum*, *T. campestre*, *T. fragiferum*, *T. pallidum*, *T. pallescens*, *T. squarrosus*, *T. glomeratum*, *T. cherleri*, *T. stellatum*, *T. repens* and *T. spumosum*) represented by 157 accessions. These species were collected from 32 sites covering a wide range of bioclimatic stages in Northern Algeria from May to July 2013. The collecting sites extended from the coastal region to the Tellian Atlas Mountains, including

the coastal plains and the steppe highlands, along a gradient of increasing aridity from North to South (Figure 1). For every collection seven main ecological parameters were determined (Table 1): altitude (Alt), latitude (Lat), longitude (Lon), average annual rainfall (P_m), the average of the minimum temperature of the coldest month (m), the average of the maximum temperature of the hottest month (M) and classical Emberger's coefficient (Q_2), which was calculated according to STEWART (1974):

$$Q_2 = 3.43 P/(M - m) \quad (1)$$

where:

P – annual rainfall

M – average of the maximum temperature of the hottest month

m – average of the minimum temperature of the coldest month

Morphological markers. For each accession, 10 fruiting heads were taken from different plants randomly and 10 quantitative traits related to fruiting head, pod and seed were scored: size of fruiting heads: length (LF), width (WDF); number of pods per fruiting head (PF); number of seeds per pod (SP); number of seeds per fruiting head (SF); seed size: length (LS), width (WS); weight of 30 fruiting heads (WTF); weight of 1000 seeds (WTS) and the ratio weight of seeds/weight of fruiting heads (RW).

Isozyme markers. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) as described by SINGH *et al.* (1991) was used to analyse the variation in two enzymatic systems: EST (E.C. 3.1.1.) and GOT (E.C. 2.6.1.1). Extraction of enzymes was performed from six-days-old seedlings according to ZORO BI *et al.* (1999).



Figure 1. Locations of the sampled populations of the genus *Trifolium* L. in relation to bioclimate in northern Algeria

Isozyme staining protocols followed methods as described by BENDIAB *et al.* (1993).

Statistical analysis. Morphometric traits were analysed using the principal component analysis (PCA). Mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) of the morphological traits for the 15 studied species were computed. The correlation between morphological variability and bioclimate was examined by another PCA including seven ecological parameters (Alt, Lat, Lon, *Pm*, *m*, *M* and *Q2*).

UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) dendrogram based on Euclidean distances was constructed to evaluate phenetic relationships between species. All analyses based on morphological markers were performed using the STATISTICA version 6.0 software (Statsoft, Inc. 1995). For each enzyme system, zones of activity and bands were numbered sequentially from the origin. All isozymes that appeared in a zone were considered in identifying isozyme phenotypes that were lettered

Table 1. Sampling sites and the main bioclimatic parameters used in this study

No.	Localities	Sample size	Alt	Lat	Lon	<i>Pm</i>	<i>m</i>	<i>M</i>	<i>Q2</i>
1	Oued Athmenia	4	757	36°16'17.87"N	6°16'36.31"E	568	2.5	31.3	67.65
2	Mila east	9	831	36°21'48.77"N	6°19'56.83"E	742	4.4	31.1	95.32
3	Constantine North	7	429	36°31'04.89"N	6°33'52.68"E	704	3.2	31.4	85.63
4	Constantine west	6	850	36°18'08.13"N	6°27'50.96"E	558	3.0	32.2	65.55
5	Constantine center	5	584	36°20'20.08"N	6°37'27.04"E	624	3.3	32.0	74.58
6	Tipaza	4	203	36°34'48.16"N	2°34'06.74"E	626	8.4	30.1	98.95
7	Sidi Belabbes	5	465	35°14'20.82"N	0°37'03.24"E	450	4.8	29.7	61.99
8	Bouira	6	537	36°22'09.18"N	3°51'33.64"E	506	0.2	30.9	56.53
9	Bouira west	4	144	36°34'38.26"N	3°33'16.25"E	711	5.9	31.9	93.80
10	Boumerdès	5	20	36°44'52.57"N	3°41'42.29"E	739	6.8	30.8	105.62
11	Tizi Ouzou	8	129	36°43'54.04"N	4°17'54.66"E	896	6.2	32	119.12
12	algeirs center	4	120	36°44'43.41"N	3°04'10.22"E	707	8.1	28.5	118.87
13	Mohammadia	7	3	36°44'21.62"N	3°08'50.41"E	670	7.6	29.8	103.52
14	algeirs west	7	172	36°44'00.09"N	3°01'33.28"E	762	6.9	28.4	121.57
15	Blida	8	70	36°32'48.32"N	2°48'23.72"E	791	7.0	30.9	113.52
16	Ain Defla	5	257	36°09'57.25"N	1°43'25.04"E	593	6.0	33.5	73.96
17	Relizane	2	49	35°55'35.18"N	0°47'33.24"E	348	6.8	31.1	49.12
18	Chlef	4	135	36°14'45.30"N	1°14'17.86"E	405	6.6	32.6	53.43
19	Medea	9	385	36°20'33.96"N	2°46'04.83"E	736	2.5	30.6	89.84
20	Tissemsilt	6	575	36°00'36.95"N	2°09'11.39"E	609	1.1	30.1	72.03
21	Guelma	4	798	36°22'08.93"N	7°13'59.93"E	564	1.9	32.1	64.06
22	Annaba	10	132	37°02'56.98"N	7°23'19.39"E	712	8.2	28.1	122.72
23	Akbou	2	207	36°30'03.58"N	4°34'28.30"E	659	6.2	31.3	90.05
24	Tichy	5	2	36°40'21.52"N	5°08'59.99"E	856	8.7	28.9	145.35
25	Sétif	1	1089	36°11'41.65"N	5°24'25.79"E	473	0.3	31.7	51.67
26	Jijel South	4	166	36°47'29.52"N	5°41'26.87"E	818	8.2	29.3	132.97
27	Jijel east	3	132	36°47'56.92"N	5°42'56.70"E	818	8.2	29.3	132.97
28	Jijel North	1	9	36°48'56.16"N	5°42'04.92"E	818	8.2	29.3	132.97
29	Jijel west	3	21	36°47'26.38"N	5°39'46.16"E	818	8.2	29.3	132.97
30	Oran	2	87	35°37'40.78"N	0°36'01.72"E	383	8.2	26.6	71.40
31	oued Righa	4	32	36°53'46.84"N	7°03'56.20"E	767	7.1	28.5	122.94
32	filfila	3	159	36°53'11.44"N	7°04'56.50"E	794	5.7	29.6	113.95

Alt – Altitude; Lat – Latitude; Lon – Longitude; *Pm* – the average annual rainfall; *m* – the average of the minimum temperature of the coldest month; *M* – the average of the maximum temperature of the hottest month; *Q2* – bioclimatic Emberger's coefficient, calculated according to STEWART (1974), see Eq. (1)

doi: 10.17221/10/2015-CJGPB

arbitrarily. The polymorphism information content (PIC) for each zone:

$$PIC_i = 1 - P_{ij}^2 \quad (2)$$

where:

P_{ij} – frequency of the j^{th} phenotype for the i^{th} zone

To estimate the isoenzymatic variation among the species UPGMA dendrogram was constructed based on Jaccard's similarity coefficient (JACCARD 1908) by the aid of XLSTAT version 2014.1.09 program (Addinsoft 2007). The correlation between the morphological and isozyme distances was assessed by the Mantel test (MANTEL 1967).

RESULTS

Morphological characters and their relationship with ecological parameters. Mean, range, SD and CV values of the morphological characteristics studied are shown in Table 2. The number of pods per fruiting head (PF) was found to be the most variable characteristic with CV 45.03% ranging from 8.00 mm to 91.00 mm followed by the number of seeds per fruiting head (SF) with CV 33.04% ranging between 3.33 mm and 86.00 mm. The length of fruiting heads (LF) presented an average variability coefficient with 17.25% followed by WDF and WTF with CV 2.60% and 1.85%, respectively. The remaining characters displayed a margin variation across all the species.

PCA revealed that the first three axes accounted for 86.60% of the total variation with 52.41%, 24.21% and 9.97% for PC1, PC2 and PC3, respectively. Two-

Table 2. Mean, range, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) of the analyzed traits for 15 *Trifolium* species

Traits	Min	Max	Mean	SD	CV (%)
LF (mm)	4.82	53.20	15.75	11.68	17.257
WDF (mm)	4.19	28.18	10.90	4.53	2.600
PF (score)	8.00	91.00	36.58	18.86	45.030
WTF (g)	0.36	16.20	3.51	3.83	1.853
SP (score)	0.00	6.00	1.18	0.16	0.003
SF (score)	3.33	86.00	26.87	16.16	33.047
LS (mm)	0.89	2.51	1.59	0.41	0.021
WS (mm)	0.60	1.89	1.14	0.31	0.012
WTS (g)	0.16	5.50	1.40	1.13	0.163
RW (g/g)	0.14	1.68	0.56	0.33	0.014

LF – length of fruiting head; WDF – width of fruiting head; PF – No. of pods per fruiting head; WTF – weight of 30 fruiting heads; SP – No. of seeds per pod; SF – No. of seeds per fruiting head; LS – length of the seed; WS – width of the seed; WTS – weight of 1000 seeds; RW – ratio weight of seeds per weight of fruiting heads

dimensional (2-D) plot was prepared using the first two PCs (Figure 2a). All quantitative traits showed a discriminant power and the most important characters in accession differentiation were PF and SF, hence, they had high loadings on the first two principal components. The remaining characters displayed a significant correlation between them and contributed highly to the formation of PC1, excluding RW and SP, which contributed mainly to PC2 and PC3, respectively. According to PCA performed to evaluate the correlation between morphology and bioclimate (Fig-

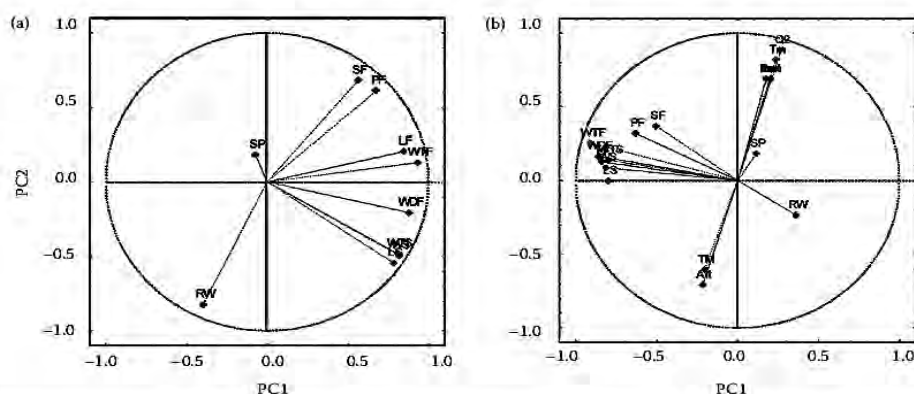


Figure 2. Principal component analysis depiction of ten morphological characters (a) and their relationship with bioclimate (b) LF – length of fruiting head; WDF – width of fruiting head; PF – No. of pods per fruiting head; WTF – weight of 30 fruiting heads; SP – No. of seeds per pod; SF – No. of seeds per fruiting head; LS – length of the seed; WS – width of the seed; WTS – weight of 1000 seeds; RW – ratio weight of seeds per weight of fruiting heads

Table 3. Phenotype frequencies at seven zones of enzymatic activity in fifteen *Trifolium* species

Zones	Phenotypes	Total	Species														
			TA 22	Tlap 18	Tsc 20	Tcp 23	Ttm 14	TR 10	Tst 9	Tsq 8	Tps 8	Tpd 7	Tch 6	Tg 5	Tf 4	Trp 2	Tsp 1
<i>Got-1</i>	A: 1+2	0.04	–	–	–	–	–	0.60	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B: 2	0.20	0.18	–	–	–	1.00	0.40	0.89	–	–	–	–	–	–	–	1.00
	C: 2+4	0.06	0.41	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	D: 2+5	0.01	–	–	–	–	–	–	0.11	–	–	–	–	–	–	–	–
	E: 2+4+5	0.06	0.41	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	F: 3	0.01	–	0.11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	G: 3+4	0.10	–	0.89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	H: 5	0.03	–	–	–	0.22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	I: 5+6	0.05	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–	–	–	–	–	–
	J: 5+7	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–
	K: 5+9	0.08	–	–	–	0.52	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	L: 5+9+11	0.04	–	–	–	0.26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	M: 6	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.17	–	–	–	–
	N: 6+7	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.83	–	–	–	–
	O: 6+9	0.06	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–	–	–	1.00	–
P: 7	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.71	–	–	–	–	–	
Q: 7+8	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.29	–	–	–	–	–	
R: 10+12	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–	–	–	
S: 13	0.13	–	–	1.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Got-2</i>	A: 14	0.04	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–	–	–	
	B: 14+16	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.50	–	–	
	C: 14+16+17	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.25	–	–	
	D: 15+17	0.03	–	–	–	0.17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	E: 16	0.32	–	0.94	–	–	1.00	0.10	1.00	0.13	–	1.00	–	–	0.25	–	1.00
	F: 16+17	0.06	–	–	–	–	–	0.90	–	0.13	–	–	–	–	–	–	–
	G: 17	0.38	1.00	–	–	0.78	–	–	–	0.75	1.00	–	–	1.00	–	0.50	–
	H: 17+19	0.01	–	–	–	0.04	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	I: 18	0.07	–	–	0.55	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	J: 19	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.50	–
K: Null	0.06	–	0.06	0.45	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Est-1</i>	A: 1+2	0.08	–	–	–	–	0.86	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B: 2	0.01	–	–	–	–	0.14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	C: 2+4	0.03	–	–	0.05	–	–	–	–	–	0.50	–	–	–	–	–	–
	D: 2+5	0.03	–	–	0.10	–	–	–	–	–	0.13	–	0.17	–	–	–	–
	E: 2+4+5	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	0.25	–	–	–	–	–	–
	F: 2+3+6	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.17	–	–	–	–
	G: 2+5+6	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.17	–	–	–	–
	H: 2+6	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.17	–	–	–	–
	I: 3+6	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.33	–	–	–	–
	J: 4	0.05	–	–	0.30	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	0.25	–	–
	K: 4+5	0.06	–	–	0.35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.75	–	–
	L: 5	0.03	–	–	0.20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	M: 6	0.23	–	1.00	–	–	–	0.50	–	1.00	–	–	–	1.00	–	–	–
N: Null	0.44	1.00	–	–	1.00	–	0.50	1.00	–	–	1.00	–	–	–	1.00	1.00	

doi: 10.17221/10/2015-CJGPB

Table 3 to be continued

Zones	Phenotypes	Total	Species															
			TA 22	Tlap 18	Tsc 20	Tcp 23	Ttm 14	TR 10	Tst 9	Tsq 8	Tps 8	Tpd 7	Tch 6	Tg 5	Tf 4	Trp 2	Tsp 1	
Est-2	A: 7	0.02	–	–	–	–	0.21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	B: 7+8	0.06	–	–	–	0.71	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	C: 7+8+9	0.12	0.36	0.06	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–	–	–	–	1.00	
	D: 7+8+9+11	0.09	0.64	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	E: 7+9	0.21	–	–	1.00	–	–	0.90	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	
	F: 7+8+10	0.01	–	–	–	0.07	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	G: 8	0.06	–	0.06	–	–	–	–	0.78	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00
	H: 8+9	0.06	–	0.11	–	–	–	–	–	0.13	–	–	0.50	0.60	–	–	–	–
	I: 8+9+10	0.03	–	0.22	–	–	–	–	–	–	–	0.14	–	–	–	–	–	–
	J: 8+9+10+11	0.01	–	0.06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	K: 8+9+11	0.01	–	0.06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	L: 8+10	0.02	–	0.17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	M: 8+10+11	0.01	–	0.06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	N: 8+11	0.03	–	0.22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	O: 9	0.05	–	–	–	–	–	0.10	–	0.13	–	0.14	0.50	0.40	–	–	–	–
P: 9+10	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.14	–	–	–	–	–	–	
Q: 9+11	0.06	–	–	–	–	–	–	–	0.63	–	0.57	–	–	–	–	–	–	
R: 11	0.01	–	–	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	–	–	–	–	–	
S: Null	0.16	–	–	–	1.00	–	–	0.22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Est-3	A: 12	0.34	1.00	0.44	0.20	0.09	–	0.60	0.11	–	0.13	0.29	0.17	1.00	0.25	–	–	
	B: 12+13	0.10	–	–	0.70	0.09	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	C: 12+13+15	0.05	–	–	–	0.35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	D: 12+13+15+16	0.03	–	–	–	0.17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	E: 12+13+16	0.01	–	–	–	0.09	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	F: 12+14	0.03	–	0.22	–	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	–	–	–	
	G: 12+15	0.03	–	–	–	0.17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	H: 12+16	0.06	–	–	–	0.04	–	–	0.78	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00
	I: 13	0.01	–	–	0.05	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	J: 14	0.15	–	–	–	–	1.00	–	–	0.38	0.13	–	0.83	–	–	–	–	–
K: Null	0.20	–	0.33	0.05	–	–	0.40	0.11	0.63	0.63	0.71	–	–	–	0.75	1.00	–	
Est-4	A: 17	0.32	0.73	0.17	–	0.39	0.21	0.10	0.89	–	0.50	–	–	1.00	–	1.00	–	
	B: 17+18	0.04	–	–	–	–	0.50	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	C: 17+19	0.23	–	–	1.00	–	–	0.90	–	–	0.38	–	0.67	–	–	–	–	
	D: 17+20	0.08	–	–	–	0.57	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	E: 17+20+21	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.29	–	–	–	–	–	
	F: 17+20+21+22	0.02	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.43	–	–	–	–	–	
	G: 17+21	0.04	0.27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	H: 18	0.03	–	–	–	–	0.29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	I: 19	0.04	–	–	–	–	–	–	–	0.13	0.13	–	–	–	1.00	–	–	
	J: 20	0.02	–	0.11	–	0.04	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	K: 20+21	0.01	–	0.11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
	L: 21	0.06	–	0.50	–	–	–	–	–	–	–	0.14	–	–	–	–	–	
	M: 21+22	0.01	–	0.06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
N: 20+21+22	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.14	–	–	–	–	–		
O: Null	0.08	–	0.06	–	–	–	–	0.11	0.88	–	–	0.33	–	–	–	–	1.00	

Table 3 to be continued

Zones	Phenotypes	Total	Species														
			TA 22	Tlap 18	Tsc 20	Tcp 23	Ttm 14	TR 10	Tst 9	Tsq 8	Tps 8	Tpd 7	Tch 6	Tg 5	Tf 4	Trp 2	Tsp 1
Est-5	A: 23	0.17	0.05	–	–	0.35	–	1.00	–	–	0.13	0.29	–	–	1.00	–	–
	B: 23+24	0.08	–	–	–	0.13	–	–	1.00	–	–	–	–	–	–	–	–
	C: 23+25	0.09	–	–	–	–	1.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	D: 23+25+26	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00	–	–	–
	E: 23+25+27	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.50
	F: 23+25+28	0.01	–	–	–	0.04	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	G: 23+27	0.05	0.32	–	–	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	–	–	–
	H: 23+27+29	0.06	0.23	–	–	–	–	–	–	–	0.50	–	–	–	–	–	–
	I: 23+29	0.11	0.27	0.06	–	–	–	–	–	–	–	0.71	1.00	–	–	–	–
	J: 23+27+30+32	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	–	–	–
	K: 23+28	0.01	–	–	–	0.04	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	L: 24	0.04	–	–	0.10	0.17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	M: 24+27	0.01	–	–	0.05	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00
	N: 25+26	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.50
	O: 27	0.03	0.09	–	0.10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	P: 27+29	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	0.25	–	–	–	–	–	–
	Q: 27+30	0.03	–	–	–	–	–	–	–	–	0.63	–	–	–	–	–	–
	R: 27+30+32	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	–	–	–
	S: 27+32	0.01	–	–	–	–	–	–	–	–	0.13	–	–	–	–	–	–
	T: 28	0.01	–	–	–	0.04	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
U: 29	0.03	0.05	0.11	0.05	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
V: 28+29	0.09	–	0.78	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
W: 28+29+31	0.01	–	0.06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
X: Null	0.12	–	–	0.70	0.22	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	

TA = *T. angustifolium*; Tlap = *T. lappaceum*; Tsc = *T. scabrum*; Tcp = *T. campestre*; Ttm = *T. tomentosum*; TR = *T. resupinatum*; Tst = *T. stellatum*; Tsq = *T. squarrosum*; Tps = *T. pallescens*; Tpd = *T. pallidum*; Tch = *T. cherleri*; Tg = *T. glomeratum*; Tf = *T. fragiferum*; Trp = *T. repens*; Tsp = *T. spumosum*

ure 2b), none of the morphological characters showed a close relationship with the climatic variables taken into account. This analysis explained 77.36% of the total variation. Although most of the morphometric traits contributed to the formation of PC1, PC2 was influenced mainly by ecological parameters.

Cluster analysis based on quantitative traits. The phenogram based on Euclidean distances (Figure 3) revealed that all the species were grouped into three major clusters. The first cluster (I) consisted of eight species and could be further divided into three sub-clusters: *T. angustifolium* formed the first one (IA) at a distance of 31.23, sub-cluster IB was composed of six species (*T. pallidum*, *T. lappaceum*, *T. campestre*, *T. fragiferum*, *T. pallescens*, *T. repens*) and sub-cluster IC was formed by *T. squarrosum* and linked to IB at

a distance of 17.46. The second cluster (II) was composed of six species that were subdivided into two sub-clusters at a level distance of 26.51: IIA (*T. stellatum*, *T. cherleri*, *T. scabrum* and *T. tomentosum*) and IIB (*T. resupinatum* and *T. glomeratum*). The longest branch separated *T. spumosum* from the rest of the species at a taxonomic distance of 65.18; this species was the lone member of cluster III.

Isozyme phenotype frequencies. Phenotype frequencies observed for each isozyme are presented in Table 3, with a total of 51 bands attributed to 113 phenotypes that were detected for the EST and GOT isozymes. Examples of zymograms and their diagrams are shown in Figure 4.

Two zones of activity (*Got-1* and *Got-2*), with 19 and 11 phenotypes for *Got-1* and *Got-2*, respectively,

doi: 10.17221/10/2015-CJGPB

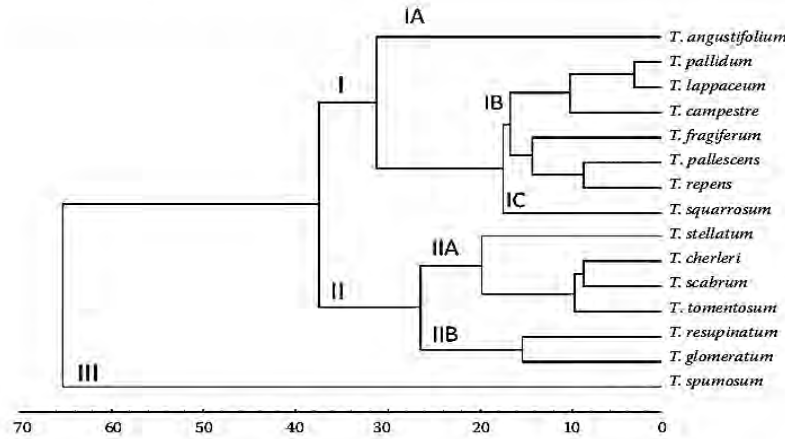


Figure 3. UPGMA phenogram based on morphological characters showing relatedness among *Trifolium* species

were revealed. The phenotypes *Got-1B* (band 2), *Got-2G* (band 17) and *Got-2E* (band 16) were the most frequent in their zones with frequencies 0.20, 0.38 and 0.32, respectively. All other phenotypes were species-specific at different levels of frequency, except *Got-1* phenotype O, which was shared by *T. pallescens* and *T. repens*, and *Got-2* phenotype F, which was shared by *T. resupinatum* and *T. squarrosom*. The null form *Got-2K* was observed only in two species *T. lappaceum* and *T. scabrum* with frequency 0.06.

