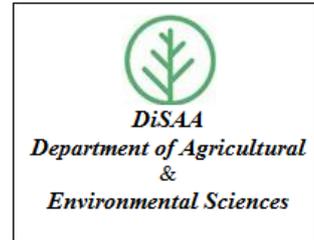




UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO



PhD Thesis

To get the title

DOCTOR

FROM THE UNIVERSITY OF TUNIS EL MANAR

Discipline : BIOLOGICAL SCIENCES (SPECIALIZATION: GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY)

FROM THE UNIVERSITY OF MILAN

Discipline : BIOLOGIA VEGETALE E PRODUTTIVITA' DELLA PIANTA COLTIVATA

Presented by

Mr. Mohamed NEJI

**Analysis of the genetic diversity of Tunisian
natural populations of *Brachypodium***

Defended : 20/01/2014

Scientific Committee

Mme. Neila Trifi Farah	UNIVERSITY OF TUNIS EL MANAR	Head
Mr. Salvatore Roberto Pilu	UNIVERSITY OF MILAN	Reviewer
Mr. Mohamed Elyes Kchouk	CRNTRE OF BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA	Reviewer
Mr. Stefano Bocchi	UNIVERSITY OF MILAN	Reviewer
Mr. Chedly Abdelly	CRNTRE OF BIOTECHNOLOGIE DE BORJ CEDRIA	Tutor
Mr. Filippo Geuna	UNIVERSITY OF MILAN	Tutor

Dedicace

*Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé
et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je
dédie cette thèse:*

*A mon très cher père **Houcine**
Il est et restera toujours un modèle pour moi. Il m'a tout
appris, tout donné. Mes actions, mes pensées, mes
gestes sont "imprégnés" de lui*

*À ma très chère mère **Fethia**
Son soutien, sa patience, sa confiance, sa générosité et
sa tendresse immense sont le moteur de mon avancée*

*À mes frères **Mokhtar et Farouk***

*À mes sœurs **Aicha, Sonia, Latifa et Ines***

*À tous les membres de la famille **Neji** sans aucune
exception.*

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à coeur

Remerciements

Voici donc venus les derniers mots de la thèse, ceux qui après un bilan du travail, laissent un peu de place à la période de ma vie que représente cette thèse, de nombreuses rencontres... dont certaines marqueront à jamais mon souvenir. J'espère que quelle que soit ma destinée future, les liens que j'aurai créés sauront survivre à la distance et aux nombreuses directions que la vie de chacun prend...

J'ai eu la chance de réaliser cette thèse en co-direction: deux directeurs, un co-directeur, deux laboratoires, deux environnements . . . J'ai donc évidemment beaucoup de monde à remercier, mais hélas, j'ai surtout deux fois plus de chances d'oublier quelqu'un!

Le travail de cette thèse est le fruit d'une convention en cotutelle entre l'Université de Tunis El Manar en Tunisie et l'Université de Milan en Italie. La présente étude a été réalisée au sein du Laboratoire des Plantes Extremophiles (LPE) au centre de Biotechnologie de Borj Cedria du côté Tunisien et au sein du laboratoire des Génétique Moléculaire au Département de l'agriculture et de sciences de l'environnement (DISAA) du côté italien.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance aux trois personnes qui m'ont encadré durant ces années de thèse. Durant ces quatre années, ils m'ont accordé leur confiance pour mener à bien ce travail et je les en remercie. Monsieur **Chedly ABDELLY**, Professeur au centre de Biotechnologie de Borj Cedria, qui malgré ses lourdes tâches m'a accueilli dans son laboratoire et m'a donné l'opportunité d'effectuer ce travail, de ses conseils scientifiques tout au long de la thèse, sa grande disponibilité, ces encouragements et de la confiance qu'il m'a accordée. Monsieur **Filippo GEUNA**, Professeur à l'Université de Milan, pour avoir assuré la codirection de ce travail, et de m'avoir apporté la rigueur scientifique nécessaire à son bon déroulement. Je le remercie également de m'avoir laissé une grande autonomie dans la gestion d'une grande partie de mon projet de thèse dans son laboratoire tout en y gardant un œil critique et avisé.

Je tiens à remercier tout spécialement Monsieur **Mhemmed GANDOUR**, Maître assistant à la Faculté des sciences et techniques de Sidi Bouzid, qui me guide depuis 2009 quand j'ai commencé mes activités de recherche comme un étudiant de Master. Je lui remercie pour l'orientation et la disponibilité pendant toutes les années de Master et de Doctorat ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordé pour mon travail. Ses expertises dans les domaines de la génétique et la biologie moléculaire, sa rigueur scientifique, ainsi que sa gentillesse, son soutien moral, sa patience ont grandement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je suis très reconnaissant et heureux d'avoir eu l'occasion de travailler avec une personne avec si grand professionnalisme.