For the EST isozyme system, five zones and 32 bands that attributed to 14, 19, 11, 15 and 24 phenotypes for *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4* and *Est-5*, respectively, were recorded. Null phenotypes of *Est-1N*, *Est-2S*, *Est-3K*, *Est-4O* and *Est-5X* were present at frequencies 0.44, 0.16, 0.20, 0.08 and 0.12, respectively. *Est-1* phenotype M was the most frequent following the

null form *Est-1N* at frequency 0.23 in the *Est-1* zone. Phenotype E of *Est-2* and phenotype A of *Est-3*, *Est-4* and *Est-5* were the most frequent at the 0.21, 0.34, 0.32 and 0.17 proportions, respectively, followed by *Est-2C*, *Est-3G*, *Est-4C* and *Est-5I* with frequencies 0.12, 0.15, 0.23 and 0.11, respectively. The remaining phenotypes were considered to be rare or species-specific with relatively low frequencies.

Phenotypic polymorphism. Table 4 represents the polymorphism information content (PIC) for each zone in each species. The average PIC value was estimated to be 0.30. *T. spumosum* species was excluded from intraspecific variation because it was represented uniquely by one accession. All isozyme zones were monomorphic in some species and polymorphic in others. EST isozymes were considered to be the most informative with PIC values varying from 0.32 to 0.37. *Got-1* and *Got-2* zones had the lowest

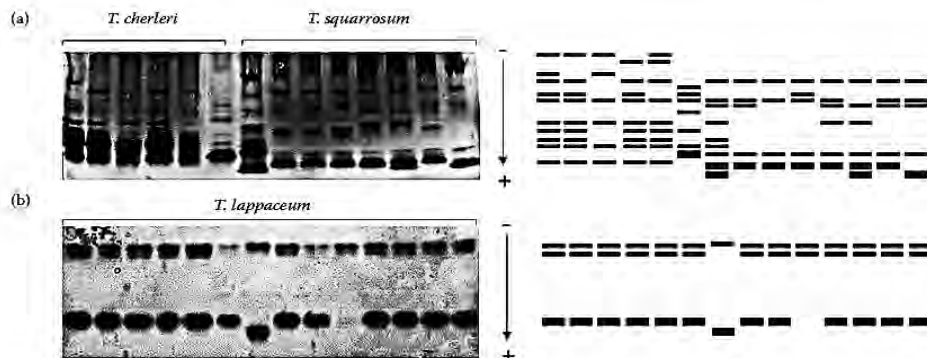


Figure 4. Zymograms of EST in *Trifolium cherleri* and *T. squarrosom* accessions (a) and GOT in some *T. lappaceum* accessions (b)

Table 4. Polymorphism information content (PIC) for each zone in each studied species

Species	Zones							Mean
	Got-1	Got-2	Est-1	Est-2	Est-3	Est-4	Est-5	
<i>T. angustifolium</i>	0.63	0.00	–	0.46	0.00	0.40	0.76	0.38
<i>T. lappaceum</i>	0.20	0.10	0.00	0.85	0.64	0.69	0.38	0.41
<i>T. scabrum</i>	0.00	0.50	0.74	0.00	0.47	0.00	0.49	0.31
<i>T. campestre</i>	0.61	0.36	–	–	0.79	0.53	0.78	0.61
<i>T. tomentosum</i>	0.00	0.00	0.24	0.44	0.00	0.62	0.00	0.19
<i>T. resupinatum</i>	0.48	0.18	0.50	0.18	0.48	0.18	0.00	0.29
<i>T. stellatum</i>	0.20	0.00	–	0.35	0.37	0.20	0.00	0.19
<i>T. squarrosum</i>	0.00	0.41	0.00	0.56	0.47	0.22	0.56	0.32
<i>T. pallescens</i>	0.00	0.00	0.66	0.00	0.56	0.59	0.66	0.35
<i>T. pallidum</i>	0.41	0.00	–	0.61	0.41	0.69	0.41	0.42
<i>T. cherleri</i>	0.28	0.00	0.78	0.50	0.28	0.44	0.00	0.33
<i>T. glomeratum</i>	0.00	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	0.00	0.07
<i>T. fragiferum</i>	0.00	0.63	0.38	0.00	0.38	0.00	0.00	0.20
<i>T. repens</i>	0.00	0.50	–	0.00	–	0.00	0.50	0.20
<i>T. spumosum</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
Mean	0.20	0.19	0.37	0.34	0.37	0.33	0.32	0.30

PIC values of 0.20 and 0.19, respectively. Whence, *T. tomentosum*, *T. pallescens* and *T. glomeratum* were found monomorphic for the GOT isozymes. *T. lappaceum*, *T. campestre* and *T. resupinatum* displayed variation for the two GOT zones. All other species were monomorphic for one zone and polymorphic for the other. On the other hand, *Trifolium* species disclosed more or less important enzymatic variability based on PIC values for each zone. *T. campestre* showed the highest intraspecific variation across all zones with PIC value of 0.61, followed by *T. pallidum* and *T. lappaceum* with PIC values of 0.41 and 0.42,

respectively. Nevertheless, the least intraspecific variation was represented by *T. glomeratum* (PIC = 0.07), which was polymorphic solely for the *Est-2* zone.

Cluster analysis based on isozyme markers. Similarities between species were evaluated by Jaccard's coefficient (J), and distance values were represented in a UPGMA dendrogram (Figure 5). According to the isoenzyme variability, clover species were classified into four clusters. Cluster I was composed of the two least distant species *T. spumosum* and *T. stellatum* at a distance 0.40. *T. tomentosum* formed cluster II that was linked to the first one at a distance 0.75. Clus-

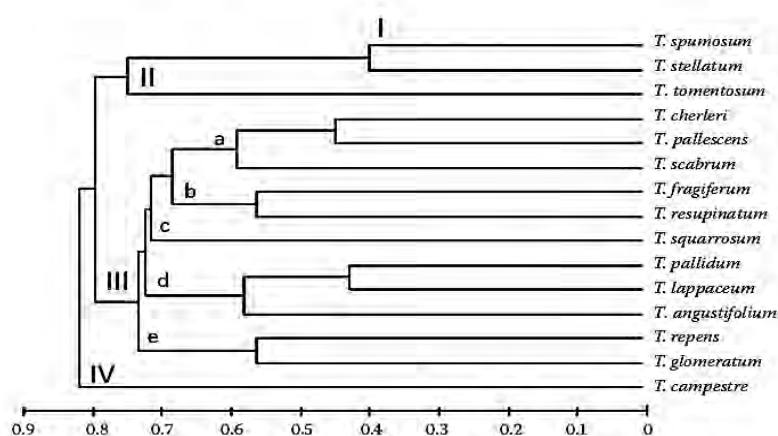


Figure 5. UPGMA dendrogram based on isozyme markers showing relatedness among *Trifolium* species

doi: 10.17221/10/2015-CJGPB

ter III was the largest and embodied 11 species that were subdivided into five sub-clusters; sub-cluster IIIa comprised three species, *T. cherleri*, *T. pallescens* and *T. scabrum*, at a distance 0.59. Two species, *T. fragiferum* and *T. resupinatum*, formed sub-cluster IIIb at a distance 0.58. *T. squarrosus* was the lone member of sub-cluster IIIc at a distance 0.71. Sub-clusters IIId and IIIE were composed of three (*T. pallidum*, *T. laplaceum* and *T. angustifolium*) and two (*T. repens* and *T. glomeratum*) species at distances 0.72 and 0.73, respectively. *T. campestre* constituted cluster IV and was the most distant ($d = 0.82$) from all other species. Pairwise comparison was performed among all species. Jaccard's similarity coefficients calculated from isozyme data varied from 0.10 to 0.60, with a mean value 0.31. The highest similarity coefficient 0.60 was observed between *T. stellatum* and *T. spumosum*, whereas it was lowest between *T. spumosum* and *T. cherleri*.

The Mantel test based on Pearson's correlation showed no significant correlation ($r = 0.051$, $P = 0.620$) between matrices of Euclidean morphological distances and Jaccard's standard distances of isozyme markers.

DISCUSSION

It is the notion among the breeders that the high level of genetic diversity in the breeding material contributes to the significance of selection. To be useful for plant breeders, genetic resources must be characterized by morphological and agronomic traits (ASCI 2011).

Results of this study reflect the existence of high variation within and among Algerian clover species based on morphological characters. This is not surprising since several studies have shown that the genome of perennial *Trifolium* spp. is extremely polymorphic due to its strong self-incompatibility (PAPLAUSKIENĖ & DABKEVIČIENĖ 2012).

Most of the quantitative traits analysed in this study were found to be important in the discrimination of accessions, especially, number of pods per fruiting head (PF) and number of seeds per fruiting head (SF). A morphological study conducted in seven species of clovers showed the importance of biometrical characteristics (width of fruiting head, weight of 1000 seeds, weight of fruiting heads, number of pods per fruiting head and number of seeds per fruiting head) in comparison with the characteristics of flowering and vegetative development (ISSOLAH 1997). The recorded high morphological variation is consistent with findings of many genetic diversity studies

on *Trifolium* ssp. germplasm collections (KONGKIATNGAM *et al.* 1995; ISSOLAH & ABDELGUERFI 1999b; GREENE *et al.* 2004; DIAS *et al.* 2008a; ASCI 2011; PAPLAUSKIENĖ & DABKEVIČIENĖ 2012).

Regarding the correlations between morphological characters and the environment of populations, no significant relationship was detected. Nevertheless, a comparison of the same biometric characteristics in *T. scabrum* L. wild populations allowed the selection of populations suitable for cultivation on arid soils of Algeria (ISSOLAH & ABDELGUERFI 1999b). Relationships between biometrical characteristics and ecological factors within the populations of several spontaneous clovers in Algeria have also been reported (ISSOLAH & ABDELGUERFI 1999a).

Diversity of traits enabled the division of species into eight clusters and sub-clusters. This finding supplements earlier studies that realized different groups of populations based on the contribution of several morpho-agronomic traits (DIAS *et al.* 2008a; DROBNÁ 2009; TUČAK *et al.* 2009; ASCI 2011).

Using isozymes as markers for genetic diversity evaluation would not be as straightforward as in the genus *Trifolium*, because of high variation within and among species (KONGKIATNGAM *et al.* 1995). A large genetic variability was observed with EST and GOT enzymatic systems, whence, a total of 51 bands and 113 isozyme phenotypes were recorded based on the two enzymes. Such a large number of bands and phenotypes reflects the high level of genetic variation within and among the fifteen *Trifolium* species studied. The genetic variability of phenotypes ranged from 0.07 (*T. glomeratum*) to 0.61 (*T. campestre*) with an average of 0.30 based on the polymorphic information content (PIC). Levels of variability in this study were comparable to those of many enzymatic variation studies on *Trifolium* populations (KONGKIATNGAM *et al.* 1995; LANGE & SCHIFINO-WITTMANN 2000; MALAVIYA *et al.* 2005, 2008; DIAS *et al.* 2008b).

EST analysis resulted in more bands and patterns (32 bands and 83 phenotypes) than GOT, which was more conservative (19 bands and 30 phenotypes), since all species were polymorphic for at least one zone of EST, and this is the most suitable enzyme system to assess genetic variability. Several researchers agree with the highest variability for the EST enzymatic system among and within *Trifolium* species (LANGE & SCHIFINO-WITTMANN 2000; MALAVIYA *et al.* 2005).

Isozyme zones that showed species-specific phenotypes and allozymes could be used to differenti-

ate between species but only if they were present at reasonably high frequencies. Although species-specific forms were found for all zones of each enzyme system (Table 3), they were present at a low frequency across the collection (less than 13%), but some of them were present with high frequency at an intraspecific level (100%). The low frequencies for species-specific phenotypes at the intraspecific level make them less useful for species identification since a large number of plants must be assayed to obtain accurate results (KONGKIATNGAM *et al.* 1995).

The importance of isozyme variation among the examined *Trifolium* species is demonstrated by the topology of the dendrogram based on Jaccard's similarity coefficient that ranged from 0.10 to 0.60 with a mean of 0.31, this wide range of similarity indices reflects a high degree of polymorphism at the isozyme level. This clustering was inconsistent with that based on morphological markers since the Mantel test ($r = 0.051$, $P = 0.620$) indicated no significant correlation between the matrix based on morphological characters and that derived from the enzymatic analysis. The result suggests that the two marker systems give different estimates of genetic relations among populations. A large number of studies have reported strong differences between the quantitative traits and electrophoretic data suggesting that natural selection acting upon the quantitative traits is responsible for the different patterns of differentiation revealed by neutral and quantitative traits (KONGKIATNGAM *et al.* 1995; DIAS *et al.* 2008a).

The fact that different clusters using isozyme and morphological data were observed can be exploited for breeding purposes. A breeding program can be started within any morphological cluster without risk of inbreeding depression as shown by the large enzymatic variability available within the clusters. Furthermore, enzymatic markers could be used as tools to help in the variety distinction. So, finally morphological and isozyme approaches provide complementary information for breeding.

This study gives an insight into the rich variability present in the Algerian *Trifolium* species core collection at morphological and enzymatic levels, which can prove to be a good source of genes for further improvement programs. Moreover, most of the studied species had specific zymograms that could serve as markers for species identification. Including seed storage proteins and other molecular variation will further help to have a better understanding to select starting material for breeding purposes.

References

- Abberton M.T. (2007): Interspecific hybridization in the genus *Trifolium*. *Plant Breeding*, 126: 337–342.
- Addinsoft (2007): XLSTAT, Analyse de données et statistique avec MS Excel. New York, Addinsoft.
- Allen O.N., Allen E.K. (1981): *The Leguminosae. A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation*. Madison, University of Wisconsin Press.
- Asci O.O. (2011): Biodiversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) collected from Turkey. I: Morpho-agronomic properties. *African Journal of Biotechnology*, 10: 14073–14079.
- Bendiab K., Baaziz M., Brakez Z., Sedra My.H. (1993): Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. *Euphytica*, 65: 23–32.
- Dias P.M.B., Julier B., Sampoux J.P., Barre P., Dall'Agnol M. (2008a): Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica*, 160: 189–205.
- Dias P.M.B., Pretz V.F., Dall'Agnol M., Schifino-Wittmann M.T., Zuanazzi J.A. (2008b): Analysis of genetic diversity in the core collection of red clover (*Trifolium pratense*) with isozyme and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8: 202–211.
- Drobná J. (2009): Yield and forage quality of Romanian red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties studied in Slovakia. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 37: 204–208.
- Ellison N.W., Liston A., Steiner J.J., Williams W.M., Taylor N.L. (2006): Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium* – Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 688–705.
- Ghoubay A., Abdelguerfi A. (1991): Spontaneous species of the genus *Trifolium* L. in Algeria: Comparison of seeds and inflorescences in thirteen clovers. In: Proc. 4th Int. Rangeland Congr. Montpellier, Apr 22–26, 1991: 375–376.
- Greene S.L., Gritsenko M., Vandemark G. (2004): Relating morphologic and RAPD marker variation to collection site environment in wild populations of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Genetic Resources and Crop Environment*, 51: 643–653.
- Issolah R. (1997): Comportement, biométrie et caryologie de populations spontanées de treize espèces du genre *Trifolium* L. en Algérie. [MSc. Thesis.] El Harrach, INA.
- Issolah R., Abdelguerfi A. (1999a): Chromosome numbers within some spontaneous populations of *Trifolium* species in Algeria. *Caryologia*, 52: 151–154.
- Issolah R., Abdelguerfi A. (1999b): Variability within 31 spontaneous populations of *Trifolium scabrum* L., na-

doi: 10.17221/10/2015-CJGPB

- ture of relations with factors of the site of origin. In: 9th Meeting of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Mediterranean Pastures and Fodder Crops, Badajoz, Nov 26–29, 1997: 123–127.
- Issolah R., Abdelguerfi A. (2000): Study of the variability in 28 spontaneous populations of *Trifolium tomentosum* L.: Relations with factors of the environment of origin. In: Proc. 10th Meeting of the Mediterranean Subnetwork of the FAO-CIHEAM Inter-Regional on Pasture and Fodder Crops, Sassari, Apr 4–9, 2000: 29–32.
- Issolah R., Abdelguerfi A. (2003): Morphological variability within four Algerian populations of the species *Trifolium spumosum* L. In: 25th EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting, Brno, Sept 1–4, 2003: 205–208.
- Jaccard P. (1908): Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223–270.
- Kongkiatngam P., Waterway M.J., Fortin M.G., Coulman B.E. (1995): Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): comparisons of morphological, isozyme and RAPD markers. Euphytica, 84: 237–246.
- Lange O., Schifino-Wittmann M.T. (2000): Isozyme variation in wild and cultivated species of the genus *Trifolium* L. (Leguminosae). Annals of Botany, 86: 339–345.
- Malaviya D.R., Kumar B., Roy A.K., Kaushal P., Tiwari A. (2005): Estimation of variability for isozymes of five enzyme systems among wild and cultivated species of *Trifolium*. Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 967–976.
- Malaviya D.R., Roy A.K., Kaushal P., Kumar B., Tiwari A. (2008): Genetic similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding pattern. Plant Systematics and Evolution, 276: 125–136.
- Mantel N. (1967): The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209–220.
- Paplauskienė V., Dabkevičienė G. (2012): A study of genetic diversity in *Trifolium hybridum* varieties using morphological characters and ISSR markers. Žemdirbystė–Agriculture, 99: 313–318.
- Quezel P., Santa S. (1962): Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris.
- Singh N.K., Shepherd K.W., Cornish G.B. (1991): A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. Journal of Cereal Science, 14: 203–208.
- Smith J.S.C., Smith O.S. (1989): The description and assessment of distances between inbred lines of maize: II. The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctiveness between inbred lines. Maydica, 34: 151–161.
- Statsoft, Inc. (1995): STATISTICA for Windows. Tulsa, StatSoft, Inc. Available at <http://www.statsoftinc.com>
- Stewart P. (1974): Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. Bulletin de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord, 65: 239–248.
- Tucak M., Čupić T., Popović S., Stjepanović M., Gantner R., Meglič V. (2009): Agronomic evaluation and utilization of red clover (*Trifolium pratense* L.) germplasm. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, 37: 206–210.
- Williams W.M., Nichols S.N. (2011): *Trifolium*. In: Kole C. (ed.): Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Clemson, Institute of Nutraceutical Research: 249–272.
- Zohary M., Heller D. (1984): The genus *Trifolium*. Jerusalem, Israel Academy of Sciences and Humanities.
- Zoro Bi I., Maquet A., Wathelet B., Baudoin J.P. (1999): Genetic control of isozymes in the primary gene pool of *Phaseolus lunatus* L. Biotechnologie Agronomie Société et Environnement, 3: 10–27.

Received for publication January 13, 2015

Accepted after corrections May 14, 2015

Corresponding author:

Prof DOUADI KHELIFI, Université Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie; e-mail: dkhelifi@yahoo.fr

Chapitre II

*Variation des albumines et des globulines
au sein et entre des espèces du genre *Trifolium* L.
collectées dans le Nord Algérien.*

Préambule

L'électrophorèse des protéines de réserve des graines, a été utilisée avec succès dans les études d'évolution de diverses cultures, et aussi dans les tentatives de définir les relations entre les espèces dans divers groupes de plantes. Très souvent, le profil des protéines des graines a été trouvé être une caractéristique spécifique de l'espèce. Il a également été constaté qu'une espèce cultivée et son apparentée sauvage partagent le même profil électrophorétique des protéines (Ladizinsky et Hymowitz 1979 ; Valizadeh 2001 ; Mirali *et al.* 2007 ; Hameed *et al.* 2009 ; Emre *et al.* 2010 ; De la Rosa et Gonzalez 2010 ; Emre 2011 ; Ranjan *et al.* 2013).

Si l'on se réfère à la classification d'Osborne (1924), les protéines des légumineuses sont principalement constituées de globulines (60 à 90%), albumines (10 à 20%), prolamines et glutelines. La classe protéique la plus abondante est les globulines. Elles sont classées principalement en deux fractions caractérisées par des coefficients de sédimentation d'environ 7S et 11S. Dans le cas de pois, ces fractions sont nommées viciline et légumine, respectivement, de sorte que les protéines correspondantes des autres graines de légumineuses sont souvent indiquées comme viciline et légumine-like globulines (Duranti *et al.* 2006). Les albumines ont été moins étudiées que les globulines. Cette fraction regroupe la plupart des protéines qui présentent une activité biologique : enzymes, lectines, et inhibiteurs d'enzymes.

Dans la présente étude, les données obtenues par SDS-PAGE des deux fractions albumines et globulines sont utilisés pour évaluer la diversité génétique et les relations taxonomiques dans 14 espèces appartenant à cinq sections du genre *Trifolium* L. Un total de 61 bandes ont été enregistrées pour la fraction albumines avec des poids moléculaires varient de 10.84 à 112.04 kDa, et 56 bandes pour la fraction globulines ayant des poids moléculaires entre 11.61 et 114.54 kDa. La variation intraspécifique la plus élevée a été observée chez *Trifolium campestre* pour les deux fractions protéiques et certaines bandes spécifiques aux espèces ont été observées. Les distances génétiques entre les espèces ont été calculées à l'aide du coefficient de Jaccard. Des dendrogrammes ont été construits selon la méthode agrégative UPGMA en utilisant les données des albumines et des globulines individuellement, ainsi que les données combinées des deux fractions. Ce dernier phénogramme concorde avec celui basé sur les données des globulines, et a montré des consistances avec la délimitation taxonomiques des espèces. La comparaison des espèces par paire en se basant sur l'indice de Jaccard était comprise entre 0,56 et 0,92 avec une moyenne de 0,74, ce qui indique que la collection représente des espèces génétiquement différentes. Les résultats suggèrent que l'utilisation de l'approche combinée des deux fractions protéiques a fournis des données génétiques fiables pour la classification de *Trifolium*. L'analyse électrophorétique des protéines de réserve des graines se sont avérées utiles pour évaluer la diversité génétique, distinguer les espèces et la description de leurs similarités.

1 **Albumin and Globulin variation within and between *Trifolium* species**
2 **from Northern Algeria**

3 Imane MEDOUKALI and Douadi KHELIFI*

4 Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des sciences
5 de la nature et de la vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25 000, Constantine,
6 Algérie.

7 ***Corresponding author:** Prof. Douadi KHELIFI, dkhelifi@yahoo.fr

8 **Submitted in:** Bangladesh Journal of Plant Taxonomy.

9 **Keywords:** Seed storage proteins; electrophoresis; SDS-PAGE; genetic diversity;
10 *Trifolium*; Algeria

11 **Abstract**

12 In the present study, data obtained by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-
13 Polyacrylamide Gel Electrophoresis) analysis of water and salt soluble seed protein
14 fractions (albumins and globulins) are used to assess genetic diversity and taxonomic
15 relationships in fourteen species belonging to five sections of the genus *Trifolium* L.
16 naturally grown in different eco-geographic regions in Northern Algeria. A total of 61
17 bands were recorded for albumin fraction with molecular weight ranging from 10.84 to
18 112.04 kDa, and 56 bands for globulin fraction of molecular weight ranging from 11.61
19 to 114.54 kDa. The highest intraspecific variation was observed in *Trifolium campestre*
20 for both protein fractions and some species-specific bands were identified. Genetic
21 similarity between species was estimated using Jaccard's coefficient, and dendrograms
22 were constructed by the UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic
23 Averages) method using either albumin and globulin results individually or as combined
24 sets of data. The latter species groupings corroborated with globulin dendrogram and
25 showed consistencies with traditional taxonomic species delimitation. The pairwise
26 Jaccard's dissimilarity coefficient ranged between 0.56 and 0.92 with an average of 0.74,
27 indicating that the collection represents genetically diverse species. The results suggested
28 that the use of the combined approach of albumin and globulin fractions gave a reliable
29 genetic data for *Trifolium* taxa. Electrophoretic analysis of seed proteins proved to be

1 useful for assessing genetic diversity, for distinguishing species and describing their
2 similarity.

3 **Introduction**

4 Protein is a primary product of the genetic system, on the basis of this, it can serve
5 as marker of genome. Protein markers as protein phenotype indicate the genome structure
6 and genotype specificity as a whole. The seed proteins are distinguished from other
7 proteins by some characteristics: *i*) they have high accumulation rates in the seed during
8 mid-maturation stage of development; *ii*) they are used up during germination and are
9 synthesized only in the seed and not in other tissues; *iii*) they are deposited mostly in
10 special storage organelles called protein bodies and; *iiii*) they lack any other functional
11 activity (Mirali *et al.*, 2007). Seed proteins are classified according to their solubility
12 either as water-soluble albumin, salt-soluble globulin, alcohol-soluble prolamin and acid-
13 or alkaline-soluble glutelin. Unlike the cereals in which prolamins and glutelins are the
14 major storage proteins, albumins and globulins comprise the major storage proteins of
15 legumes (Osborne, 1924).

16 The most abundant class of storage proteins in grain legumes are the globulins.
17 They are generally classified as 7S and 11S globulins according to their sedimentation
18 coefficients (S). The 7S and 11S globulins of pea are named vicilin and legumin,
19 respectively, so that the corresponding proteins of other legume seeds are often indicated
20 as vicilin-and legumin-like globulins (Duranti *et al.*, 2006). These proteins are also
21 referred to by trivial names; this is the case, for example of, β -conglutin and α -conglutin
22 from *Lupinus* species, conglycinin and glycinin from *Glycine max*, β -vignin and α -vignin
23 from *Vigna unguiculata*, β -lathyrin and α -lathyrin from *Lathyrus sativus*, conarachin,
24 arachin from *Arachis hypogaea*, and medicagin and alfin from *Medicago sativa* (Krochko
25 and Bewley, 1990; Rosa *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2004). Albumin
26 proteins of legumes have been less extensively researched than globulins. This fraction
27 has generally been regarded as the metabolic and enzymatic protein fraction with
28 molecular weight of 6 to 100 kDa (Boulter *et al.*, 1967). Although Murray (1979) has
29 suggested that the albumins might be regarded as storage proteins. Unlike the globulin
30 proteins which are localized in membrane bound proteins (Graham and Gunning,
31 1970), the major albumin fraction is not appreciably degraded during germination

1 (Murray, 1979; Jakubek and Przybylska, 1982) and biochemical evidence indicates
2 that the albumin fraction is cytosolic (Croy *et al.*, 1984).

3 Seed protein electrophoresis has been successfully used in evolutionary studies
4 of various crops and also in attempts to define species relationships in various groups
5 of plants. Very often the seed protein profile has been found to be a species specific trait.
6 It was also found that a cultivated species and its wild progenitor share the same profile
7 pattern (Ladizinsky and Hymowitz, 1979; Valizadeh, 2001; Mirali *et al.*, 2007; Hameed
8 *et al.*, 2009; Emre *et al.*, 2010; De la Rosa and Gonzalez, 2010; Emre, 2011; Ranjan *et*
9 *al.*, 2013).

10 The clover (The *Trifolium* genus) belongs to one of the largest groups in the family
11 Fabaceae. It contains about 255 species (Zohary and Heller, 1984). Many of them are
12 especially agronomically important since have been known for many centuries as forage
13 plants and valuable herbs in folk medicine of various cultures. (*T. pratense* L., *T. repens*
14 L., *T. resupinatum* L., *T. incarnatum* L., *T. hybridum* L., *T. pannonicum* Jacq., *T.*
15 *subterraneum* L., *T. fragiferum* L., and *T. medium* L.). The Mediterranean basin, western
16 North America, and the highlands of eastern Africa are the three geographic regions with
17 the greatest diversity of *Trifolium* species, while no species are native to southeastern
18 Asia and Australia (Ellison *et al.*, 2006). Algeria is one of the Mediterranean countries
19 rich in genetic diversity; it is represented by 37 clover species in its natural flora (Quezel
20 and Santa, 1962). However, there are few reports regarding the inter-relationships of
21 Algerian *Trifolium* species based on works using morphological and agronomic traits
22 (Ghoubay and Abdelguerfi, 1991; Issolah and Abdelguerfi, 2000, 2003).

23 In the present study, data obtained by SDS-PAGE analysis of water and salt soluble
24 seed protein fractions (albumins and globulins) are used to assess genetic diversity and
25 taxonomic relationships in fourteen species belonging to five sections of the genus
26 *Trifolium* L. naturally grown in different eco-geographic regions in Northern Algeria.

27 **Materials and Methods**

28 *Plant material*

29 A set of 149 accessions of the genus *Trifolium* L. representing 14 species (*Trifolium*
30 *angustifolium*, *Trifolium scabrum*, *Trifolium campestre*, *Trifolium pallidum*, *Trifolium*

1 *lappaceum*, *Trifolium squarrosus*, *Trifolium resupinatum*, *Trifolium tomentosum*,
 2 *Trifolium stellatum*, *Trifolium fragiferum*, *Trifolium repens*, *Trifolium spumosum*,
 3 *Trifolium cherleri*, *Trifolium glomeratum*) already studied using morphological and
 4 enzymatic markers (Medoukali *et al.*, 2015) were investigated in this study. This
 5 collection originated from 32 sites representative of the Algerian diversity in eco-
 6 geographical profiles. The major characteristics of each site [altitude (Alt), latitude (Lat),
 7 longitude (Lon)] are detailed in Table 1.

8 **Table 1. Localities of investigated *Trifolium* species**

N°	Localities	Sample size	ALT	LAT	LON
1	Oued Athmenia	4	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
2	Mila east	9	831	36°21'48,77"N	6°19'56,83"E
3	Constantine North	7	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
4	Constantine west	6	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
5	Constantine center	5	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
6	Tipaza	4	203	36°34'48,16"N	2°34'06,74"E
7	Sidi Belabbes	5	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
8	Bouira	6	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
9	Bouira west	4	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
10	Boumerdès	5	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
11	Tizi Ouzou	8	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
12	algeirs center	4	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
13	Mohammadia	7	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
14	algeirs west	7	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
15	Blida	8	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
16	Ain Defla	5	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
17	Relizane	2	49	35°55'35,18"N	0°47'33,24"E
18	Chlef	4	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
19	Medea	9	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
20	Tissemsilt	6	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
21	Guelma	4	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
22	Annaba	10	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
23	Akbou	2	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
24	Tichy	5	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
25	Sétif	1	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E
26	Jijel South	4	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
27	Jijel east	3	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
28	Jijel North	1	9	36°48'56,16"N	5°42'04,92"E
29	Jijel west	3	21	36°47'26,38"N	5°39'46,16"E
30	Oran	2	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
31	oued Righa	4	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
32	filfila	3	159	36°53'11,44"N	7°04'56,50"E

9 ALT (Altitude) ; LAT (Latitude) ; LON (Longitude)

1 *Albumin and Globulin extraction*

2 The sequential extraction process was carried out according to Freitas *et al.* (2000),
3 with small modifications. Mature seeds of each individual were ground with a mortar and
4 pestle at room temperature until a fine powder was obtained. The resulting powder of
5 each sample (10 mg) was defatted with *n*-hexane (0.35 mL) with stirring for 30 min, the
6 hexane was decanted and air-dried after centrifugation of 15 min at 14 000 rpm. The
7 albumin fraction was extracted from the defatted powder by stirring with 0.35 mL
8 distilled water (pH 8) containing 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ and 1 mM
9 phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min at 4°C. The albumin-containing
10 solution was centrifuged at 14 000 rpm, 4°C for 20 min and the supernatant was
11 conserved at 4°C as the albumin fraction. This extraction was repeated twice to eliminate
12 as possible as the remaining albumin fraction. The total globulins were extracted by
13 stirring the pellet with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8, containing 10% (w/v) NaCl, 10 mM
14 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM ethylene glycol bis (β -
15 aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) and 1 mM PMSF for 30 min at
16 4°C. The suspension was centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant
17 contained the globulin fraction.

18 *Gel electrophoresis*

19 Extracted albumin and globulin fractions were precipitated with 1 mL cold acetone
20 (1:4 (v/v)) for 1 h at -20°C and centrifuged at 10 000 rpm for 15 min, then, acetone was
21 decanted and evaporated, and the pellet was suspended in 100 μ L of sample buffer.
22 Nonreducing SDS-PAGE was carried out in 12,5% polyacrylamide resolving gel and 5%
23 polyacrylamide stacking gel according to Singh *et al.* (1991) at 60 V over the night.

24 *Data analysis*

25 Protein bands for each fraction were analyzed as binary characteristics considering
26 all the accessions and then, by pooling up diagrams for various species, i.e., all the bands
27 present in any or all the accessions of a species were considered as the band present for
28 that species. Band frequencies were calculated across all accessions and within each
29 species. Relationship among species was assessed by elaborating a pairwise dissimilarity
30 matrix and UPGMA dendrogram based on Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908). In order

1 to examine the degree of association between Albumin and globulin dissimilarity
2 matrices, Mantel test (Mantel, 1967) based on Pearson's correlation was applied.
3 Statistical analyses were carried out using Xlstat version 2014.5.03 program (Addinsoft,
4 2007).

5 **Results**

6 *Albumin analysis*

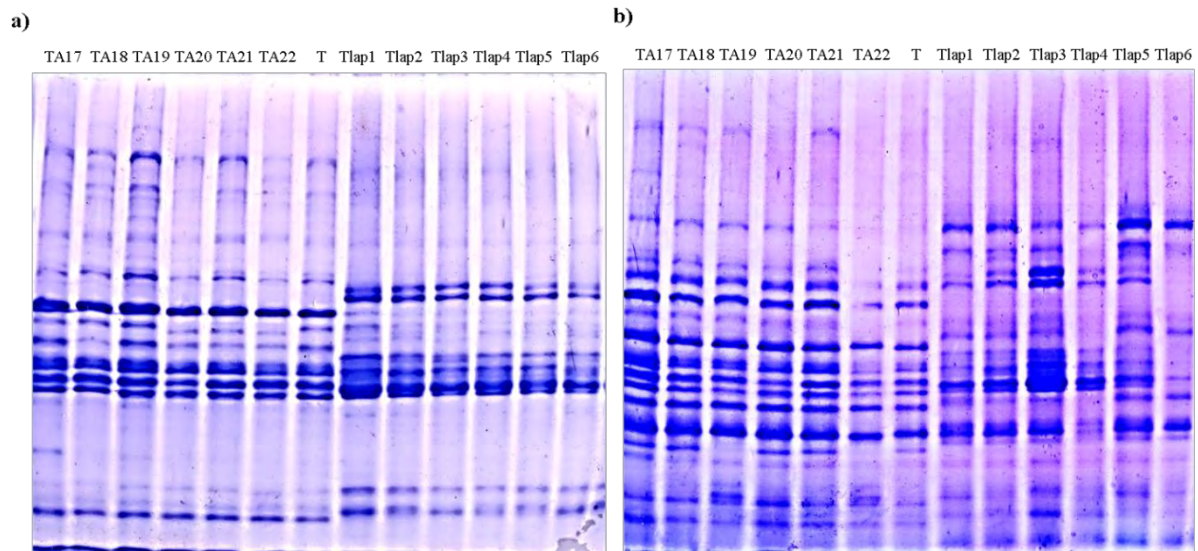
7 Electrophoretic analysis of albumins (Fig. 1a) revealed 61 bands across the 149
8 accessions under investigation, with molecular weight (MW) ranging from 10.84 to
9 112.04 kDa. The most frequent band (MW = 10.84 kDa) characterized 111 accessions
10 with 0.76 frequency, followed by three bands (MW of 22.97, 29.03 and 53.46 kDa) with
11 frequency values of 0.74, 0.73 and 0.69, respectively. Out of these, all other Albumin
12 bands were moderately or modestly present with variable frequencies, which range from
13 0.01 to 0.65 (data not shown).

14 The number of bands varied from one species to another, with the largest number (25) in
15 *T. lappaceum* and *T. stellatum* and the lowest number (12) in *T. glomeratum* (Table 2).
16 No band was present in all species, however, the band having MW of 29.03 kDa was
17 present in 12 species and absent in *T. pallidum* and *T. fragiferum*, followed by bands of
18 MW 23.73 and 10.84 kDa, with frequency value of 0.79. Albumin results revealed that
19 some bands are characteristically constant markers for each species and show the
20 unequivocal identification of their electrophoregrams. Ten species-specific Albumin
21 bands were registered, viz. 3 bands for *T. stellatum*, 2 for *T. lappaceum* and *T. cherleri*
22 and one each for *T. campestre*, *T. squarrosus* and *T. fragiferum*. Other bands were shared
23 by more than one species.

24 Including species represented by more than two accessions, the mean intraspecific
25 polymorphism was evaluated 35.20 %. The highest intraspecific variability was recorded
26 in *T. campestre* with polymorphism percentage of 78.26 %, followed by *T. lappaceum*
27 and *T. resupinatum* with polymorphism percentage of 76 % and 64.71 %, respectively. *T.*
28 *stellatum* was characterized by a moderate polymorphism estimated as 56 %. However,
29 the lowest intraspecific variation was noticed in *T. fragiferum* with polymorphism value

1 of 7.14 %. Conversely, *T. tomentosum* was considered monomorphic for albumin fraction
 2 since no band was polymorphic in this species.

3



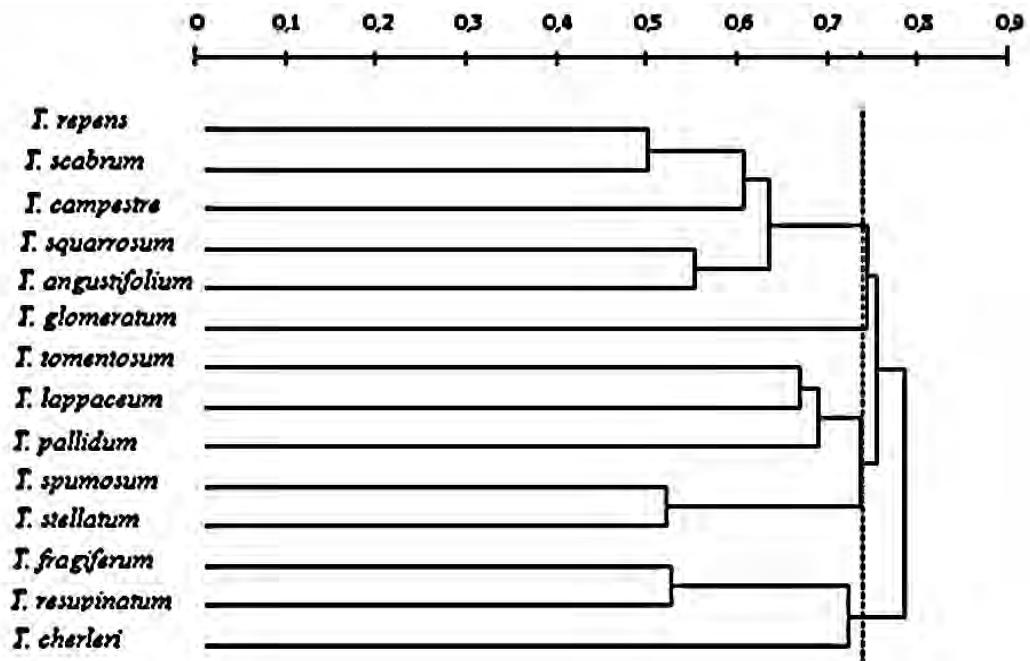
4 Fig. 1. Electrophoretic banding patterns of albumin (a) and globulin (b) fractions in some
 5 accessions of *T. angustifolium* and *T. lappaceum*. TA17 to TA22 = *T. angustifolium*
 6 accessions; Tlap1 to Tlap6 = *T. lappaceum* accessions; T = *T. angustifolium* accession
 7 used as control.

8 **Table 2. Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of**
 9 **polymorphism in each *Trifolium* species in albumin fraction.**

Species	No. of Accessions	No. of bands	No. of specific bands	No. of polymorphic bands	Amount of Polymorphism (%)
<i>T. angustifolium</i>	22	22	0	7	31.82
<i>T. campestre</i>	23	23	1	18	78.26
<i>T. lappaceum</i>	18	25	2	19	76.00
<i>T. scabrum</i>	20	18	0	5	27.78
<i>T. tomentosum</i>	14	19	0	0	0.00
<i>T. resupinatum</i>	10	17	0	11	64.71
<i>T. stellatum</i>	9	25	3	14	56.00
<i>T. squarrosum</i>	8	20	1	6	30.00
<i>T. pallidum</i>	7	20	0	3	15.00
<i>T. cherleri</i>	6	19	2	3	15.79
<i>T. glomeratum</i>	5	12	0	2	16.67
<i>T. fragiferum</i>	4	14	1	1	7.14
<i>T. repens</i>	2	21	0	/	/
<i>T. spumosum</i>	1	15	0	/	/

1

2 The interspecific variability was demonstrated by the topology of the UPGMA
 3 dendrogram based on Jaccard's coefficient (Fig. 2). At $J = 0.74$, four clusters were
 4 formed. Five species (*T. repens*, *T. scabrum*, *T. campestre*, *T. squarrosum* and *T.*
 5 *angustifolium*) representing four sections composed the first cluster at Jaccard's
 6 coefficient 0.63. *T. glomeratum* (sect. *Lotoidea*) characterized the second cluster which
 7 were joined to the first one at $J = 0.74$. The third cluster consisted of five species
 8 belonging to different sections; viz. *Vesicaria* (*T. tomentosum*), *Trifolium* (*T. lappaceum*,
 9 *T. pallidum* and *T. stellatum*) and *Mistyllus* (*T. spumosum*). At $J = 0.72$, the fourth cluster
 10 embodied three species; *T. fragiferum*, *T. resupinatum* representing section *Vesicaria* and
 11 *T. cherleri* representing section *Trifolium*.



12 Fig. 2. Dendrogram illustrating relationships of the studied *Trifolium* species based on
 13 SDS-PAGE albumin data.

14 The interspecific similarity was low, with mean Jaccard's dissimilarity coefficient of
 15 0.74. *T. repens* and *T. scabrum* was the most similar species with Jaccard's coefficient of
 16 0.50, followed by *T. spumosum* and *T. stellatum* ($J = 0.51$) and *T. fragiferum* and *T.*
 17 *resupinatum* ($J = 0.52$). However, the most distant species were *T. fragiferum* and *T.*

1 *glomeratum* with Jaccard's coefficient of 0.96, succeeded by *T. fragiferum* and *T. repens*
2 ($J = 0.87$).

3 *Globulin analysis*

4 The Globulin bands obtained were not identified as legumin-like or vicilin-like
5 globulins; rather, all bands were simply identified by their position in the gels, depending
6 upon their molecular weight. This protein fraction revealed 56 bands with MW ranging
7 from 11.61 to 114.54 kDa (Fig. 1b). Globulin band having MW of 52 kDa was the most
8 common over all the collection since it was present in 116 accessions with frequency
9 value of 0.79; followed by bands of MW 47.51, 60.20 and 87.66 kDa, with frequency
10 values of 0.78, 0.74 and 0.65, respectively. Remaining bands were present with variable
11 frequency values ranging from 0.01 to 0.61 (data not shown).

12 Number of globulin bands per species varied from 8 bands for *T. repens* to 26 bands for *T.*
13 *campestre* (Table 3). Similarly to albumin protein fraction, no band was present in all the
14 species for the globulin fraction too. Nonetheless, the band having MW of 60.20 kDa
15 characterized a set of 12 species with 0.80 frequency, followed by globulin bands with
16 MW of 52, 44.04 and 29.48 kDa that represented 10 accessions each with 0.67 frequency.
17 Seven globulin species-specific bands were recorded. Five species (*T. angustifolium*, *T.*
18 *tomentosum*, *T. resupinatum*, *T. stellatum* and *T. glomeratum*) were represented by one
19 specific band uniquely, however, *T. campestre* was characterized by two specific bands.

20 Generally, all the species displayed more or less intra-specific variation for
21 Globulin banding pattern with an average polymorphism of 37.66 %, excluding *T. repens*
22 and *T. spumosum* which were represented by two and one accession, respectively (Table
23 3). *T. campestre* exhibited the highest genetic diversity with polymorphism value of 76.92
24 %, followed by, *T. lappaceum* and *T. scabrum* with polymorphism values of 71.43 % and
25 65 %, respectively. The lowest intraspecific variation was registered in *T. squarrosum*
26 with polymorphism percentage of 8.33 %, followed by *T. pallidum* (11.76 %).