Je remercie les membres du comité de thèse pour leurs conseils avisés et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. J'adresse mes remerciements surtout à Monsieur **Mohamed Elyes KCHOUK**, Professeur au centre de Biotechnologie de Borj Cedria, et Monsieur **Salvatore Roberto PILU**, Professeur à l'Université de Milan pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, à Monsieur **Stefano Bocchi**, Maître de conférence à la Faculté des sciences de Tunis pour avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse et à Madame **Neila Trifi Farah**, Professeur à la Faculté des sciences de Tunis, de présider le jury.

Un merci particulier à Messieurs **Wael TAAMALLI** et **Mounawer BADRI**, maitres assistants au centre de Biotechnologie de Borj Cedria. C'est toujours avec enthousiasme qu'ils m'ont accueilli dans leurs bureaux pour m'aider à progresser dans la réflexion scientifique. Je les remercie pour leurs aides techniques, les discussions fructueuses ainsi que ses précieux conseils qui m'auront permis d'approfondir mes connaissances en bioinformatique et en génétique moléculaire.

Une partie importante de ce travail concerne l'échantillonnage sur le terrain, qui s'est déroulé sur tout le territoire Tunisien et n'aurait été possible sans l'aide de Monsieur **Abderrazak SMAOUI**, maitre de conférences au centre de Biotechnologie de Borj Cedria. Ces moments partagés en dehors du laboratoire permettaient des échanges simples et amicaux ainsi que des discussions scientifiques très riches et fructueuses. Je tiens à lui exprimer ici ma gratitude et mon profond respect. Ses nobles qualités humaines et les conseils qu'ils n'ont cessé de me prodiguer durant ce travail m'ont permis de gagner en rigueur aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je remercie également :

- Professeur **Jean VOGEL** et docteur **Sean GORDON** du centre régional de recherche USDA-ARS à Californie - USA, pour ses contributions pour leurs support et collaboration.
- Madame **Pilar CATALAN**, Professeur à l'Université de Zaragoza, et Madame **Patricia GIRALDO**, Professeur à l'Université Polytechnique de Madrid - Espagne, pour leur collaboration.

J'adresse aussi mes remerciements à mes collègues au Département de l'agriculture et de sciences de l'environnement (DISAA) à l'Université de Milan **Remo Chiozzotto, Gabriella De Lorenzis, Giovanna Attanasio, Laura Rustioni, Barbara Biagini, Letizia Rocchi, Marina Bogicevic, Daniele Grosso, Igor Pacheco Cruz, Giacomo Cocetta, Paolo Carnevali** et **Paolo Krasnig ...** qui m'ont chaleureusement accueilli pendant environ 2 ans. Ces Personnes étaient mes collègues mais sont aujourd'hui des amis précieux. Ils m'ont inlassablement encouragé, supporté et soutenu durant toute la période que j'ai passé à Milan.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes collègues et amis au Centre de Biotechnologie de Borj Cedria pour leur aide et leur soutien.

Je souhaite remercier particulièrement au laboratoire des plantes extrémophiles

- Mes collègues: **Mondher, Nizar, Refki, Tawfik, Amine, Abd El Wahed, Samia, Hasna, Souhir, Raoudha, Faten, Mariem, Maroua, Rim, Rabaa, Yosra, Najla, Mejda, Soumaya ...**

- Messieurs **Saber Kouas, Karim Ben Hamed, Youssef Ouni, Ahmed Debez, Zouhaier Brahoumi, Riadh Ksouri, Kamel Hessini, Tahar Ghnaya, Mokded Rabhi, Wassim Azri, Walid Zorrig** et **Arafet Manaa ...**

Ma famille a également été d'un soutien sans faille. Peut-être arriveront-ils un jour à retenir le nom de la bestiole qui m'a occupé pendant les quatre ans de ma thèse! Mes chers parents, mes frères et mes sœurs, qui, chaque fois que je leur rendais visite me demandaient l'air inquiet : "Alors, cette thèse . . . Ça avance, Quand est-ce qu'elle finira?" sans trop vraiment

comprendre de quoi il pouvait bien s'agir! Même si vous n'avez jamais tenu des micropipettes ou faites tourner un logiciel de statistique ou un programme bioinformatique, cette thèse est autant la votre que la mienne. Merci pour vos sacrifices. Cette fois ça y est, votre patience va enfin être récompensée: le début de la suite commence . . .

Un merci particulier à mes cousins **Mohsen, Ali, Aymen** pour leur soutien financier et moral. Merci aussi pour les bons weekends et les soirées inoubliables à Paris.

Enfin, une pensée particulière à **Imen**. Merci pour toutes les rigolades et les soirées inoubliables à Paris et à Milan ... !