27

28

29

1 **Table 3. Number of bands, specific bands, polymorphic bands and percentage of**
 2 **polymorphism in each *Trifolium* species in globulin fraction.**

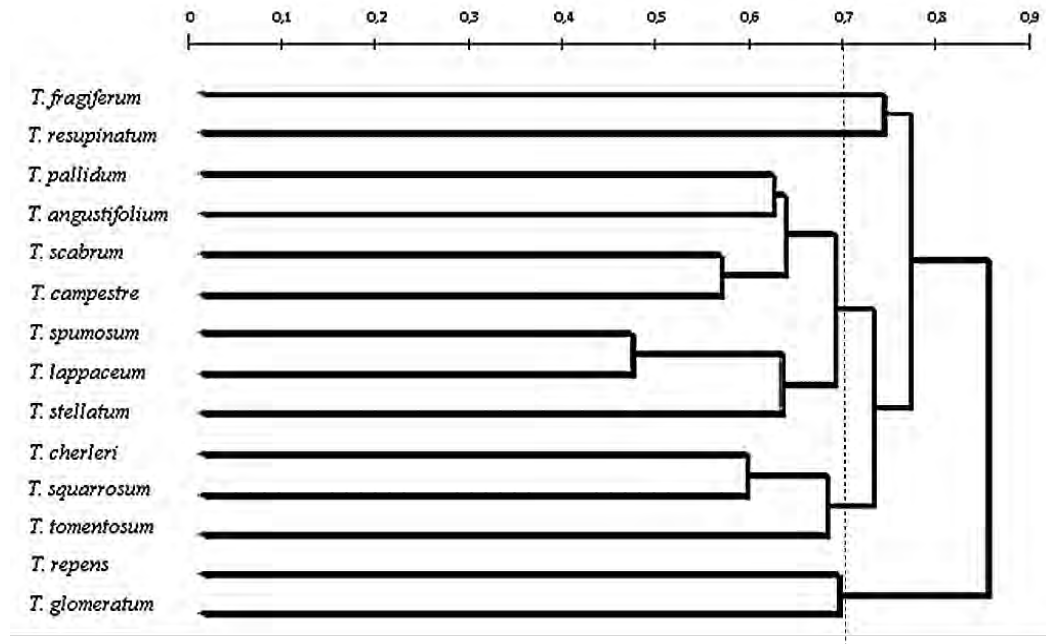
Species	No. of Accessions	No. of bands	No. of specific bands	No. of polymorphic bands	Amount of Polymorphism (%)
<i>T. angustifolium</i>	22	23	1	9	39.13
<i>T. campestre</i>	23	26	2	20	76.92
<i>T. lappaceum</i>	18	14	0	10	71.43
<i>T. scabrum</i>	20	20	0	13	65.00
<i>T. tomentosum</i>	14	18	1	6	33.33
<i>T. resupinatum</i>	10	11	1	5	45.45
<i>T. stellatum</i>	9	24	1	9	37.50
<i>T. squarrosus</i>	8	12	0	1	8.33
<i>T. pallidum</i>	7	17	0	2	11.76
<i>T. cherleri</i>	6	19	0	5	26.32
<i>T. glomeratum</i>	5	9	1	2	22.22
<i>T. fragiferum</i>	4	18	0	4	22.22
<i>T. repens</i>	2	8	0	/	/
<i>T. spumosum</i>	1	12	0	/	/

3

4 The formed UPGMA dendrogram (Fig. 3) from globulin analysis showed that all
 5 species were split into five major clusters at Jaccard's coefficient $J = 0.70$. The two
 6 species *T. fragiferum* and *T. resupinatum* constituted each the first and the second
 7 clusters, respectively. The third cluster grouped seven species, which could be divided
 8 itself into two subclusters at $J = 0.69$; the first subcluster embodied four species belonging
 9 to section *Trifolium* (*T. pallidum*, *T. angustifolium*, *T. scabrum*) and section
 10 *Chronosomium* (*T. campestre*), the second subcluster assembled three species
 11 representing sections; *Mistyllus* (*T. spumosum*) and *Trifolium* (*T. lappaceum* and *T.*
 12 *stellatum*). Three species characterized the fourth cluster at $J = 0.68$, which belong to
 13 section *Trifolium* (*T. cherleri*, *T. squarrosus*) and *vesicatum* (*T. tomentosum*). The fifth
 14 cluster separated *T. repens* and *T. glomeratum* from the other species at Jaccard's
 15 dissimilarity coefficient of 0.85. These latter two species represent the section *Lotoidea*.

16 Pairwise comparison was performed among all studied species. The average Jaccard's
 17 dissimilarity coefficient calculated from globulin data was assessed as $J = 0.75$. *T.*
 18 *spumosum* and *T. lappaceum* were the closest species with Jaccard's coefficient of 0.47,
 19 followed by the two species *T. scabrum* and *T. campestre* ($J = 0.56$). In the other hand,
 20 the highest distance was observed between *T. repens* and *T. stellatum* with Jaccard's

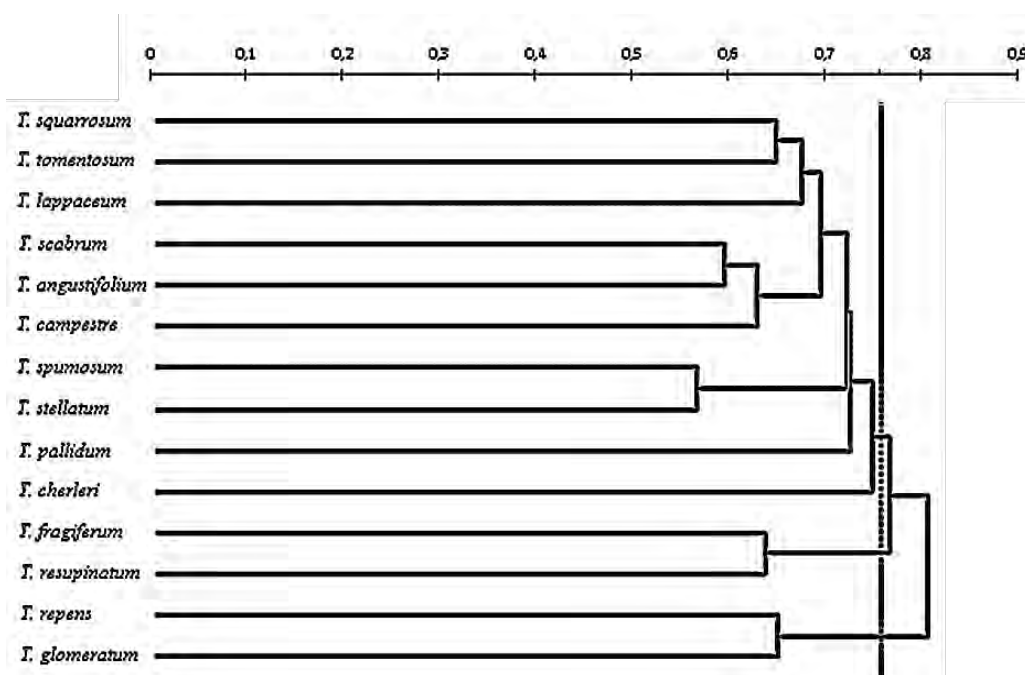
- 1 dissimilarity coefficient of 0.97, followed by *T. repens* and *T. fragiferum* with Jaccard's
 2 coefficient J = 0.96.



3 Fig. 3. Dendrogram illustrating relationships of the studied *Trifolium* species based on
 4 SDS-PAGE globulin data.

5 *Combined UPGMA analysis*

6 The relationships between the examined species, as inferred from the analysis of
 7 the combined data of both albumin and globulin protein fractions, were illustrated by the
 8 dendrogram shown in Figure 4. The species were subdivided into three main clusters at
 9 $J = 0.75$. The first cluster, consisted of 10 species belonging to sections; *Trifolium* (*T.*
 10 *squarrosom*, *T. lappaceum*, *T. scabrum*, *T. angustifolium*, *T. stellatum*, *T. pallidum* and
 11 *T. cherleri*), *Vesicaria* (*T. tomentosum*), *Chronosemium* (*T. campestre*) and *Mityllus* (*T.*
 12 *spumosum*). This cluster linked the second one at $J = 0.76$, which were characterized by
 13 two species of sect. *Vesicaria* (*T. fragiferum* and *T. resupinatum*). The third cluster were
 14 joined to the two others at $J = 0.80$, and represented the section *Lotoidea* by the two
 15 species *T. repens* and *T. glomeratum*. The mean Jaccard's coefficient resulted from the
 16 combination of the two sets of data were estimated as $J = 0.74$, with the lowest distance
 17 was registered between *T. spumosum* and *T. stellatum* ($J = 0.56$) and the highest one was
 18 noted between *T. fragiferum* and *T. glomeratum* ($J = 0.92$).



1

2 Fig. 4. Dendrogram illustrating relationships of the studied *Trifolium* species based on
3 Combined SDS-PAGE albumin and globulin data.

4 *Correlation between albumin and globulin variations*

5 The Mantel test based on Pearson's correlation showed moderate significant
6 correlation ($r = 0.27$, $P = 0.01$, $\alpha = 0.05$) between matrices of Jaccard's standard distances
7 of albumin and globulin data.

8 **Discussion**

9 The analyses of seed proteins using SDS-PAGE revealed that seeds of *Trifolium*
10 are rich in storage proteins which can provide additional criteria for the classification of
11 the species in this genus. This is clearly demonstrated by the large number of stable bands
12 recorded in the electrophoregrams (Fig. 1) produced for albumin (61 bands) and globulin
13 (56 bands) fractions. Such large number of bands reflects the high level of genetic
14 variation within and among the studied species. The highest intraspecific variation was
15 registered in *T. campestre* based on both protein fractions. This species was also found to
16 be heterogeneous in our previous study when analyzing the same collection using
17 isozyme markers (Medoukali *et al.*, 2015). Nevertheless, Electropherograms
18 corresponding to different accessions of the same species that showed high levels of
19 similarity, confirm that seed protein electrophoretic profiles are stable within species,

1 being little affected by environmental factor (Badr, 1995). The more or less intraspecific
2 variability observed among the studied species, might attributed to unequal number of
3 accessions of different species that varied from 23 accessions for *T. campestre* to one
4 accession for *T. spumosum*.

5 In comparison between albumin and globulin fractions, both dendrograms showed
6 low similarity among species, since, the average Jaccard's dissimilarity coefficient was
7 assessed as 0.74 and 0.75 for albumin and globulin variation, respectively. The species
8 analyzed are taxonomically distinct: *T. angustifolium*, *T. scabrum*, *T. lappaceum*, *T.*
9 *pallidum*, *T. squarrosus*, *T. stellatum* and *T. cherleri* belong to different subsections of
10 section *Trifolium*; *T. tomentosum*, *T. fragiferum* and *T. resupinatum* to section *Vesicaria*;
11 *T. glomeratum* and *T. repens* to different subsections of section *Lotoidea*; *T. spumosum*
12 to section *Mistyllus*; and *T. campestre* to section *Chronosemium*, according to Zohary and
13 Heller (1984). Therefore, the low interspecific similarity found supports the classification
14 of the species under study in different sections of the genus *Trifolium*. On the other hand,
15 groupings with such low similarity do not necessarily reflect relationships between the
16 species but may be occasional clustering (Lange and Wittmann, 2000).

17 Interesting information in phenetic analysis were obtained when including both data
18 derived from albumin and globulin fractions (Fig. 4). This combined approach is
19 considered to be more significant, thus gave much more complete information and
20 reliable results than the corresponding trees based on the analysis of each fraction
21 separately (Figs 2-3). Hence, this combined analysis supported many sectional
22 delimitations proposed by Zohary and Heller (1984). The phenetic classification based
23 on globulins revealed congruence with that inferred from the analysis of the combined
24 data; comparing with albumin classification, wherein the species from different sections
25 were mixed in the dendrogram, showing some consistencies and some contradictions to
26 taxonomic criteria (Fig. 2).

27 The combined data resulted in three clusters with low similarity (Fig. 4). The first
28 cluster was the largest and principally characterized by all species of section *Trifolium* at
29 $J = 0.74$, showing large heterogeneity among them. Badr (1995), when studied the
30 relationship between some taxa of the genus *Trifolium* based on seed protein patterns in
31 relation to chromosomal criteria, found that section *Trifolium* was heterogeneous both in

1 seed protein and chromosomal features, clarifying that this section is polymorphic
2 morphologically too, and divided into many different subsections by Zohary and Heller
3 (1984). In this same cluster, three species (*T. tomentosum*, *T. campestre* and *T. spumosum*)
4 of different sections were mixed with those of section *Trifolium*. Malaviya *et al.* (2008)
5 when studied genetic similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding
6 pattern, found that *T. spumosum* clustered with *T. cherleri* and *T. pretense* belonging to
7 section *Trifolium*, and that *Chronosemium* species *T. campestre* was clustered with the
8 *Trifolium* species *T. hirtum* and *T. incarnatum* showing larger affinity between the two
9 sections; reporting that clustering together of species belonging to different sections
10 suggests polyphyletic origin of various sections. Watson *et al.* (2000) have also studied
11 the molecular phylogenetics of the genus and reported that *Chronosemium* is derived from
12 within a section of *Trifolium*, and concluded a polyphyletic origin of *Trifolium*. However,
13 in a recent report, Ellison *et al.* (2006) based on nrDNA and cpDNA marker suggested
14 that the genus has a monophyletic origin in the Mediterranean region. Intermixing of
15 species of two or more than two sections in one cluster in the presented dendrogram can
16 be attributed to the similarity of different species of diverse sections. This also suggests
17 higher degree of variability present among the species belonging to *Trifolium* section and
18 higher variability also indicates polyphyletic origin.

19 Excluding *T. tomentosum* which was clustered with section *Trifolium* species, the
20 remaining section *Vesicaria* members *T. fragiferum* and *T. resupinatum* formed the
21 second cluster displaying relationship between them, in addition, section *Vesicaria* cluster
22 was placed between sections *Lotoidea* and *Trifolium/Chronosemium* clusters. However,
23 Zohary and Heller (1984) recognized section *Vesicaria* as the most “natural group” of the
24 genus *Trifolium* based on its unique and distinctive matured asymmetrical vesicular
25 fruiting calyx including the three mentioned species, and took this section specific calyx
26 features as evidence in favor of the monophyly of section *Vesicaria*. Moreover, in another
27 study (Ellison *et al.*, 2006), these species were found to be close to each other and were
28 grouped under the section *Vesicastrum* of the subgenus *Trifolium*. Similar results were
29 also found concerning members of the section *Vesicaria* (Vizintin *et al.*, 2006).
30 Furthermore, Uslu *et al.* (2013) reported that *T. resupinatum*, *T. physodes*, and *T.*
31 *fragiferum* were found to be genetically close to each other based on RAPD and SSR
32 markers, and similar to our study, they were placed as a separate subgroup between the

1 *Lotoidea* and *Chronosemium* section subclusters. The last species *T. repens* and *T.*
2 *glomeratum* were placed in the third cluster representing section *Lotoidea* (Zohary and
3 Heller, 1984).

4 In conclusion, Algerian *Trifolium* species investigated in this study revealed
5 considerable genetic diversity at intra and interspecific levels, regarding seed albumin
6 and globulin protein fractions. In contrast to albumins, globulin data was strongly
7 correlated with combined data of both albumin and globulin fractions, which had more
8 or less supported the Zohary and Heller (1984) sectional relationships of *Trifolium* taxa.
9 Electrophoretic analysis of seed proteins proved to be useful for assessing genetic
10 diversity, for distinguishing species and describing their similarity. The use of molecular
11 data is strongly recommended in further studies.

12 **References**

- 13 Addinsoft, 2007. XLSTAT, Analyse de données et statistique avec MS Excel. New York,
14 Addinsoft.
- 15 Badr, A. 1995. Electrophoresis studies of seed proteins in relation to chromosomal criteria
16 and species relationships of some taxa of *Trifolium*, *Taxon*. 44: 183-191.
- 17 Boulter, D., Thurman, D.A. and Derbyshire, E. 1967. A disc electrophoretic study of
18 globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics, *New Phytol.* 66:
19 27-33.
- 20 Croy, R.R.D., Hoque, M.S., Gatehouse, J.A. and Boulter, D. 1984. The major albumin
21 proteins from pea (*Pisum sativum* L). Purification and some properties, *Biochem. J.* 218:
22 795-803.
- 23 De la Rosa, L. and Gonzalez, J.M. 2010. The genetic diversity associated with seed
24 proteins in a collection of Spanish underground vetches (*Vicia sativa* L. subsp.
25 *amphicarpa* (Dorthe) Asch. et Graebn.), *Genet. Resour. Crop. Ev.* 57: 565-573.
- 26 Duranti, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties, *Fitoterapia.* 77: 67-
27 82.

- 1 Ellison, N.W., Liston, A., Steiner, J.J., Williams, W.M. and Taylor N.L. 2006. Molecular
2 phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*– Leguminosae), Mol. Phylogenet. Evol. 39:
3 688-705.
- 4 Emre, I. 2011. Determination of genetic diversity in the *Vicia* L. (section *Vicia*) by using
5 SDS-PAGE, Pak. J. Bot. 43(3): 1429-1432.
- 6 Emre, I., Turgut-Balık, D., Genç, H. and Şahin, A. 2010. Total seed storage protein
7 patterns of some *Lathyrus* species growing in Turkey using SDS-PAGE, Pak. J. Bot.
8 42(5): 3157-3163.
- 9 Ferreira, R.B., Freitas, R.L. and Teixeira, A.R. 2003. The structure of *Lupinus* seed
10 storage proteins. Recent developments, Curr. Top. Plant. Biol. 4: 139-150.
- 11 Freitas, R.L., Ferreira, R.B. and Teixeira, A.R. 2000. Use of a single method in the
12 extraction of the seed storage globulins from several legume species. Application to
13 analyze structural comparisons within the major classes of globulins, Int. J. Food. Sci.
14 Nutr. 51: 341-352.
- 15 Freitas, R.L., Teixeira, A.R. and Ferreira, R.B. 2004. Characterization of the proteins
16 from *Vigna unguiculata* seeds, J. Agr. Food. Chem. 52: 1682-1687.
- 17 Ghoubay, A. and Abdelguerfi, A. 1991. Spontaneous species of the genus *Trifolium* L. in
18 Algeria: Comparison of seeds and inflorescences in thirteen clovers, Proc. 4th Int.
19 Rangeland Congr., Montpellier, Apr 22-26. Pp. 375-376.
- 20 Graham, T.A. and Gunning, B.E.S. 1970. The localization of legumin and vicilin in bean
21 cotyledon cells using fluorescent antibodies, Nature. 228: 81-82.
- 22 Hameed, A., Shah, T.M., Atta, B.M., Iqbal, N., Haq, M.A. and Ali, H. 2009. Comparative
23 seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes, Pak. J. Bot. 41(2): 703-710.
- 24 Issolah, R. and Abdelguerfi, A. 2000. Study of the variability in 28 spontaneous
25 populations of *Trifolium tomentosum* L.: Relations with factors of the environment of
26 origin, Proc. 10th Meeting of the Mediterranean Subnetwork of the FAO-CIHEAM Inter-
27 Regional on Pasture and Fodder Crops. Sassari, Apr 4-9. pp. 29-32.

- 1 Issolah, R. and Abdelguerfi, A. 2003. Morphological variability within four Algerian
2 populations of the species *Trifolium spumosum* L., 25th EUCARPIA Fodder Crops and
3 Amenity Grasses Section Meeting. Brno, Sept 1-4. pp. 205-208.
- 4 Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe
5 Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223-270.
- 6 Jakubek, M. and Przybylska, J. 1982. Changes of electrophoretic albumin patterns in
7 germinating seed of five different Pisurn lines. Pisum. Genet. Assoc. Pisum. Newsl. 14:
8 26-28.
- 9 Krochko, J.E. and Bewley, J.D. 1990. Identification and characterization of the seed
10 storage proteins from alfalfa (*Medicago sativa*), J. Exp. Bot. 41: 505-514.
- 11 Ladizinsky, G. and Hymowitz, T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and
12 evolutionary studies, Theor. Appl. Genet. 54: 145-151.
- 13 Lange, O. and Schifino-Wittmann, M.T. 2000. Isozyme variation in wild and cultivated
14 species of the genus *Trifolium* L. (Leguminosae), Ann. Bot. 86: 339-345.
- 15 Malaviya, D.R., Roy, A.K., Kaushal, P., Kumar, B. and Tiwari, A. 2008. Genetic
16 similarity among *Trifolium* species based on isozyme banding pattern, Plant. Syst. Evol.
17 276: 125-136.
- 18 Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression
19 approach, Cancer. Res. 27: 209-220.
- 20 Medoukali, I., Bellil, I. and Khelifi, D. 2015. Evaluation of genetic variability in Algerian
21 clover (*Trifolium* L.) based on morphological and isozyme markers, Czech. J. Genet.
22 Plant. Breed. 51: 50-61.
- 23 Mirali, N., El-Khoury, S. and Rizq, F., 2007. Genetic diversity and relationships in some
24 *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins, Biol. Plantarum. 51(4): 660-
25 666.
- 26 Murray, D.R. 1979. A storage role for albumin in pea cotyledons, Plant. Cell. Environ. 2:
27 221-226.
- 28 Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins. Longmans. Green & Co, London. pp. 1-156.

- 1 Quezel, P. and Santa, S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques
2 méridionales. CNRS, Paris. pp.1-1170
- 3 Ranjan, S. Poosapati, A. Vardhan, H.B.V. and Matcha, R. 2013. Seed storage protein
4 profile of few leguminous grains grown in india using SDS-PAGE, Int. J. Adv.
5 Biotechnol. Res. 4: 505-510.
- 6 Rosa, M.J.S., Ferreira, R.B. and Teixeira, A.R. 2000. Storage proteins from *Lathyrus*
7 *sativus* seeds, J. Agr. Food. Chem. 48: 5432-5439.
- 8 Singh, N.K., Shepherd, K.W. and Cornish, G.B. 1991. A simplified SDS-PAGE
9 procedure for separating LMW subunits of glutenin, J. Cereal. Sci. 14: 203-208.
- 10 Uslu, E., Ertuğrul, G.D. and Babaç, M.T. 2013. Assessment of genetic diversity in
11 naturally growing 29 *Trifolium* L. taxa from Bolu Province using RAPD and SSR
12 markers, Turk. J. Biol. 37: 479-490.
- 13 Valizadeh, M. 2001. Seed Storage Protein Profile of Grain Legumes Grown in Iran, Using
14 SDS-PAGE, J. Agric. Sci. Technol. 3: 287-292.
- 15 Vizintin, L., Javornik, B. and Bohanec, B. 2006. Genetic characterization of selected
16 *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis,
17 Plant. Sci. 170: 859-866.
- 18 Watson, L.E., Sayed-Ahmed, H. and Badr, A. 2000. Molecular phylogeny of Old World
19 *Trifolium* (Fabaceae), based on plastid and nuclear markers, Plant. Syst. Evol. 224:153-
20 171.
- 21 Zohary, M. and Heller, D. 1984. The genus *Trifolium*. Israel Academy of Sciences and
22 Humanities. Jerusalem. pp. 1-606.

Synthèse
et
Conclusion générale

Nous rappelons que la démarche entreprise a été basée sur plusieurs approches morphologiques, enzymatiques, protéiques et moléculaires, pour une meilleure compréhension et valorisation de la diversité génétique au sein des populations naturelles des deux genres *Medicago* et *Trifolium*.

Cette synthèse est articulée sur les caractéristiques des populations, leur différenciation génétique, les relations entre les espèces et la corrélation entre les différents marqueurs utilisés pour les deux genres *Medicago* et *Trifolium*.

I. Le genre *Medicago* en Algérie

Les populations échantillonnées correspondent à 169 accessions appartenant à 14 espèces du genre *Medicago* (*M. truncatula*, *M. polymorpha*, *M. ciliaris*, *M. orbicularis*, *M. minima*, *M. murex*, *M. italica*, *M. littoralis*, *M. intertexta*, *M. rigidula*, *M. lupulina*, *M. sativa*, *M. arborea* et *M. arabica*) dont une espèce (*M. polymorpha*) est représentée par deux variétés (*vulgaris* et *polymorpha*). Ce matériel d'étude provient de récoltes personnelles effectuées dans le Nord Algérien au cours de plusieurs campagnes de prospection. Nous avons tenu à effectuer un échantillonnage le plus large possible et le plus représentatif du gradient de variation éco-géographique et de son étendue (annexe 1).

I.1. Diversité morphologique

La diversité morphologique a été analysée sur 130 accessions et 13 taxons, à travers 12 caractères biométriques liés aux graines, aux gousses et aux cotylédons ainsi que neuf propriétés physiques des grains. Compte tenu du nombre des accessions étudiées, les analyses sont basées sur les moyennes de chaque caractère mesuré pour chaque accession. Ces valeurs sont données en annexes 3 et 4. Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées. La majorité des caractères biométriques et propriétés physiques ont contribué à la discrimination des espèces étudiées, où, les trois premières composantes cumulent 76.47% de la variation totale pour les caractères biométriques et 96.13% pour les propriétés physiques. Les meilleurs caractères discriminants sont par ordre décroissant : la taille des cotylédons, le nombre de graines par gousse, la sphéricité des graines, le poids de 1000 grains et la taille des graines. Ces caractères ont subdivisé les espèces en deux groupes : un groupe incluant les espèces avec des valeurs élevées de caractéristiques morphologiques (*M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. rigidula*, *M. murex*, *M. arborea* et *M. italica*) et un second

groupe incluant les espèces caractérisées par des valeurs de caractéristiques morphologiques intermédiaires à faibles (*M. truncatula*, *M. polymorpha*, *M. minima*, *M. littoralis* et *M. sativa*).

Le nombre de graines par gousse et la sphéricité des graines ont fortement contribué à la formation du premier axe, et ont permis de distinguer *M. orbicularis* et *M. lupulina* des autres espèces. En effet, ces deux espèces produisent des graines plus ou moins sphériques en comparaison avec les autres espèces ; et il est connu que *M. orbicularis* est caractérisée par un nombre élevé de graines par gousse, tandis que *M. lupulina* est caractérisée par une seule graine par gousse (Lesins et Lesins 1979). Une autre caractéristique avec une grande contribution à la formation de la troisième composante principale était le poids de 1000 grains, qui a réuni les espèces possédant de grandes graines comme *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. murex* and *M. rigidula*. Lesins et Lesins (1979) ont noté la relation entre ces caractères en rapportant que le poids de 1000 grains donne une idée sur la taille des graines.

Les caractères utilisés en biométrie sont essentiellement polygéniques et concernent des niveaux phénotypiques complexes accessibles aux influences du milieu, ainsi qu'à la sélection. Ainsi, les caractères biométriques, surtout s'ils sont en petit nombre et ne concernent que peu d'aspects du développement, comme c'est le cas ici, peuvent fournir des indications sur la diversité des milieux colonisés et sur les pressions de sélection auxquelles sont soumises les espèces étudiées.

I.2. Diversités biochimique et moléculaire

Les approches biochimiques et moléculaires utilisées, ont toutes montré une importante diversité génétique intraspécifique. Cela n'a rien d'étonnant, car les espèces annuelles du genre *Medicago* sont autogames et il est bien connu que l'autogamie diminue le flux de gènes et par conséquent, les populations divergent et finissent par subir une différenciation adaptative aux conditions écologiques locales et régionales (Charlesworth 2003). Les deux variétés de *M. polymorpha* (var. *polymorpha* et var. *vulgaris*) se distinguent par une forte divergence intraspécifique vis-à-vis des autres espèces étudiées quelque soit le marqueur considéré. Bullitta *et al.* (1994) a suggéré que le niveau élevé d'autogamie dans cette espèce engendre de fortes différenciations des profils génétiques entre les populations.

Les marqueurs avec un large nombre de bandes sont plus informatifs dans l'étude des populations. Les populations Algériennes du genre *Medicago* considérées dans ce travail,

sont caractérisées par 32 allozymes. L'évaluation a montré une grande variabilité pour les estérases qui ont révélé 22 bandes réparties en 4 loci produisant 71 phénotypes. Une plus faible variabilité a caractérisé la glutamate oxaloacétate transaminase avec 10 bandes localisées dans deux zones d'activité bien distinctes engendrant 21 phénotypes. L'analyse protéique a démontré la richesse des espèces du genre *Medicago* en protéines et leur grande variabilité, avec 67 et 92 bandes pour les fractions albumines et globulines, respectivement. En ce qui concerne les microsatellites, les deux amorces analysées (AFctt1 et AFct32) ont permis d'identifier une grande diversité génétique. Un total de 37 bandes a été recensé, avec 21 et 16 bandes pour AFctt1 et AFct32, respectivement. Ce résultat était prévisible vu le taux élevé de mutations qui caractérise les marqueurs microsatellites, ce qui généralement révèle un assez grand polymorphisme (Ronfort *et al.* 2006).

L'importance des marqueurs biochimiques et moléculaires est démontrée par la topologie des dendrogrammes issus de chaque marqueur. Les coefficients de dissimilarité de Jaccard basés sur la variation enzymatique, varient de 0.18 à 0.59 avec une moyenne de 0.37. Quant aux protéines, les coefficients de Jaccard s'étendent de 0.39 à 0.94 avec une moyenne de 0.67 pour les albumines et de 0.55 à 0.91 avec une moyenne de 0.75 pour les globulines. Du point de vue moléculaire (SSR), ils varient de 0.00 à 0,80 avec une moyenne de 0.53. Ces fluctuations des coefficients reflètent le grand polymorphisme entre les taxons étudiés. Selon Small et Jomphe (1989), Les espèces du genre *Medicago* incluses dans cette étude représentent principalement la section *Spirocarpos ser.* avec 10 espèces (*M. truncatula*, *M. littoralis*, *M. italica*, *M. murex* et *M. rigidula* appartiennent à la sous-section *Pachyspireae*; *M. polymorpha*, *M. minima* et *M. arabica* à la sous-section *Leptospireae* et *M. ciliaris*, *M. intertexta* à la sous-section *Intertextae*) et quatre sections représentée chacune par une seule espèce: *Medicago* (*M. sativa*), *Dendrotelis* (*M. arborea*), *Orbiculares Urb.* (*M. orbicularis*) and *Lupularia ser.* (*M. lupulina*). Par conséquent, les faibles similarités interspécifiques enregistrées peuvent être dues au fait que les espèces étudiées appartiennent à différentes sections et sous-sections du genre *Medicago*. D'un autre côté, l'agrégation des espèces avec des faibles similarités ne reflète pas forcément des relations entre les espèces, mais peut être un groupement occasionnel.

La similarité entre des espèces appartenant à la même section indique leur origine commune. En fonction de la diversité des microsatellites par exemple, les deux espèces *M. rigidula* et *M. italica* appartenant à la sous-section *Pachyspireae* de la section *Spirocarpos ser.*, sont caractérisées par des profils électrophorétiques similaires. Cependant, bien qu'elles

appartiennent à la sous-section *Leptospireae* de la section *Spirocarpos*, *M. p. var. vulgaris* et *M. arabica* ont montré la plus grande distance entre elles. Nos résultats sont plus ou moins conformes aux données classiques basées sur des critères morphologiques (Small et Jomphe 1989) et moléculaires (Steele *et al.* 2010) sur le genre *Medicago*.

Finalement, des tests de Mantel ont été réalisés dans l'objectif d'estimer le degré d'association entre les distances génétiques dérivées par les différents marqueurs biochimiques et moléculaires utilisés. La signification du degré de corrélation est estimée par la valeur p calculée après 1000 permutations aléatoires en utilisant le programme Xlstat. Comme il est déjà montré dans le chapitre II de la deuxième partie, les deux fractions albumines et globulines ont été caractérisées par une forte corrélation significative entre elles ($r = 0.49$, $P < 0.0001$), suggérant que les deux fractions protéiques donnent des estimations proches des relations génétiques entre les populations. En revanche, le test de Mantel de ces deux fractions réalisé avec les marqueurs enzymatiques et microsatellites, est fondé sur l'hypothèse nulle, c'est-à-dire sur l'absence d'association entre les matrices de distances générées par chaque marqueur. Les coefficients normalisés de Mantel et les probabilités de chaque test sont: ($r = 0.16$, $p = 0.10$) entre enzymes et albumines, ($r = 0.15$, $p = 0.13$) entre enzymes et globulines, ($r = 0.18$, $p = 0.06$) entre SSR et albumines et ($r = 0.16$, $p = 0.09$) entre SSR et globulines. La corrélation entre les marqueurs enzymatiques et les microsatellites reste faible ($r = 0.11$) et le test de Mantel n'est pas significatif ($p = 0.26$).

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence de corrélation entre ces marqueurs biochimiques et moléculaires. La faible relation entre les variations, protéique et enzymatique, peut être due au fait que seul un nombre limité d'enzymes peut être détecté par électrophorèse, tandis que la variation protéique inclut toutes les protéines solubles qui peuvent être séparées par électrophorèse (dans notre cas, 67 et 92 bandes pour les albumines et les globulines, respectivement). Des études qui ont comparé les marqueurs moléculaires et biochimiques, ont établi des corrélations significatives (Kongkiatngam *et al.* 1995 ; Zivkovic *et al.* 2012). Cependant, dans d'autres travaux, aucune corrélation n'a été trouvée entre ces deux types de marqueurs (Jenczewski *et al.* 1999 ; Dias *et al.* 2008). Cette absence de corrélation peut être associée à la nature du marqueur. Les marqueurs moléculaires sont réputés neutres et révèlent un polymorphisme dans les régions non-codantes du génome, tandis que le polymorphisme révélé par les marqueurs biochimiques est estimé à partir des régions codantes qui sont peut être protégées pour maintenir leurs fonctions biochimiques (Gottlieb 1982).

II. Le genre *Trifolium* en Algérie

L'étude de la diversité génétique du genre *Trifolium* L. a porté sur 157 accessions appartenant à 14 espèces (*T. angustifolium*, *T. scabrum*, *T. campestre*, *T. pallidum*, *T. lappaceum*, *T. squarrosum*, *T. resupinatum*, *T. tomentosum*, *T. stellatum*, *T. fragiferum*, *T. repens*, *T. spumosum*, *T. cherleri* et *T. glomeratum*). Ce matériel d'étude provient de récoltes personnelles effectuées dans le Nord Algérien au cours de plusieurs campagnes de prospections. Nous avons tenu à effectuer un échantillonnage le plus large possible et le plus représentatif du gradient de variation éco-géographique et de son étendue (annexe 2).

II.1. Diversité morphologique

L'analyse de la variabilité morphologique a été réalisée sur la base de 10 caractères biométriques associés aux infrutescences, aux gousses et aux graines. L'analyse de la variance montre que le caractère nombre de gousses par infrutescence a été le plus variable avec un coefficient de variation de 45.03%, suivi par le nombre de graines par infrutescence et la longueur d'infrutescence avec 33.04% et 17.25%, respectivement.

L'analyse en composantes principales met en relief la grande contribution des caractères biométriques dans la différenciation des populations, avec une variation totale de 86.60%. En effet, l'importance des deux caractères nombre de gousses par infrutescence et le nombre de graines par infrutescence, a été confirmée par leurs grandes contributions à la formation de la première et de la deuxième composante principale. Les autres caractères ont montré des corrélations relatives entre eux et forment essentiellement la première composante principale, à l'exception du nombre de graines par gousse qui contribue de manière significative à la formation de la troisième composante principale et sépare l'espèce *T. spumosum* qui est caractérisée par la présence de plusieurs graines dans chaque gousse des autres espèces.

Une étude morphologique menée sur sept espèces de trèfle a montré l'importance des caractères biométriques (largeur des infrutescences, poids de 1000 grains, poids des infrutescences, nombre de gousses par infrutescence et le nombre de graines par infrutescence) en comparaison avec les caractéristiques de floraison et du développement végétatif (Issolah 1997).

II.2. Diversité biochimique

Les approches enzymatiques et protéiques ont montré une grande diversité génétique au sein et entre les espèces du genre *Trifolium*. Les deux systèmes enzymatiques étudiés ont généré 51 bandes et 113 phénotypes. Les estérases ont donné 32 bandes réparties en 5 loci produisant 83 phénotypes. Par conséquent, ce système enzymatique s'est avéré plus polymorphe que la glutamate oxaloacétate transaminase, qui a généré 19 bandes localisées dans deux zones d'activité bien distinctes produisant 30 phénotypes. La grande variabilité des estérases par rapport aux autres systèmes enzymatiques a été confirmée dans plusieurs recherches (Lange et Schiffino-Wittmann 2000; Malaviya *et al.* 2005). Au niveau des protéines, un nombre élevé de bandes a été enregistré pour les albumines (61 bandes) et les globulines (56 bandes). Ce grand nombre de bandes et de phénotypes reflète un niveau élevé de variation génétique au sein de cette collection. L'espèce *T. campestre* a été caractérisée par la diversité génétique intraspécifique la plus élevée soit des points de vues enzymatique (PIC = 0.61) ou protéique (78.26% et 76.92% de polymorphisme pour les albumines et les globulines, respectivement).

L'importance de la diversité interspécifique par les marqueurs enzymatiques et protéiques a été démontrée par la topologie des dendrogrammes issues de chaque marqueur. Les coefficients de dissimilarité de Jaccard basés sur la variation enzymatique, varient de 0.10 à 0.60 avec une moyenne de 0.31. Quant aux protéines, les coefficients de Jaccard s'étendent de 0.50 à 0.96 avec une moyenne de 0.74 pour les albumines et de 0.47 à 0.97 avec une moyenne de 0.75 pour les globulines. Ces fluctuations des coefficients reflètent le taux élevé de polymorphisme entre les espèces de trèfle considérées dans cette étude. D'après Zohary et Heller (1984), ces espèces sont taxonomiquement distinctes : *T. angustifolium*, *T. scabrum*, *T. lappaceum*, *T. pallidum*, *T. squarrosum*, *T. stellatum* et *T. cherleri* appartiennent à différentes sous-sections de la section *Trifolium* ; *T. tomentosum*, *T. fragiferum* et *T. resupinatum* font partie de la section *Vesicaria* ; *T. glomeratum* et *T. repens* appartiennent à différentes sous-sections de la section *Lotoidea* ; *T. spumosum* à la section *Mistyllus*; et *T. campestre* à la section *Chronosemium*. Par conséquent, les faibles similarités interspécifiques enregistrées peuvent être dues au fait que les espèces étudiées appartiennent aux différentes sections et sous-sections du genre *Trifolium*.

Une information beaucoup plus complète et des résultats plus fiables ont été obtenus, lorsque les données issues des deux fractions protéiques (albumines et globulines) ont été

combinées. En effet, cette approche a plus ou moins montré une hiérarchisation des espèces selon leur appartenance taxonomique. Cette hiérarchisation est conforme avec la classification phénétique basée sur les globulines. Par contre, selon la classification des espèces basée sur les albumines et les enzymes, les espèces de différentes sections ont été mélangées dans le dendrogramme, montrant quelques consistances et quelques contradictions avec les critères taxonomiques.

Ceci est confirmé par le test de Mantel, qui a été réalisé dans l'objectif d'estimer le degré d'association entre les distances génétiques dérivées par les différents marqueurs biochimiques. Une corrélation modérée mais significative ($r = 0.27$, $P = 0.01$) a caractérisé les deux fractions protéiques. En revanche, la variation enzymatique a été significativement corrélée avec les albumines ($r = 0.22$, $p = 0.03$), mais aucune corrélation ($r = 0.01$, $p = 0.87$) n'a été enregistrée avec les globulines.

Ce travail de caractérisation génétique n'est pas une fin en soi. Il n'est qu'un début et complément pour des recherches qui vont dans le sens de la valorisation des ressources génétiques des espèces appartenant aux genres *Medicago* et *Trifolium*. Des études complémentaires basées sur d'autres marqueurs (cytogénétiques, morphologiques, moléculaires,...) seront intéressantes pour enrichir ce travail.

Les données fournies par les marqueurs utilisés dans cette étude sont parfois contradictoires. Il serait nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de caractères de chaque marqueur et de les appliquer à un plus grand nombre d'espèces, recouvrant l'ensemble des sections représentant les deux genres en Algérie, afin d'avoir des précisions sur les relations évolutives des espèces.

ANNEXES

ANNEXE 1. Listing des populations du genre *Medicago* collectées en Algérie

N°	GENRE	ESPECE	REGION	Provenance	ALT	LAT	LON
M1	Medicago	truncatula	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
M2	Medicago	polymorpha	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
M3	Medicago	ciliaris	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
M4	Medicago	orbicularis	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
M5	Medicago	arabica	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
M6	Medicago	truncatula	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
M7	Medicago	polymorpha	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
M8	Medicago	ciliaris	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
M9	Medicago	murex	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
M10	Medicago	truncatula	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
M11	Medicago	polymorpha	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
M12	Medicago	ciliaris	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
M13	Medicago	orbicularis	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
M14	Medicago	murex	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
M15	Medicago	hispida	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
M16	Medicago	minima	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
M17	Medicago	orbicularis	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
M18	Medicago	truncatula	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
M19	Medicago	polymorpha	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
M20	Medicago	murex	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
M21	Medicago	hispida	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
M22	Medicago	ciliaris	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M23	Medicago	orbicularis	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M24	Medicago	truncatula	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M25	Medicago	polymorpha	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M26	Medicago	murex	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M27	Medicago	hispida	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M28	Medicago	ciliaris	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
M29	Medicago	sativa	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E
M30	Medicago	truncatula	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E
M31	Medicago	polymorpha	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E
M32	Medicago	truncatula	Oum Bouaghi	Ouled hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E
M33	Medicago	polymorpha	Oum Bouaghi	Ouled hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E
M34	Medicago	truncatula	Oum Bouaghi	Ain fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E
M35	Medicago	polymorpha	Oum Bouaghi	Ain fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E
M36	Medicago	minima	Oum Bouaghi	Ain fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E
M37	Medicago	orbicularis	Oum Bouaghi	Ain fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E
M38	Medicago	orbicularis	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M39	Medicago	truncatula	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M40	Medicago	hispida	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M41	Medicago	minima	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M42	Medicago	littoralis	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M43	Medicago	italica	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M44	Medicago	italica	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E
M45	Medicago	rigidula	Bourdj bouarridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
M46	Medicago	truncatula	Bourdj bouarridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
M47	Medicago	minima	Bourdj bouarridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
M48	Medicago	orbicularis	Bourdj bouarridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
M49	Medicago	polymorpha	Bourdj bouarridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E
M50	Medicago	truncatula	Bourdj bouarridj	Mansoura	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E
M51	Medicago	rigidula	Bourdj bouarridj	Mansoura	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E
M52	Medicago	truncatula	Bourdj bouarridj	Air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E
M53	Medicago	rigidula	Bourdj bouarridj	Air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E
M54	Medicago	polymorpha	Bourdj bouarridj	Air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E
M55	Medicago	minima	Bourdj bouarridj	Air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E
M56	Medicago	truncatula	Bourdj bouarridj	Achir	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E

M57	Medicago	ciliaris	Sidi Belabbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
M58	Medicago	orbicularis	Sidi Belabbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
M59	Medicago	hispida	Sidi Belabbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
M60	Medicago	orbicularis	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
M61	Medicago	polymorpha	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
M62	Medicago	hispida	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
M63	Medicago	murex	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
M64	Medicago	truncatula	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
M65	Medicago	polymorpha	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
M66	Medicago	ciliaris	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
M67	Medicago	intertexta	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
M68	Medicago	truncatula	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
M69	Medicago	hispida	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
M70	Medicago	polymorpha	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
M71	Medicago	hispida	Boumerdès	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
M72	Medicago	hispida	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
M73	Medicago	ciliaris	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
M74	Medicago	lupulina	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
M75	Medicago	hispida	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
M76	Medicago	truncatula	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
M77	Medicago	hispida	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
M78	Medicago	ciliaris	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
M79	Medicago	orbicularis	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
M80	Medicago	littoralis	Alger	Sidi fredj	1	36°45'41,62"N	2°50'47,66"E
M81	Medicago	italica	Alger	Sidi fredj	1	36°45'41,62"N	2°50'47,66"E
M82	Medicago	truncatula	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
M83	Medicago	hispida	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
M84	Medicago	minima	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
M85	Medicago	murex	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
M86	Medicago	orbicularis	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
M87	Medicago	truncatula	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
M88	Medicago	ciliaris	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
M89	Medicago	hispida	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
M90	Medicago	polymorpha	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
M91	Medicago	littoralis	Mostaganem	-	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E
M92	Medicago	hispida	Mostaganem	-	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E
M93	Medicago	minima	Mostaganem	-	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E
M94	Medicago	polymorpha	Mostaganem	-	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E
M95	Medicago	truncatula	Ain Defla	Khmis meliana	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E
M96	Medicago	polymorpha	Ain Defla	Khmis meliana	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E
M97	Medicago	ciliaris	Ain Defla	Khmis meliana	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E
M98	Medicago	hispida	Ain Defla	Khmis meliana	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E
M99	Medicago	ciliaris	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M100	Medicago	truncatula	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M101	Medicago	murex	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M102	Medicago	hispida	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M103	Medicago	minima	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M104	Medicago	Polymorpha'	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M105	Medicago	polymorpha	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M106	Medicago	italica	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M107	Medicago	orbicularis	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
M108	Medicago	ciliaris	Ain Defla	3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E
M109	Medicago	hispida	Ain Defla	3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E
M110	Medicago	polymorpha	Ain Defla	3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E
M111	Medicago	ciliaris	Relizane	-	58	35°56'37,06"N	0°51'00,37"E
M112	Medicago	hispida	Relizane	-	49	35°55'35,18"N	0°47'33,24"E
M113	Medicago	minima	Relizane	-	49	35°55'35,18"N	0°47'33,24"E
M114	Medicago	ciliaris	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
M115	Medicago	polymorpha	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E

M116	Medicago	truncatula	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
M117	Medicago	murex	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
M118	Medicago	hispida	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
M119	Medicago	ciliaris	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O
M120	Medicago	hispida	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O
M121	Medicago	truncatula	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O
M122	Medicago	polymorpha	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O
M123	Medicago	ciliaris	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M124	Medicago	orbicularis	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M125	Medicago	truncatula	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M126	Medicago	murex	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M127	Medicago	minima	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M128	Medicago	polymorpha	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M129	Medicago	hispida	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
M130	Medicago	truncatula	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
M131	Medicago	minima	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
M132	Medicago	ciliaris	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
M133	Medicago	polymorpha	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
M134	Medicago	murex	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
M135	Medicago	hispida	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
M136	Medicago	murex	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
M137	Medicago	ciliaris	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
M138	Medicago	truncatula	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
M139	Medicago	polymorpha	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
M140	Medicago	hispida	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
M141	Medicago	orbicularis	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
M142	Medicago	murex	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
M143	Medicago	polymorpha	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
M144	Medicago	hispida	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
M145	Medicago	orbicularis	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
M146	Medicago	intertexta	Béjaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
M147	Medicago	ciliaris	Béjaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
M148	Medicago	polymorpha	Béjaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
M149	Medicago	hispida	Béjaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
M150	Medicago	murex	Béjaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
M151	Medicago	hispida	Béjaia	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
M152	Medicago	orbicularis	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
M153	Medicago	truncatula	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
M154	Medicago	minima	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
M155	Medicago	polymorpha	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
M156	Medicago	hispida	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
M157	Medicago	arborea	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E
M158	Medicago	truncatula	Sétif	Centre ville	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E
M159	Medicago	lupulina	Sétif	-	1062	36°09'54,41"N	5°32'48,61"E
M160	Medicago	minima	Sétif	-	1062	36°09'54,41"N	5°32'48,61"E
M161	Medicago	truncatula	Batna	Fesdis	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N
M162	Medicago	polymorpha	Batna	Fesdis	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N
M163	Medicago	orbicularis	Batna	Fesdis	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N
M164	Medicago	hispida	Batna	Fesdis	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N
M165	Medicago	polymorpha	Jijel	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
M166	Medicago	polymorpha	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
M167	Medicago	orbicularis	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
M168	Medicago	littoralis	Jijel	Plage grand phare	9	36°48'56,16"N	5°42'04,92"E
M169	Medicago	truncatula	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
M170	Medicago	hispida	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
M171	Medicago	minima	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
M172	Medicago	polymorpha	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
M173	Medicago	littoralis	Skikda	Plage jeanne d'arc	11	36°53'28,07"N	7°00'04,58"E
M174	Medicago	polymorpha	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E

M175	Medicago	minima	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
M176	Medicago	italica	Skikda	Filfila	159	36°53'11,44"N	7°04'56,50"E

ANNEXE 2. Listing des populations du genre *Trifolium* collectées en Algérie

N°	GENRE	SP	REGION	Provenance	ALT	LAT	LON
T1	Trifolium	angustifolium	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
T2	Trifolium	lappaceum	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
T3	Trifolium	tomentosum	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
T4	Trifolium	campestre	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E
T5	Trifolium	scabrum	Skikda	Filfila	159	36°53'11,44"N	7°04'56,50"E
T7	Trifolium	cherleri	Skikda	Filfila	159	36°53'11,44"N	7°04'56,50"E
T8	Trifolium	squarrosus	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T9	Trifolium	campestre	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T10	Trifolium	resupinatum	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T11	Trifolium	lappaceum	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T12	Trifolium	pallidum	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T13	Trifolium	scabrum	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T14	Trifolium	stellatum	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T15	Trifolium	cherleri	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E
T16	Trifolium	angustifolium	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T17	Trifolium	lappaceum	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T18	Trifolium	campestre	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T19	Trifolium	scabrum	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T20	Trifolium	resupinatum	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T21	Trifolium	tomentosum	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T22	Trifolium	stellatum	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T23	Trifolium	pallidum	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T24	Trifolium	cherleri	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E
T25	Trifolium	angustifolium	Sidi bel Abbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
T26	Trifolium	campestre	Sidi bel Abbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
T27	Trifolium	scabrum	Sidi bel Abbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
T28	Trifolium	tomentosum	Sidi bel Abbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
T29	Trifolium	stellatum	Sidi bel Abbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E
T30	Trifolium	angustifolium	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
T32	Trifolium	pallidum	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
T33	Trifolium	stellatum	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E
T34	Trifolium	tomentosum	Bouira	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
T35	Trifolium	lappaceum	Bouira	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
T36	Trifolium	angustifolium	Bouira	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
T37	Trifolium	glomeratum	Bouira	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
T38	Trifolium	campestre	Bouira	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
T39	Trifolium	scabrum	Bouira	Bouira	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E
T40	Trifolium	angustifolium	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T41	Trifolium	campestre	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T42	Trifolium	lappaceum	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T44	Trifolium	resupinatum	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T45	Trifolium	pallidum	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T46	Trifolium	glomeratum	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T47	Trifolium	squarrosus	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E
T48	Trifolium	angustifolium	Ain Defla	-	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
T49	Trifolium	campestre	Ain Defla	-	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
T50	Trifolium	scabrum	Ain Defla	-	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
T51	Trifolium	tomentosum	Ain Defla	-	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
T52	Trifolium	stellatum	Ain Defla	-	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E
T53	Trifolium	angustifolium	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
T54	Trifolium	fragiferum	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
T55	Trifolium	scabrum	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
T56	Trifolium	tomentosum	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E
T57	Trifolium	angustifolium	Tipaza	-	203	36°34'48,16"N	2°34'06,74"E
T58	Trifolium	lappaceum	Tipaza	-	203	36°34'48,16"N	2°34'06,74"E
T59	Trifolium	resupinatum	Tipaza	-	203	36°34'48,16"N	2°34'06,74"E

T60	Trifolium	pallidum	Tipaza	-	203	36°34'48,16"N	2°34'06,74"E
T61	Trifolium	angustifolium	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
T62	Trifolium	lappaceum	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
T63	Trifolium	campestre	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
T64	Trifolium	scabrum	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
T65	Trifolium	tomentosum	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
T66	Trifolium	stellatum	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E
T67	Trifolium	angustifolium	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T68	Trifolium	lappaceum	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T69	Trifolium	campestre	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T70	Trifolium	scabrum	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T71	Trifolium	tomentosum	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T73	Trifolium	resupinatum	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T74	Trifolium	fragiferum	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T75	Trifolium	glomeratum	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T76	Trifolium	cherleri	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E
T77	Trifolium	angustifolium	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
T78	Trifolium	campestre	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
T79	Trifolium	squarrosus	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
T80	Trifolium	tomentosum	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
T81	Trifolium	scabrum	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
T83	Trifolium	lappaceum	Constantine	Beni hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E
T84	Trifolium	angustifolium	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
T86	Trifolium	campestre	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
T87	Trifolium	tomentosum	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
T88	Trifolium	scabrum	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
T89	Trifolium	lappaceum	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E
T90	Trifolium	angustifolium	Constantine	Chaab eressas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
T91	Trifolium	campestre	Constantine	Chaab eressas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
T92	Trifolium	stellatum	Constantine	Chaab eressas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
T93	Trifolium	scabrum	Constantine	Chaab eressas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
T94	Trifolium	squarrosus	Constantine	Chaab eressas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E
T95	Trifolium	angustifolium	Mila	Bab trouche	823	36°21'48,77"N	6°19'56,83"E
T96	Trifolium	lappaceum	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T97	Trifolium	scabrum	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T98	Trifolium	campestre	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T99	Trifolium	tomentosum	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T100	Trifolium	fragiferum	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T101	Trifolium	resupinatum	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T103	Trifolium	squarrosus	Mila	Bab trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E
T104	Trifolium	angustifolium	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
T105	Trifolium	campestre	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
T106	Trifolium	scabrum	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
T107	Trifolium	resupinatum	Mila	Oued athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E
T108	Trifolium	tomentosum	Relizane	-	49	35°55'35,18"N	0°47'33,24"E
T109	Trifolium	scabrum	Relizane	-	49	35°55'35,18"N	0°47'33,24"E
T110	Trifolium	angustifolium	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
T111	Trifolium	campestre	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
T112	Trifolium	tomentosum	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
T113	Trifolium	scabrum	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E
T114	Trifolium	angustifolium	Bejaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
T115	Trifolium	campestre	Bejaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E
T116	Trifolium	lappaceum	Bejaia	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
T117	Trifolium	scabrum	Bejaia	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
T118	Trifolium	resupinatum	Bejaia	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
T119	Trifolium	glomeratum	Bejaia	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E
T121	Trifolium	angustifolium	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
T122	Trifolium	lappaceum	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
T123	Trifolium	campestre	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E

T124	Trifolium	stellatum	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
T125	Trifolium	sqarrosus	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
T126	Trifolium	spumosum	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
T127	Trifolium	scabrum	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E
T128	Trifolium	angustifolium	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T129	Trifolium	stellatum	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T130	Trifolium	campestre	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T131	Trifolium	glomeratum	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T132	Trifolium	pallidum	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T133	Trifolium	resupinatum	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T134	Trifolium	scabrum	Alger	Ben aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E
T135	Trifolium	campestre	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
T136	Trifolium	lappaceum	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
T137	Trifolium	Squarrosus	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
T138	Trifolium	repens	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E
T139	Trifolium	repens	Sétif	-	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E
T140	Trifolium	angustifolium	Boumerdes	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
T141	Trifolium	lappaceum	Boumerdes	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
T142	Trifolium	campestre	Boumerdes	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
T143	Trifolium	sqarrosus	Boumerdes	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
T144	Trifolium	pallidum	Boumerdes	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E
T145	Trifolium	angustifolium	Jijel	Parc animalier	21	36°47'26,38"N	5°39'46,16"E
T146	Trifolium	lappaceum	Jijel	Parc animalier	21	36°47'26,38"N	5°39'46,16"E
T147	Trifolium	campestre	Jijel	Parc animalier	21	36°47'26,38"N	5°39'46,16"E
T148	Trifolium	cherleri	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
T149	Trifolium	lappaceum	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
T150	Trifolium	campestre	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E
T151	Trifolium	fragiferum	Jijel	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
T152	Trifolium	cherleri	Jijel	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
T153	Trifolium	scabrum	Jijel	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
T154	Trifolium	resupinatum	Jijel	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E
T155	Trifolium	lappaceum	Jijel	Plage grand phare	9	36°48'56,16"N	5°42'04,92"E
T156	Trifolium	campestre	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O
T157	Trifolium	tomentosum	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O

ANNEXE 3. Caractères biométriques mesurées sur le genre *Medicago*

N	Accessions	LP (mm)	WP (mm)	WTP (g)	SP	LS (mm)	WS (mm)	WTS (g)	RW	DCOT (Jours)	LGFT6 (mm)	LRFT6 (mm)	SFT6 (mm2)
1	Mt1	5,68	6,83	1,86	4	3,41	1,76	4,04	2,03	1	6,01	2,81	16,89
2	Mt2	5,35	5,90	1,46	5	3,53	1,78	3,76	2,58	1	7,54	2,43	18,32
3	Mt3	3,83	5,27	0,85	4	2,82	1,51	2,18	2,56	1	6,76	3,21	21,70
4	Mt5	6,25	6,35	2,15	6	3,48	1,81	4,56	2,12	2	9,02	3,96	35,72
5	Mt6	5,50	6,69	1,81	6	3,32	1,93	3,71	2,05	2	6,08	2,68	16,29
6	Mt8	4,88	5,53	1,26	1	2,80	1,44	3,19	2,53	1	5,19	2,35	12,20
7	Mt9	6,38	6,54	2,73	5	3,68	1,83	4,96	1,82	3	7,34	2,86	20,99
8	Mt10	5,41	6,02	2,06	4	3,25	1,63	3,26	1,58	1	8,40	3,22	27,05
9	Mt11	5,47	5,66	2,20	5	3,39	1,77	3,98	1,81	1	7,38	2,67	19,70
10	Mt12	7,86	7,72	4,21	9	3,55	1,96	4,99	1,19	1	8,19	3,82	31,29
11	Mt13	7,02	7,27	3,33	7	3,61	1,85	4,78	1,44	3	8,64	3,47	29,98
12	Mt14	4,76	5,17	1,50	5	3,08	1,62	3,34	2,23	1	7,31	3,81	27,85
13	Mt15	4,84	5,13	1,45	6	3,24	1,66	3,80	2,62	1	6,58	2,76	18,16
14	Mt16	5,67	5,41	2,01	4	3,27	1,88	4,27	2,12	2	5,73	2,79	15,99
15	Mt17	5,47	5,67	1,75	5	3,24	1,65	3,68	2,10	2	7,01	2,12	14,86
16	Mt18	7,48	6,64	4,84	5	4,04	1,99	5,66	1,17	2	7,91	3,55	28,08
17	Mt20	6,54	7,46	4,95	6	3,70	2,03	5,29	1,07	2	8,04	3,03	24,36
18	Mt21	6,89	7,39	2,73	6	3,75	2,03	4,94	1,81	2	9,06	3,74	33,88
19	Mt22	7,64	8,98	4,79	8	3,80	2,06	5,02	1,05	2	7,98	3,26	26,01
20	Mt23	8,23	10,23	5,54	6	4,14	2,14	6,53	1,18	2	10,17	4,00	40,68
21	Mt24	5,75	5,49	1,69	5	3,34	1,61	3,90	2,31	2	6,27	2,61	16,36
22	Mt25	8,55	8,21	5,52	7	3,79	1,97	5,11	0,93	1	10,58	3,07	32,48
23	Mt26	7,32	7,52	3,47	6	3,68	1,97	4,52	1,30	3	6,53	2,38	15,54
24	Mt27	6,77	6,44	2,20	6	3,31	1,68	3,91	1,78	1	7,48	3,23	24,16
25	Mh1	5,00	9,75	1,99	5	3,28	1,93	4,68	2,35	1	7,39	2,90	21,43
26	Mh4	5,45	10,51	2,04	6	3,41	1,85	4,92	2,41	1	7,93	2,69	21,33
27	Mh5	5,51	10,71	1,42	5	3,23	1,79	1,70	1,20	1	9,29	4,46	41,43
28	Mh6	5,41	11,99	2,24	4	3,46	1,94	4,16	1,86	1	8,83	2,69	23,75
29	Mh7	7,16	10,27	3,65	4	3,36	1,98	2,34	0,64	1	7,32	2,65	19,40
30	Mh8	6,24	10,98	2,07	6	3,32	1,93	4,40	2,13	1	7,85	3,58	28,10
31	Mh9	6,50	12,27	3,29	7	3,51	1,97	6,20	1,88	1	7,67	2,75	21,09
32	Mh10	6,35	10,63	2,27	5	3,16	1,88	6,68	2,94	2	7,67	2,95	22,63
33	Mh11	6,36	11,29	1,57	6	3,33	1,93	5,43	3,46	2	7,48	2,39	17,88
34	Mh12	5,96	10,70	2,29	6	3,40	1,96	5,14	2,24	2	8,37	2,69	22,52
35	Mh13	6,43	10,42	2,42	7	3,35	1,96	4,15	1,71	1	9,83	4,13	40,60
36	Mh14	5,28	9,60	1,47	5	3,23	1,73	4,14	2,82	1	6,92	2,79	19,31
37	Mh15	6,16	9,97	2,27	6	3,17	1,78	4,20	1,85	1	6,25	2,82	17,63
38	Mh16	5,46	10,04	1,75	8	2,95	1,62	3,17	1,81	1	6,49	3,04	19,73
39	Mh17	6,03	10,31	2,14	6	2,98	1,68	3,60	1,68	1	10,19	3,51	35,77
40	Mh18	8,50	10,31	3,58	7	4,07	2,14	6,88	1,92	1	6,88	3,36	23,12
41	Mh19	5,77	12,00	2,27	3	3,39	1,84	5,34	2,35	1	12,19	4,41	53,76
42	Mh20	5,43	11,08	1,89	6	3,20	1,74	4,20	2,22	3	7,91	2,83	22,39
43	Mh21	6,17	11,82	2,17	7	3,54	1,91	5,13	2,36	2	4,72	2,22	10,48
44	Mh22	6,76	12,86	2,58	5	3,57	1,99	5,50	2,13	1	9,35	3,23	30,20
45	Mh23	6,01	10,42	2,18	4	3,72	2,01	5,52	2,53	1	7,80	3,45	26,91
46	Mp1	2,66	9,38	0,74	3	2,46	1,47	2,67	3,61	1	5,25	2,02	10,61
47	Mp2	3,19	8,96	0,96	3	3,25	1,80	3,08	3,21	1	8,24	2,60	21,42
48	Mp3	2,96	8,51	1,36	3	3,23	1,77	4,54	3,34	1	6,72	2,69	18,08
49	Mp4	3,13	8,12	0,70	3	3,11	1,73	2,62	3,74	1	6,70	2,67	17,89
50	Mp6	2,73	5,98	0,52	3	2,51	1,46	2,65	5,10	2	6,45	2,95	19,03
51	Mp7	3,43	7,98	0,81	2	2,89	1,51	3,19	3,94	1	7,60	2,81	21,36
52	Mp8	3,84	6,88	0,59	4	3,07	1,63	2,15	3,64	2	7,19	3,88	27,90
53	Mp10	3,16	6,61	0,59	2	2,83	1,47	2,71	4,59	2	8,38	2,92	24,47
54	Mp11	3,71	7,44	0,62	2	2,88	1,62	3,51	5,66	2	6,23	2,52	15,70
55	Mp12	3,88	7,50	1,02	3	3,38	1,91	3,63	3,56	2	9,13	3,02	27,57
56	Mp16	3,11	6,13	0,52	2	2,68	1,49	1,87	3,60	1	5,91	1,89	11,17
57	Mp17	2,87	9,79	0,95	3	2,86	1,58	2,69	2,83	1	5,93	2,29	13,58
58	Mp20	3,37	9,52	1,01	4	2,99	1,67	3,00	2,97	1	9,06	2,94	26,64
59	Mp21	2,39	8,18	0,31	3	2,69	1,59	3,04	9,81	2	8,42	2,70	22,73
60	Mp23	2,67	6,13	0,60	4	2,81	1,50	2,77	4,62	1	6,46	2,57	16,60
61	Mp24	3,06	7,21	0,84	3	2,80	1,65	2,66	3,17	1	7,96	2,59	20,62
62	Mp25	3,88	8,14	1,01	2	3,09	1,73	3,15	3,12	1	6,46	3,49	22,55
63	Mp26	3,84	8,21	1,25	2	2,98	1,66	2,88	2,30	1	7,53	3,15	23,72
64	Mp27	4,00	6,71	0,92	3	2,34	1,66	2,44	2,65	1	6,74	2,59	17,46
65	Mp29	3,78	8,66	0,84	3	3,33	1,82	5,22	6,21	1	8,99	2,82	25,35
66	Mc 1	11,23	12,72	5,09	8	4,27	2,45	10,77	2,12	3	8,22	4,94	40,61

67	Mc 2	11,75	13,95	6,01	5	4,51	2,67	12,13	2,02	3	10,80	6,36	68,69
68	Mc 3	10,77	13,20	6,60	5	4,46	2,46	13,88	2,10	4	14,75	6,41	94,55
69	Mc 5	11,45	12,61	6,40	9	4,81	2,66	12,69	1,98	3	9,27	6,17	57,20
70	Mc 6	11,92	14,04	5,79	9	4,52	2,70	14,27	2,46	4	10,43	4,99	52,05
71	Mc 7	13,05	14,83	7,41	9	4,69	2,77	11,79	1,59	1	5,24	2,72	14,25
72	Mc 9	12,99	15,53	7,24	7	4,35	2,69	15,64	2,16	4	8,78	4,07	35,73
73	Mc 10	13,18	12,57	7,05	6	4,46	2,54	11,05	1,57	2	7,91	4,95	39,15
74	Mc 11	12,91	11,28	6,62	8	4,47	2,61	14,57	2,20	4	9,16	3,96	36,27
75	Mc 12	13,28	12,17	5,50	8	4,77	2,81	12,89	2,34	4	13,36	6,80	90,85
76	Mc 13	12,77	12,82	7,90	6	4,96	2,74	13,21	1,67	3	11,22	5,85	65,64
77	Mc 14	12,08	11,96	7,89	8	4,08	2,33	12,72	1,61	3	9,81	5,87	57,58
78	Mc 16	6,89	10,22	1,95	5	3,71	2,37	9,68	4,96	3	7,23	5,15	37,23
79	Mc 17	10,82	11,45	5,16	7	4,57	2,43	10,85	2,10	4	9,30	5,23	48,64
80	Mc 19	10,87	10,77	4,98	6	4,24	2,46	10,79	2,17	2	10,43	4,02	41,93
81	Mc 20	11,72	14,60	4,79	6	5,37	2,97	12,78	2,67	2	11,29	5,47	61,76
82	Mo1	6,80	12,69	4,75	17	2,56	2,30	4,09	0,86	1	5,44	2,73	14,85
83	Mo2	5,54	14,06	2,99	16	2,28	2,22	3,76	1,26	2	4,32	2,11	9,12
84	Mo3	10,09	14,36	7,33	28	2,90	2,84	5,03	0,69	1	5,77	3,12	18,00
85	Mo5	4,70	11,86	2,02	11	2,32	2,44	3,82	1,89	2	5,56	2,84	15,79
86	Mo6	6,37	13,52	4,26	15	2,73	2,86	4,62	1,08	2	5,44	2,78	15,12
87	Mo7	7,17	13,55	4,63	21	2,68	2,57	4,47	0,97	1	5,60	3,00	16,80
88	Mo8	7,99	15,53	6,28	22	2,64	2,71	5,38	0,86	1	6,65	3,14	20,88
89	Mo9	5,61	12,43	2,23	14	2,26	2,45	4,67	2,09	2	5,47	3,67	20,07
90	Mo10	4,57	15,29	2,11	13	2,39	1,96	3,41	1,62	1	4,98	2,88	14,34
91	Mo11	6,29	14,98	4,48	17	2,55	2,73	4,18	0,93	2	7,40	3,33	24,64
92	Mo12	6,40	12,39	2,65	15	2,32	2,58	4,02	1,52	2	5,80	2,81	16,30
93	Mo14	6,96	13,65	3,29	25	2,28	2,08	4,32	1,31	2	6,97	3,87	26,97
94	Mo16	5,83	12,78	2,91	12	2,54	2,44	3,80	1,31	1	5,38	3,12	16,79
95	Mo17	4,46	9,76	1,28	11	2,26	2,47	3,35	2,62	2	5,08	3,28	16,66
96	Mmin2	5,55	8,20	0,65	5	2,51	1,37	1,76	2,71	1	4,63	2,30	10,65
97	Mmin3	3,80	9,59	0,36	4	1,86	1,11	1,03	2,86	1	5,01	1,74	8,72
98	Mmin4	4,55	5,69	0,65	4	2,09	1,09	1,34	2,06	1	4,59	2,23	10,24
99	Mmin5	4,09	7,03	0,72	4	2,35	1,20	2,03	2,82	1	4,38	2,27	9,94
100	Mmin6	3,89	7,77	0,46	4	2,02	1,08	1,17	2,54	1	3,73	2,14	7,98
101	Mmin7	3,27	6,34	0,28	4	2,14	1,16	1,29	4,61	1	5,82	2,68	15,60
102	Mmin8	3,39	6,87	0,41	3	2,19	1,23	1,30	3,17	1	4,73	2,19	10,36
103	Mmin9	3,21	5,97	0,73	4	2,24	1,13	1,08	1,48	1	3,60	1,93	6,95
104	Mmin1	3,32	7,48	0,52	4	2,14	1,24	1,27	2,44	1	5,24	3,17	16,61
105	Mmin1	3,47	7,26	0,47	4	2,10	1,15	1,34	2,85	2	4,28	2,45	10,49
106	Mmin1	3,87	6,73	0,55	4	2,21	1,22	1,62	2,95	2	4,73	2,22	10,50
107	Mmx1	8,66	7,98	3,52	6	4,47	2,23	10,12	2,88	1	8,75	3,66	32,03
108	Mmx2	9,53	8,90	7,14	5	4,85	2,38	11,71	1,64	1	9,07	3,83	34,74
109	Mmx5	8,90	7,52	3,74	4	3,90	2,12	9,02	2,41	1	13,19	5,25	69,25
110	Mmx7	9,56	8,60	7,66	5	4,98	2,36	11,91	1,55	1	8,97	3,47	31,13
111	Mmx8	10,32	8,99	7,92	6	4,56	2,28	11,81	1,49	1	8,40	3,79	31,84
112	Mmx9	6,37	6,16	1,67	4	3,62	1,81	6,94	4,16	1	11,29	3,96	44,71
113	Mmx10	11,26	10,90	2,74	6	4,82	2,58	13,85	5,05	1	11,80	4,18	49,32
114	Mmx11	9,21	9,72	5,29	7	4,53	2,40	9,87	1,87	1	8,19	3,74	30,63
115	Mmx12	7,41	7,45	6,63	3	3,89	1,91	9,47	1,43	1	6,75	2,85	19,24
116	Mit2	3,47	7,09	1,97	3	3,16	1,94	5,80	2,94	3	6,80	2,98	20,26
117	Mit3	4,29	7,82	2,17	5	3,23	2,09	6,23	2,87	2	10,40	4,63	48,15
118	Mit4	2,58	4,69	0,52	2	3,04	1,59	4,18	8,04	2	9,15	2,89	26,44
119	Mit5	6,64	7,29	2,87	5	4,23	2,10	8,49	2,96	3	12,69	5,05	64,08
120	Mlit1	3,11	4,69	0,82	4	3,07	1,61	2,23	2,72	1	5,35	1,92	10,27
121	Mlit2	4,42	4,66	1,26	6	2,85	1,49	2,46	1,95	1	7,65	2,49	19,05
122	Mlit3	5,00	5,71	1,23	5	3,13	1,56	2,99	2,43	1	6,63	2,15	14,25
123	Mlit4	4,59	5,20	1,34	4	2,96	1,59	2,56	1,91	1	6,65	2,24	14,90
124	MRg1	8,73	8,92	4,64	8	3,89	2,39	5,67	1,22	1	8,08	4,01	32,40
125	MRg2	8,39	9,53	3,90	8	3,62	2,13	6,84	1,75	2	7,80	3,68	28,70
126	MRg3	11,23	9,65	9,45	6	5,17	2,72	13,49	1,43	1	15,10	5,57	84,11
127	Mint2	11,99	13,66	7,94	5	4,96	2,98	10,63	1,34	2	10,53	6,04	63,60
128	Mlu2	2,68	2,01	0,06	1	1,81	1,33	1,28	21,33	1	3,39	1,82	6,17
129	Msativa	2,72	3,95	0,27	2	2,49	1,42	1,90	7,04	2	4,55	1,93	8,78
130	Marbor	11,90	10,69	1,30	3	4,25	2,72	7,08	5,45	2	8,01	3,89	31,16

ANNEXE 4. Caractères biométriques mesurées sur le genre *Trifolium*

N	Accessions	LF	WDF	PF	WTF	SP	SF	LS	WS	WTS	RW
1	TA1	48,11	16,39	68	8,82	0-1	51	1,90	1,27	2,06	0,23
2	TA2	38,71	17,60	47	6,45	0-1	36	2,15	1,51	2,11	0,33
3	TA3	30,30	18,14	37	6,36	0-1	31	2,13	1,34	1,90	0,30
4	TA4	38,39	17,49	64	9,39	0-1	45	1,95	1,49	1,80	0,19
5	TA5	42,61	14,41	60	5,43	0-1	13	1,52	1,13	1,77	0,33
6	TA6	45,12	15,52	83	11,94	0-1	55	1,91	1,39	1,76	0,15
7	TA7	23,30	11,15	32	2,58	0-1	10	1,73	1,40	1,75	0,68
8	TA8	28,05	14,80	41	5,85	0-1	28	1,91	1,37	1,77	0,30
9	TA9	22,13	14,22	28	4,02	0-1	27	1,83	1,21	1,66	0,41
10	TA10	32,80	16,62	49	7,83	0-1	39	2,29	1,47	2,49	0,32
11	TA11	27,78	14,67	53	6,30	0-1	44	1,84	1,46	1,82	0,29
12	TA12	45,52	15,57	63	10,65	0-1	51	2,12	1,37	2,27	0,21
13	TA13	38,89	16,85	58	13,74	0-1	39	2,04	1,41	2,42	0,18
14	TA14	44,07	17,19	72	14,28	0-1	54	2,20	1,48	2,51	0,18
15	TA15	39,75	14,69	43	6,81	0-1	36	1,81	1,29	2,20	0,32
16	TA16	49,46	16,54	91	16,20	0-1	70	2,18	1,51	2,45	0,15
17	TA17	23,92	13,40	40	6,15	0-1	35	1,88	1,48	1,96	0,32
18	TA18	31,89	12,99	47	8,52	0-1	21	1,99	1,37	2,49	0,29
19	TA19	53,20	13,97	83	13,92	0-1	74	1,89	1,37	1,92	0,14
20	TA20	45,71	14,49	76	12,36	0-1	66	1,83	1,31	1,87	0,15
21	TA21	36,65	13,08	45	7,62	0-1	32	1,90	1,28	1,66	0,22
22	TA22	35,65	12,55	54	5,61	0-1	46	1,72	1,33	1,77	0,32
23	Tpd1	14,83	12,93	47	3,63	0-1	36	1,50	1,36	1,38	0,38
24	Tpd2	19,45	13,96	64	3,39	0-1	49	1,54	1,31	1,45	0,43
25	Tpd3	14,33	11,66	48	3,03	0-1	41	1,49	1,37	1,29	0,43
26	Tpd4	10,59	9,64	33	2,73	0-1	12	1,42	1,16	1,50	0,55
27	Tpd5	11,69	10,55	45	3,21	0-1	35	1,37	1,26	1,47	0,46
28	Tpd6	13,42	12,75	44	2,64	0-1	11	1,61	1,39	1,20	0,45
29	Tpd7	11,47	12,19	39	2,64	0-1	25	1,46	1,09	1,29	0,49
30	Tlap1	10,72	8,91	39	2,37	0-1	27	1,53	1,23	1,16	0,49
31	Tlap2	11,28	8,18	46	1,83	0-1	37	1,28	1,15	0,89	0,49
32	Tlap3	11,51	9,52	41	2,52	0-1	34	1,28	1,07	1,10	0,44
33	Tlap4	11,18	9,93	50	2,58	0-1	28	1,36	1,19	1,02	0,40
34	Tlap5	11,55	9,65	54	3,48	0-1	46	1,35	1,01	1,09	0,31
35	Tlap7	12,47	12,33	41	2,31	0-1	12	1,43	1,25	1,15	0,50
36	Tlap8	10,22	9,20	43	1,95	0-1	30	1,54	1,15	0,91	0,47
37	Tlap9	11,91	11,52	41	2,46	0-1	29	1,57	1,15	1,48	0,60
38	Tlap10	13,85	12,10	43	2,67	0-1	30	1,57	1,19	0,86	0,32
39	Tlap11	13,60	11,38	42	4,80	0-1	38	1,58	1,17	1,62	0,34
40	Tlap12	11,28	9,67	44	2,16	0-1	25	1,31	1,09	0,96	0,44
41	Tlap13	12,25	11,12	48	2,43	0-1	37	1,44	1,06	1,15	0,47
42	Tlap14	13,31	14,02	42	3,21	0-1	34	1,37	1,13	1,09	0,34
43	Tlap15	13,21	12,88	49	3,12	0-1	33	1,31	1,15	1,00	0,32
44	Tlap16	13,31	12,80	55	2,97	0-1	48	1,42	1,01	0,91	0,31
45	Tlap17	10,92	10,94	40	3,21	0-1	26	1,39	1,13	1,12	0,35
46	Tlap18	9,11	8,75	40	1,77	0-1	31	1,27	1,11	0,97	0,55
47	Tst2	21,79	19,17	21	2,81	0-1	19	2,49	1,89	2,68	0,95
48	Tst3	17,02	15,70	15	3,42	1,00	15	2,00	1,51	3,28	0,96
49	Tst4	23,25	18,67	15	3,12	0-1	12	2,44	1,59	3,34	1,07
50	Tst5	18,66	17,73	19	3,25	1,00	19	2,02	1,45	1,98	0,61
51	Tst8	21,96	21,78	17	2,90	0-1	16	2,09	1,57	3,70	1,28
52	Tst9	26,01	28,18	22	3,60	0-1	14	2,12	1,76	2,97	0,83
53	Tsp	18,33	17,31	43	9,69	1 à 4	86	1,82	1,53	2,56	0,26
54	Tsq1	20,40	19,41	57	14,76	0-1	28	2,50	1,80	5,33	0,36
55	Tsq3	17,15	17,27	36	11,28	0-1	14	2,49	1,79	4,89	0,43
56	Tsq4	14,20	16,32	33	3,60	0-1	20	2,35	1,52	3,24	0,90
57	Tsq5	21,17	18,23	40	10,41	0-1	36	2,51	1,82	5,50	0,53
58	Tsq6	19,69	16,54	78	12,66	0-1	40	2,07	1,43	4,03	0,32
59	Tsq7	17,83	17,06	73	10,59	0-1	49	2,37	1,44	4,12	0,39
60	Tsq8	20,18	16,23	56	10,62	0-1	36	2,46	1,86	4,40	0,41
61	Tch1	5,56	9,34	21	1,53	0-1	5	1,85	1,50	2,51	1,64
62	Tch2	6,80	14,30	20	2,61	0-1	7	1,73	1,26	2,17	0,83
63	Tch3	6,46	12,58	17	1,65	0-1	8	1,89	1,51	2,77	1,68
64	Tch4	6,31	8,91	19	2,04	0-1	9	1,82	1,55	2,54	1,25

65	Tch6	5,76	12,50	17	2,16	0-1	5	2,01	1,56	2,82	1,31
66	TR1	9,95	8,97	23	0,90	0-3	37	1,07	0,80	0,46	0,51
67	TR3	8,39	8,30	18	0,87	0-2	29	1,12	0,88	0,43	0,49
68	TR4	9,73	9,15	21	0,93	0-2	34	1,03	0,73	0,31	0,33
69	TR8	8,02	7,18	22	0,51	0-1	17	0,89	0,76	0,29	0,57
70	TR9	8,72	9,17	22	0,90	1à3	33	1,06	0,81	0,40	0,44
71	TR10	8,76	7,11	28	0,84	0-1	19	1,20	0,80	0,45	0,54
72	Tf1	11,44	9,64	56	2,28	0-1	3	1,65	1,31	1,36	0,60
73	Tf2	11,75	10,55	58	1,86	0-3	25	1,59	1,27	1,12	0,60
74	Ttm4	9,64	8,76	21	0,90	1à2	22	1,30	1,00	0,72	0,80
75	Ttm5	7,56	7,43	20	0,78	0-1	15	1,13	0,97	0,42	0,54
76	Ttm8	7,45	6,64	17	0,69	0-1	12	1,06	0,88	0,54	0,78
77	Ttm9	6,77	7,37	17	0,69	0-1	15	1,16	0,92	0,57	0,83
78	Ttm10	8,30	8,53	22	0,69	0-1	17	1,12	0,89	0,64	0,93
79	Ttm11	8,02	8,38	21	0,87	0-1	14	1,38	1,05	0,65	0,75
80	Tsc1	6,81	6,58	11	0,69	0-1	9	1,51	0,98	0,72	1,04
81	Tsc2	9,32	7,42	15	1,41	0-1	14	1,67	1,04	0,82	0,58
82	Tsc3	8,79	6,01	13	0,78	0-1	8	1,63	0,99	0,91	1,17
83	Tsc4	8,61	6,49	13	0,96	0-1	10	1,50	0,97	0,83	0,86
84	Tsc5	8,64	5,63	13	0,93	0-1	10	1,75	1,03	0,87	0,94
85	Tsc6	6,48	5,91	9	0,54	0-1	8	1,64	0,97	0,77	1,43
86	Tsc8	9,32	7,31	12	1,14	0-1	11	1,59	1,07	0,88	0,77
87	Tsc9	7,13	4,87	11	0,63	0-1	10	1,64	1,02	0,82	1,30
88	Tsc10	8,87	5,43	18	0,87	0-1	18	1,49	1,08	0,73	0,84
89	Tsc11	8,18	6,65	13	0,90	0-1	10	1,52	0,93	0,85	0,94
90	Tsc12	10,16	7,11	14	1,29	0-1	7	1,98	1,15	0,83	0,64
91	Tsc13	8,37	6,44	15	1,17	0-1	14	1,65	1,07	0,80	0,68
92	Tsc14	9,33	6,73	16	1,38	0-1	14	1,73	1,00	0,73	0,53
93	Tsc15	8,25	6,90	16	0,93	0-1	13	1,53	0,89	0,54	0,58
94	Tsc16	6,78	5,91	12	0,72	0-1	7	1,82	1,11	0,95	1,32
95	Tsc17	8,46	7,37	14	0,60	0-1	5	1,85	0,88	0,61	1,02
96	Tsc18	6,81	5,54	15	0,84	0-1	8	1,53	0,96	0,69	0,82
97	Tsc19	7,98	5,33	8	0,87	0-1	7	1,43	1,01	0,84	0,97
98	Tsc20	7,21	4,19	9	0,69	0-1	8	1,72	0,94	0,82	1,19
99	Tps5	11,75	9,79	57	1,59	0-1	10	0,90	0,60	0,45	0,28
100	Tps7	11,67	12,08	50	1,59	1,00	50	1,26	0,86	0,52	0,33
101	Tcp1	8,49	7,13	62	0,54	0-1	31	1,04	0,68	0,21	0,39
102	Tcp2	9,32	6,17	43	0,78	0-1	28	1,17	0,80	0,25	0,32
103	Tcp3	6,64	6,16	33	0,63	0-1	21	1,15	0,67	0,22	0,35
104	Tcp4	7,68	7,44	48	0,84	0-1	35	1,19	0,73	0,35	0,42
105	Tcp5	10,32	6,66	44	0,54	0-1	31	1,27	0,71	0,16	0,30
106	Tcp6	7,93	5,74	32	0,72	0-1	20	1,06	0,71	0,29	0,40
107	Tcp7	8,84	6,70	31	0,36	0-1	6	1,21	0,73	0,25	0,69
108	Tcp10	7,95	6,37	41	0,54	0-1	34	1,20	0,62	0,26	0,48
109	Tcp13	8,20	7,15	38	0,60	0-1	29,5	1,15	0,71	0,34	0,57
110	Tcp16	7,62	6,23	37	0,54	0-1	21	1,07	0,73	0,26	0,48
111	Tcp17	8,02	6,07	22	0,66	0-1	13	1,16	0,73	0,24	0,36
112	Tcp18	8,80	5,89	49	0,72	0-1	36	0,99	0,65	0,25	0,35
113	Tcp19	7,61	5,53	36	0,44	0-1	29	1,11	0,68	0,26	0,59
114	Tcp21	8,77	6,61	37	0,66	0-1	34	1,01	0,68	0,30	0,45
115	Tg1	4,82	5,64	28	0,99	1à2	39	1,08	0,82	0,27	0,27
116	Tg2	7,94	6,60	32	1,23	1à2	44	1,01	0,86	0,34	0,28
117	Tg3	6,33	6,37	32	1,08	1à2	48	1,11	0,76	0,31	0,29
118	Tg4	6,43	6,37	23	0,72	1à2	28	1,08	0,76	0,31	0,43
119	Tg5	5,97	6,64	31	1,29	1à2	49	1,15	0,86	0,36	0,28
120	Trp1	11,18	13,92	59	2,40	0-6	25	1,28	1,03	0,63	0,26

ANNEXE 5. Propriétés physiques des grains mesurées sur le genre *Medicago*

N	Accessions	(L) =	(W) =	(T) =	(L+W+T)/3	(LWT)1/3	(ϕ) : (LWT)1/3/	π .Dg2 =	(π .LWT)/6	WTS
		mm	mm	mm	(Da)	(Dge)	L x 100 = %	mm2	= mm3	(g)
		L	W	T	Da	Dg	ϕ	S	v	WTS
1	Mt1	3,41	1,76	1,00	2,06	1,82	53,29	10,37	3,14	4,04
2	Mt2	3,53	1,78	0,92	2,08	1,79	50,84	10,11	3,03	3,76
3	Mt3	2,82	1,51	0,82	1,72	1,52	53,72	7,21	1,82	2,18
4	Mt5	3,48	1,81	0,85	2,05	1,75	50,34	9,63	2,81	4,56
5	Mt6	3,32	1,93	0,82	2,02	1,74	52,29	9,46	2,74	3,71
6	Mt8	2,80	1,44	0,88	1,71	1,52	54,52	7,30	1,85	3,19
7	Mt9	3,68	1,83	1,03	2,18	1,91	51,82	11,42	3,63	4,96
8	Mt10	3,25	1,63	0,80	1,89	1,62	49,79	8,22	2,22	3,26
9	Mt11	3,39	1,77	0,89	2,02	1,75	51,50	9,57	2,78	3,98
10	Mt12	3,55	1,96	1,03	2,18	1,93	54,37	11,70	3,76	4,99
11	Mt13	3,61	1,85	0,99	2,15	1,87	51,93	11,04	3,45	4,78
12	Mt14	3,08	1,62	0,84	1,85	1,61	52,28	8,14	2,18	3,34
13	Mt15	3,24	1,66	1,00	1,97	1,75	54,08	9,64	2,81	3,80
14	Mt16	3,27	1,68	0,96	1,97	1,74	53,29	9,54	2,77	4,27
15	Mt17	3,24	1,65	1,04	1,98	1,77	54,74	9,88	2,92	3,68
16	Mt18	4,04	1,99	1,04	2,36	2,03	50,29	12,96	4,39	5,66
17	Mt20	3,70	2,03	0,96	2,23	1,93	52,21	11,72	3,77	5,29
18	Mt21	3,75	2,03	0,96	2,25	1,94	51,75	11,82	3,82	4,94
19	Mt22	3,80	2,06	1,08	2,31	2,04	53,66	13,06	4,44	5,02
20	Mt23	4,14	2,14	1,02	2,43	2,08	50,26	13,59	4,71	6,53
21	Mt24	3,34	1,61	0,99	1,98	1,74	52,22	9,55	2,78	3,90
22	Mt25	3,79	1,97	1,05	2,27	1,99	52,42	12,39	4,10	5,11
23	Mt26	3,68	1,97	0,98	2,21	1,92	52,30	11,63	3,73	4,52
24	Mt27	3,31	1,68	0,83	1,94	1,66	50,30	8,70	2,42	3,91
25	Mh1	3,28	1,93	1,01	2,07	1,85	56,46	10,79	3,33	4,68
26	Mh4	3,41	1,85	1,06	2,10	1,88	55,24	11,11	3,48	4,92
27	Mh5	3,23	1,79	0,86	1,96	1,71	52,97	9,17	2,61	1,70
28	Mh6	3,46	1,94	1,05	2,15	1,92	55,41	11,54	3,69	4,16
29	Mh7	3,36	1,98	1,08	2,14	1,93	57,37	11,67	3,75	2,34
30	Mh8	3,32	1,93	1,15	2,13	1,94	58,56	11,87	3,85	4,40
31	Mh9	3,51	1,97	1,16	2,21	2,00	57,08	12,61	4,21	6,20
32	Mh10	3,16	1,88	0,99	2,01	1,80	57,16	10,22	3,07	6,68
33	Mh11	3,33	1,93	1,06	2,11	1,89	56,91	11,27	3,56	5,43
34	Mh12	3,40	1,96	1,02	2,13	1,90	55,74	11,28	3,56	5,14
35	Mh13	3,35	1,96	1,01	2,11	1,88	55,98	11,07	3,46	4,15
36	Mh14	3,23	1,73	1,04	2,00	1,80	55,69	10,16	3,05	4,14
37	Mh15	3,17	1,78	1,02	1,99	1,80	56,59	10,13	3,03	4,20
38	Mh16	2,95	1,62	0,92	1,83	1,63	55,47	8,39	2,29	3,17
39	Mh17	2,98	1,68	0,72	1,80	1,53	51,45	7,40	1,89	3,60
40	Mh18	4,07	2,14	1,15	2,45	2,15	52,96	14,57	5,23	6,88
41	Mh19	3,39	1,84	1,04	2,09	1,87	55,08	10,93	3,40	5,34
42	Mh20	3,20	1,74	1,01	1,98	1,78	55,55	9,92	2,94	4,20
43	Mh21	3,54	1,91	1,11	2,19	1,96	55,36	12,06	3,94	5,13
44	Mh22	3,57	1,99	1,11	2,22	1,99	55,69	12,43	4,12	5,50
45	Mh23	3,72	2,01	1,04	2,26	1,98	53,20	12,32	4,07	5,52
46	Mp1	2,46	1,47	0,88	1,60	1,47	59,97	6,81	1,67	2,67
47	Mp2	3,25	1,80	0,92	1,99	1,75	53,95	9,65	2,82	3,08
48	Mp3	3,23	1,77	1,16	2,05	1,88	58,17	11,08	3,47	4,54
49	Mp4	3,11	1,73	0,62	1,82	1,49	48,04	7,01	1,75	2,62
50	Mp6	2,51	1,46	0,92	1,63	1,50	59,66	7,06	1,76	2,65
51	Mp7	2,89	1,51	1,02	1,81	1,65	56,86	8,50	2,33	3,19
52	Mp8	3,07	1,63	0,38	1,69	1,24	40,38	4,82	0,99	2,15
53	Mp10	2,83	1,47	0,95	1,75	1,58	55,87	7,87	2,08	2,71
54	Mp11	2,88	1,62	0,74	1,75	1,51	52,56	7,18	1,81	3,51
55	Mp12	3,38	1,91	0,71	2,00	1,66	49,10	8,65	2,39	3,63
56	Mp16	2,68	1,49	0,82	1,66	1,48	55,25	6,90	1,70	1,87
57	Mp17	2,86	1,58	0,79	1,74	1,53	53,48	7,33	1,87	2,69
58	Mp20	2,99	1,67	0,74	1,80	1,55	51,78	7,53	1,94	3,00
59	Mp21	2,69	1,59	1,21	1,83	1,73	64,36	9,39	2,71	3,04
60	Mp23	2,81	1,50	0,90	1,74	1,56	55,50	7,65	1,99	2,77
61	Mp24	2,80	1,65	0,85	1,76	1,57	56,28	7,78	2,04	2,66
62	Mp25	3,09	1,73	1,00	1,94	1,75	56,58	9,62	2,81	3,15

63	Mp26	2,98	1,66	0,93	1,86	1,66	55,77	8,69	2,41	2,88
64	Mp27	2,34	1,66	0,91	1,64	1,53	65,16	7,32	1,86	2,44
66	Mc 1	4,27	2,45	1,32	2,68	2,40	56,14	18,04	7,21	10,77
67	Mc 2	4,51	2,67	1,54	2,91	2,65	58,74	22,00	9,71	12,13
68	Mc 3	4,46	2,46	1,28	2,74	2,41	54,09	18,30	7,36	13,88
69	Mc 5	4,81	2,66	1,47	2,98	2,66	55,20	22,17	9,82	12,69
70	Mc 6	4,52	2,70	1,44	2,88	2,60	57,52	21,20	9,18	14,27
71	Mc 7	4,69	2,77	1,31	2,92	2,57	54,87	20,79	8,92	11,79
72	Mc 9	4,35	2,69	1,55	2,86	2,63	60,41	21,65	9,48	15,64
73	Mc 10	4,46	2,54	1,48	2,83	2,56	57,46	20,59	8,79	11,05
74	Mc 11	4,47	2,61	1,67	2,92	2,69	60,24	22,74	10,20	14,57
75	Mc 12	4,77	2,81	1,49	3,02	2,71	56,86	23,10	10,44	12,89
76	Mc 13	4,96	2,74	1,31	3,00	2,61	52,62	21,39	9,30	13,21
77	Mc 14	4,08	2,33	1,54	2,65	2,44	59,92	18,74	7,63	12,72
78	Mc 16	3,71	2,37	1,07	2,39	2,11	56,95	14,04	4,95	9,68
79	Mc 17	4,57	2,43	1,43	2,81	2,51	54,98	19,80	8,29	10,85
80	Mc 19	4,24	2,46	1,44	2,72	2,47	58,26	19,16	7,89	10,79
81	Mc 20	5,37	2,97	1,33	3,22	2,77	51,59	24,10	11,13	12,78
82	Mo1	2,56	2,30	1,08	1,98	1,85	72,33	10,77	3,32	4,09
83	Mo2	2,28	2,22	1,31	1,94	1,88	82,43	11,09	3,47	3,76
84	Mo3	2,90	2,84	1,03	2,26	2,04	70,35	13,07	4,44	5,03
85	Mo5	2,32	2,44	1,07	1,94	1,82	78,65	10,46	3,18	3,82
86	Mo6	2,73	2,86	0,95	2,18	1,95	71,44	11,91	3,87	4,62
87	Mo7	2,68	2,57	1,03	2,09	1,92	71,73	11,57	3,70	4,47
88	Mo8	2,64	2,71	1,08	2,14	1,98	74,96	12,30	4,06	5,38
89	Mo9	2,26	2,45	1,08	1,93	1,82	80,51	10,37	3,14	4,67
90	Mo10	2,39	1,96	1,05	1,80	1,70	71,04	9,05	2,56	3,41
91	Mo11	2,55	2,73	1,01	2,10	1,91	75,10	11,51	3,68	4,18
92	Mo12	2,32	2,58	1,07	1,99	1,86	80,13	10,85	3,36	4,02
93	Mo14	2,28	2,08	1,14	1,83	1,76	76,86	9,67	2,83	4,32
94	Mo16	2,54	2,44	1,17	2,05	1,94	76,38	11,79	3,81	3,80
95	Mo17	2,26	2,47	0,93	1,89	1,73	76,58	9,43	2,72	3,35
96	Mmin2	2,51	1,37	0,82	1,57	1,41	56,27	6,28	1,48	1,76
97	Mmin3	1,86	1,11	0,68	1,22	1,12	60,07	3,93	0,73	1,03
98	Mmin4	2,09	1,09	0,73	1,30	1,19	56,66	4,42	0,87	1,34
99	Mmin5	2,35	1,20	0,89	1,48	1,36	57,90	5,83	1,32	2,03
100	Mmin6	2,02	1,08	0,71	1,27	1,16	57,25	4,21	0,81	1,17
101	Mmin7	2,14	1,16	0,74	1,35	1,23	57,31	4,74	0,97	1,29
102	Mmin8	2,19	1,23	0,73	1,39	1,25	57,20	4,94	1,03	1,30
103	Mmin9	2,24	1,13	0,70	1,36	1,21	54,02	4,60	0,93	1,08
104	Mmin10	2,14	1,24	0,72	1,37	1,24	58,08	4,84	1,00	1,27
105	Mmin11	2,10	1,15	0,75	1,33	1,22	58,08	4,67	0,95	1,34
107	Mmx1	4,47	2,23	1,32	2,67	2,36	52,84	17,52	6,90	10,12
108	Mmx2	4,85	2,38	1,33	2,85	2,48	51,27	19,39	8,03	11,71
109	Mmx5	3,90	2,12	1,25	2,42	2,17	55,80	14,85	5,38	9,02
110	Mmx7	4,98	2,36	1,44	2,93	2,56	51,45	20,64	8,82	11,91
111	Mmx8	4,56	2,28	1,30	2,72	2,39	52,31	17,86	7,10	11,81
112	Mmx9	3,62	1,81	1,25	2,23	2,02	55,70	12,79	4,30	6,94
113	Mmx10	4,82	2,58	1,47	2,96	2,64	54,72	21,81	9,58	13,85
114	Mmx11	4,53	2,40	1,30	2,74	2,42	53,40	18,37	7,41	9,87
115	Mmx12	3,89	1,91	1,36	2,39	2,16	55,64	14,68	5,29	9,47
116	Mit2	3,16	1,94	1,09	2,06	1,88	59,73	11,15	3,50	5,80
117	Mit3	3,23	2,09	1,12	2,14	1,96	60,77	12,07	3,95	6,23
118	Mit4	3,04	1,59	0,78	1,80	1,56	51,34	7,63	1,98	4,18
119	Mit5	4,23	2,10	1,12	2,49	2,15	50,87	14,56	5,23	8,49
120	Mlit1	3,07	1,61	0,74	1,81	1,54	50,11	7,43	1,91	2,23
121	Mlit2	2,85	1,49	0,80	1,71	1,50	52,79	7,09	1,78	2,46
122	Mlit3	3,13	1,56	0,77	1,82	1,55	49,61	7,55	1,95	2,99
123	Mlit4	2,96	1,59	0,78	1,78	1,54	52,12	7,47	1,92	2,56
124	MRg1	3,89	2,39	1,12	2,47	2,18	56,17	14,99	5,46	5,67
125	MRg2	3,62	2,13	1,33	2,36	2,17	59,99	14,81	5,36	6,84
126	MRg3	5,17	2,72	0,80	2,90	2,24	43,24	15,72	5,86	13,49
127	Mint2	4,96	2,98	1,62	3,19	2,88	58,12	26,13	12,57	10,63
128	Mlu2	1,81	1,33	0,94	1,36	1,32	72,53	5,43	1,19	1,28
129	Msativa	2,49	1,42	0,94	1,62	1,49	59,95	7,02	1,75	1,90
130	Marborea	4,25	2,72	0,94	2,64	2,21	52,05	15,37	5,67	7,08
131	Marabica	3,02	1,76	1,05	1,94	1,77	58,73	9,88	2,92	4,02

ANNEXE 6. Révélation des enzymes

D'après Bendiab *et al.* 1993

Estérases (EST). E.C. 3.1.1.

- 0.03 g α -Naphthylacétate (se dissout dans l'acétone à 50%)
- 100 ml (q.s.p) de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2

Incuber 15 minutes à 37°C.

- Rincer le gel deux fois avec de l'eau courante

Incuber 20 min dans la solution de coloration :

- 0.14 g Fast Blue RR salt
- 25 ml de tampon Tris-HCl pH 7,2
- 100 ml (q.s.p) H₂O.

Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT) = Aspartate aminotransferase (AAT).

E.C. 2.6.1.1

- 0.25 g Acide -L- Aspartique
- 0.1 g Acide alpha-cétoglutarique
- 50 ml de tampon Tris-Hcl 0,5 M, pH 7,2
- 100 ml (q.s.p) H₂O

Incuber 15 min à 37°C puis rincer avec de l'eau courante et rajouter la solution de coloration :

- 0.2 g Fast Blue BB
- 25 ml de tampon Tris-Hcl 0,5M, pH 7,2
- 100 ml (q.s.p) H₂O

Incuber à 37 °C jusqu'à l'apparition des bandes.

ANNEXE 7. Séparation des albumines et des globulines par SDS-PAGE

Solutions pour la préparation des gels

Tampon Tris-HCl pH : 8,8 (Conserver à 4°C)

- Tris	60.57	g
- Eau distillé	~ 400	mL
- Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant	~ 8 à 10	mL
- Eau distillée	Qsp 500	mL

Tampon Tris-HCl pH : 6,8 (Conserver à 4°C.)

- Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30.285	g
- Eau distillée	~200	mL
- Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant	~ 19,5	mL
- Eau distillée	Qsp 250	mL

Solution stock de SDS à 10% Stocker à température ambiante

- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	1	g
- Eau distillée	Qsp 10	mL

Solution d'ammonium persulfate (APS) à 1% (A préparer le jour même)

- APS (stocké au frigo)	0,2	g
- Eau distillée	Qsp 20	mL

Gel de séparation (migration= running gel) à 12,52%

- Acrylamide 40%	12.4	mL
- Bisacrylamide 2%	2.4	mL
- Eau permutée	8.6	mL
- Tampon Tris-HCL pH 8.8	15.2	mL
- SDS 10%	0.4	mL
- APS 1%	1	mL
- TEMED	0.02	mL
- Volume total	40	mL

Gel de concentration (stacking gel) à 5%

- Acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8)	0.5	mL
- Eau permutée	3.25	mL
- Tampon Tris-HCL pH 6.8	1.25	mL
- SDS 10%	0.14	mL
- APS 20%	25	µL
- TEMED	4	µL

Tampon d'électrophorèse (Stocker à température ambiante)

- Glycine	70.55	g
- Tris	15	g
- SDS	5	g
- Eau distillée	Qsp 5	L

Le tampon des cuves doit être renouvelé lorsque le voltage dépasse 500V en fin de migration (environ 20 utilisations), prévoir 4 litres par cuve. Prévoir 1 litre pour le bac supérieur à chaque électrophorèse

Solution de coloration (pour les gels monodimensionnels), à préparer le jour même

- TCA	30	g
- Solution mère de Bleu de Coomassie R250	12,5	mL
- Eau distillée	Qsp 250	mL

Bien mettre en agitation avant utilisation

Solution mère de Bleu de Coomassie R250

- Bleu de Coomassie R250	10	g
- Ethanol 95°	Qsp 1	L

Laisser en agitation au moins 2 heures. Filtrer cette solution avec un filtre plissé n°3.

Attention : mettre en premier l'alcool dans le bêcher avec un barreau aimanté en agitation, puis mettre le bleu de Coomassie dans le bêcher en agitation (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant)

ANNEXE 8. Extraction de l'ADN

D'après la méthode de Doyle et Doyle 1990.

- Préchauffer le tampon **CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol** dans un bain marie à 65 °C.
- Broyer le matériel végétal (environ 150 mg) dans un mortier avec l'azote liquide (manipuler avec les gants)
- A l'aide de spatule, transférer le broyat dans un tube à vis (mettez les tubes contenant le broyat dans l'azote liquide, bien fermer les tubes)
- Ajouter **900 µL** de tampon **CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol** préchauffé à 65 °C.
- Homogénéiser au vortex et incubé 60 min dans un bain marie à 65 °C avec agitation.
- Centrifuger 15 min à 10 000 rpm à 4 °C.
- Récupérer le surnageant (≈ 800 µL) dans un nouveau tube d'ependorf de 2 mL (stocker le culot à 4 °C à l'abri de la lumière).
- Ajouter 800 µL (1vol) **chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)**
- Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites).
- Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse supérieur à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf. (Éviter de prendre la couche blanche au milieu).
- Pour un meilleur résultat, répéter cette la dernière étape :**
- Ajouter 800 µL (1vol) chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1). Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites). Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C. Récupérer la phase aqueuse supérieur à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf.
- Ajouter 3 à 5 µl de **RNase A (10 mg/ml)**, agiter par inversion et incubé 30 min à 37 °C.
- Ajouter 540 µl (2/3 Vol) **d'Isopropanol froid (-20°C)**
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche.
- Laisser précipiter à -20 °C pendant 5 à 10 min.
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm à 4 °C.
- Éliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette)
- Ajouter 500 µl de **Solution de lavage 1**.
- Incuber pendant 15 min à température ambiante.
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Éliminer le surnageant et ajouter 500 µl de **solution de lavage 2**.
- Ne pas incubé plus de 5 min
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Éliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min.
- Suspendre le culot d'ADN dans 100 µl de **TE 0.1X**
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4 °C avant dosage.

Contrôle de qualité

- Préparer un gel 0.8% dans du **TBE 1X**
- Déposer 5 µL (soit 500 ng) de chaque échantillon
- Faire migrer l'ADN 15 min. à 100V
- Colorer le gel d'agarose 10 min. dans une solution BET à 2 µg/mL
Attention : le BET est un mélange puissant, respecter les consignes de sécurité et travailler avec des gants
- Prendre une photo du gel sous UV
Attention : les UV peuvent causer des brûlures graves, respecter les consignes de sécurité

Solutions et tampons

Tampon CTAB 2X (pH 8) (Stocker à température ambiante)

- | | | | |
|------------------------|-------|---|-----------|
| - CTAB | 20 | g | 2 % (p/v) |
| - Tris de base | 12.11 | g | 100 mM |
| - Na ₂ EDTA | 7.44 | g | 20 mM |
| - NaCl | 81.8 | g | 1.4 M |
| - PVP 40 | 10 | g | 1 % (p/v) |
| - H ₂ O up | Qsp 1 | L | |
- Commencer par dissoudre le CTAB à la chaleur (50°C) dans 800 ml d'eau up, puis ajouter dans l'ordre les autres produits.
 - Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl 1 M, puis compléter le volume à 1 litre.
 - Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.

Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)

Pour 25 ml : Ajouter 24 ml Chloroforme + 1 ml Alcool isoamylique

Tampon de dissolution d'ARNase

- | | | | |
|-----------------------|-------|---|-------|
| - Tris | 0,12 | g | 10 mM |
| - NaCl | 0,88 | g | 15 mM |
| - H ₂ O up | Qsp 1 | L | |
- Mettre sous agitation dans 900 ml d'eau up.
 - Ajuster le pH à 7.5 par addition d'HCl puis compléter au volume final avec l'eau ultra pure.
 - Aliquoter en bouteilles et stériliser 20 min à 120°C.
 - Stocker à température du laboratoire.

RNase A (10 mg/ml)

- Dissoudre 100 mg de RNase A dans 10 ml de ce tampon de dissolution.
- Aliquoter en tubes vissables de 2 ml
- Traiter 15 min à 100 °C au bain marie
- Laisser refroidir à température du laboratoire
- Stocker au congélateur à -20 °C.

Solution Lavage 1

- Acétate de Sodium 1.6 g 200 mM
- Eau distillée 24 mL
- Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol
- Ethanol 100 % Qsp 100 mL

TE 1X (pH 8)

- Tris de base 0.12 g 10 mM
- Na₂ EDTA 0.04 g 1 mM
- H₂O up Qsp 100 ml
- Ajouter de l'H₂O up jusqu'à 90 % du volume
- Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl fumant.
- Compléter le volume.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120 °C.

Stocker à température ambiante.

Les concentrations mentionnées correspondent aux concentrations finales.

Remplir une fiche solution en notant toutes les informations disponibles. Noter date, nom du produit et numéro du lot de la solution sur le flacon.

ANNEXE 9. Protocole expérimental pour l'analyse de l'ADN par SSR

Préparer le mélange réactionnel (ou « Mix ») comme suit :

- Eau pure stérile	6.5	μL
- Tampon 10X	3	μL
- MgCl ₂ 25 mM	1.2	μL
- dNTP mix 10 mM	2.4	μL
- Amorces (sens et anti-sens) 10 μM	1.8	μL
- Taq (2.5 U)	0.3	μL
- ADN (50 ng/μL)	3	μL
Volume finale	20	μL

Réaliser l'amplification selon le programme suivant :

Etape	Température °C	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	5 min.	1
Dénaturation	94	45 s	35
Hybridation	55	45 s	
Elongation	72	1 min.	
Elongation finale	72	10 min.	1

Gel de Polyacrylamide à 8%

- Acrylamide-bisacrylamide (29 :1)	3.2	mL
- Tampon TBE 5X	2.4	mL
-Eau distillée	6.4	mL
-APS (10%)	200	μL
-TEMED	10	μL

Tampon TBE 10X

- Tris	108	g
- Borate	55	g
- EDTANa ₂	7.44	g
- Eau distillée	Qsp 1	L

Tampon de migration

- TBE 0.5X

Solution de révélation

- BET (2mg/mL)	100	μL
- Eau distillée	100	mL

ATTENTION : Le bromure d'éthidium (BET) est dangereux par contact, inhalation et ingestion (un agent mutagène), pour le manipuler, porter des gants doubles en latex ou des gants simples en nitrile.

Résumés

Résumé

L'étude de la diversité génétique des populations spontanées des genres *Medicago* et *Trifolium* est appréhendée par diverses approches phénotypiques, biochimiques et moléculaires. Cette étude repose sur un large échantillonnage de populations, réalisé selon un gradient bioclimatique dans le Nord Algérien. La combinaison des marqueurs étudiés (caractères biométriques, isoenzymes, albumines, globulines, propriétés physiques du grain et les microsattellites), a fait apparaître un polymorphisme important à l'échelle intra et interspécifique dans les deux genres. L'étude morphologique réalisée principalement à l'échelle interspécifique a mis en évidence une faible corrélation entre les caractères biométriques et les conditions bioclimatiques. Les espèces étudiées ont été caractérisées par un certain nombre de marqueurs spécifiques qui peuvent être utilisés comme marqueurs d'identification interspécifique. Les deux espèces *Medicago polymorpha* et *Trifolium campestre* ont été caractérisées par la plus grande diversité génétique intraspécifique quelque soit le marqueur. La hiérarchisation des espèces par les différentes approches a montré quelques consistances et quelques contradictions avec les données classiques basées sur les critères morphologiques. Les deux fractions albumines et globulines ont été caractérisées par une corrélation significative entre elles. Cependant, une absence d'association a été enregistrée avec les matrices de distances générées par les autres marqueurs. La mise en évidence de marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires revêt un grand intérêt pour la sélection de génotypes adaptés et pour la conservation de la biodiversité.

Mots clés : *Medicago* – *Trifolium* - Diversité génétique – Algérie – Morphologie - Propriétés physiques – Isoenzymes – Protéines - Microsattellites.

Abstract

The genetic diversity of spontaneous populations of *Medicago* and *Trifolium* genera was analyzed using various morphological, biochemical and molecular approaches. This study is based on a large sampling of populations in a wide range of bioclimatic regions in northern Algeria. Combination of studied markers (biometric characters, isoenzymes, albumins, globulins, seed physical properties and microsatellites) showed an important polymorphism at intra- and interspecific levels in both genera. No significant relationship between the environment of the collection site and morphological features was detected. A considerable number of species-specific bands were detected which can be used for the species identification. Both species *Medicago polymorpha* and *Trifolium campestre* were characterized by greater intraspecific genetic diversity whatever the marker. Species classification based on different approaches showed some consistencies and contradictions with conventional data based on morphological criteria. Both albumin and globulin fractions were characterized by a significant correlation between them. However, a lack of association was registered with distance matrices generated by the other markers. The detection of morphological, biochemical and molecular markers is of high interest in the perspective of selecting adapted genotypes and for conservation biodiversity.

Keywords: *Medicago* - *Trifolium* - Algeria - Genetic diversity - Morphology - Physical properties - Isozymes - Proteins - Microsatellite.

ملخص

الدراسة التي قمنا بها تتمثل في تقدير مدى التنوع الوراثي ضمن عدة أصناف برّية من نبات الفصّة (*Medicago*) ونبات الثقل (*Trifolium*)، وذلك بواسطة عدّة طرق: النمط الظاهري، الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية. وتستند هذه الدراسة على عينات كبيرة من الاصناف والافراد التي تنمو طبيعيا على مستوى شمال الجزائر. التنسيق بين الواسمات الوراثية المدروسة (الخصائص البيومترية، متشابهات الانزيم، الالبومين، الجلوبيولين، الخصائص الفيزيائية للحبوب والميكروسات) أظهر تباين مهم ضمن وبين الاصناف في كلا النوعين. أظهرت الدراسة المورفولوجية علاقة ضعيفة بين الخصائص البيومترية والظروف المناخية. الاصناف المدروسة تميزت بعدد من الواسمات الخاصة التي يمكن استخدامها كعلامات تحديد بين الاصناف. وتميزت كل من الأصناف: الفصّة متعددة الأشكال (*Medicago polymorpha*) والنفل حقلي (*Trifolium campestre*) بأكبر نسبة من التنوع الوراثي الداخلي مهما كانت الواسمة الوراثية المعنية. وأظهر التصنيف المستند على جميع المناهج المستعملة بعض الاتساق والتناقض مع بعض البيانات التقليدية على أساس المعايير الشكلية. وتميزت كل من الألبومين والجلوبيولين بارتباط كبير بينهما. عكس ذلك، لم يتم تسجيل أي علاقة لهذه البروتينات مع الواسمات الأخرى. الكشف عن العلامات المورفولوجية، والكيمياء الحيوية والعلامات الجزيئية هي ذات أهمية كبيرة لاختيار التراكيب الوراثية المناسبة ولحفظ التنوع البيولوجي.

كلمات مفتاحية: *Trifolium – Medicago* - التنوع الوراثي - الجزائر - النمط الظاهري - الخصائص الفيزيائية - أشباه الأنزيمات - بروتينات - ميكروسات.

Nom et Prénom : MEDOUKALI Imane		Date de soutenance :
Thème : Les genres <i>Medicago</i> L. et <i>Trifolium</i> L. en Algérie : Diversité morphologique, biochimique et moléculaire.		
Diplôme : Doctorat 3 ^{ème} cycle en Biotechnologies, Biologie et Environnement. Option « Biochimie et Biotechnologies »		
Résumé		
<p>L'étude de la diversité génétique des populations spontanées des genres <i>Medicago</i> et <i>Trifolium</i> est appréhendée par diverses approches phénotypiques, biochimiques et moléculaires. Cette étude repose sur un large échantillonnage de populations, réalisé selon un gradient bioclimatique dans le Nord Algérien. La combinaison des marqueurs étudiés (caractères biométriques, isoenzymes, albumines, globulines, propriétés physiques du grain et les microsattellites), a fait apparaître un polymorphisme important à l'échelle intra et interspécifique dans les deux genres. L'étude morphologique réalisée principalement à l'échelle interspécifique a mis en évidence une faible corrélation entre les caractères biométriques et les conditions bioclimatiques. Les espèces étudiées ont été caractérisées par un certain nombre de marqueurs spécifiques qui peuvent être utilisés comme marqueurs d'identification interspécifique. Les deux espèces <i>Medicago polymorpha</i> et <i>Trifolium campestre</i> ont été caractérisées par la plus grande diversité génétique intraspécifique quelque soit le marqueur. La hiérarchisation des espèces par les différentes approches a montré quelques consistances et quelques contradictions avec les données classiques basées sur les critères morphologiques. Les deux fractions albumines et globulines ont été caractérisées par une corrélation significative entre elles. Cependant, une absence d'association a été enregistrée avec les matrices de distances générées par les autres marqueurs. La mise en évidence de marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires revêt un grand intérêt pour la sélection de génotypes adaptés et pour la conservation de la biodiversité.</p>		
Mots clés : <i>Medicago</i> – <i>Trifolium</i> - Diversité génétique – Algérie – Morphologie - Propriétés physiques – Isoenzymes – Protéines - Microsattellites.		
Laboratoire de recherche : Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales - UFM		
Jury		
Président	A. BENSEGUENI	Prof. UFM Constantine
Directeur de thèse :	D. KHELIFI	Prof. UFM Constantine
Examineurs :	Y. BENHIZIA	Prof. UFM Constantine
	A. MEBARKIA	M.C. UFA Sétif
	Y. NECIB	Prof. UFM Constantine