Ainsi s'achèvera cette interminable liste, et malgré sa longueur ... je sais avec certitude que j'ai oublié plein de personnes, peut-être même certaines pour lesquelles il devrait être évident que je souhaite les évoquer. Croyez bien que votre absence en ces lignes ne détermine rien d'autre que le stress et la fatigue final, alors que ceux que je n'ai pas cités veuillent bien m'en excuser.

Résumé

Les ressources fourragères tunisiennes ont connu dans la dernière decennie un important déclin, en raison de la succession des périodes de sécheresse, la desertification et les fortes activités anthropiques. Face à cette situation, la gestion des ressources génétiques naturelles disponibles est devenue indispensable et urgente. En raison de ses propriétés ecologiques, agronomiques et économiques, le genre *Brachypodium* a connu une popularité croissante et devenu un modèle pour les Poacées fourragères. Dans le but de définir une stratégie d'amélioration et de gestion des ressources génétiques des espèces du genre *Brachypodium* en Tunisie, 180 lignées du complexe *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* originaires de 9 populations ont été caractrisées morphologiquement et génétiquement. Les résultats ont montré que l'espèce allotetraploide *B. hybridum* est la plus répandue en Tunisie, alors que les deux espèces diploides *B. distachyon* et *B. stacei* sont moins fréquentes. L'analyse de la diversité morpho-génétique des trois espèces par 18 traits morphophénologiques et 15 marqueurs SSR a mis en évidence une variabilité intraspécifique importante contrebalancée par une très faible variabilité interspécifique. Cependant, l'espèce allotetraploide *B. hybridum* s'avère plus variable morphologiquement et génétiquement que ses deux espèces parentales.

Chez *B. hybridum*, l'analyse du polymorphisme phénotypique a montré une grande variation morphologique entre les populations et les éco-régions pour tous les caractères étudiés. Cette variation est plus importante chez les caractères liés à l'appareil reproducteur (34,8%) que chez les caractères liés à l'appareil végétatif (32,8%). L'héritabilité des traits analysés est variable, elle a une moyenne de 0,64. Les populations Aindrahem et Jbel Zaghouan sont les plus différenciées avec un coefficient de différenciation morphologique Q_{st} de = 0.61, alors que Haouria et Raouad sont les moins différenciées ($Q_{st} = 0.1$). Les résultats ont montré aussi que la différenciation morphologique entre les populations n'est pas liée à leurs distances géographiques ni aux différences d'altitude.

Les analyses réalisées par les marqueurs microsatellites (SSR) et les marqueurs Insertion/Deletion (InDels) ont montré que les populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum* sont caractérisées par une grande variabilité génétique. En utilisant les marqueurs SSR, le taux de polymorphisme est de 100% et la diversité génétique de Nei (hétérozygotie attendue) est de 0.79, respectivement tandis que pour les marqueurs InDels, ces deux paramètres étaient de l'ordre de 90% et 0.35, respectivement. Cette grande variabilité génétique est accompagnée par un flux génique inter-populationnel relativement important

($Nm > 2$) qui favorise une répartition homogène de la variabilité génétique entre les populations et une différenciation génétique relativement faible entre eux. En effet, en utilisant les deux marqueurs, l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a montré que la variation génétique intra-population est largement supérieure à celle entre les populations. Le niveau de différenciation génétique entre les populations était de l'ordre de 2% pour les marqueurs SSR ($\Phi_{PT} = 0.023$) et de 20% pour les marqueurs InDels ($\Phi_{PT} = 0.196$). L'analyse de la structure génétique par des méthodes multivariées (ACoP, AFC, CHA) et une approche bayésienne a montré que les populations peuvent être classées en trois unités génétiques distinctes avec une quasi absence de l'effet des distances géographiques et des différences d'altitude sur la structure génétique spatiale des populations.

Globalement, les résultats des approches morphologiques et moléculaires concordent et montrent que le flux génique, par le biais d'une dispersion des grains à longue distance joue un rôle important dans la structuration génétique des populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum*. Toutefois, l'indice de la différenciation morphologique entre les populations (Q_{st}) était largement supérieur à celui révélée par les marqueurs moléculaires (Φ_{PT}), ce qui suggère que, en plus du flux génique, la sélection naturelle joue un rôle incontournable dans la structuration génétique des populations tunisiennes de *B. hybridum*. Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans cette thèse nous ont permis d'avancer quelques hypothèses sur la triple relation entre la variabilité phénotypique, le polymorphisme génétique et l'amplitude écologique de *B. hybridum* en Tunisie. Nous suggérons ainsi une investigation plus approfondie en matière de recherche, pour bien mettre en valeur les propriétés agronomique, écologique et économique de cette espèce.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I- PRESENTATION LA FAMILLE DES POACEES	5
1- Les Poacées : Une famille majeure cosmopolite.....	5
2- L’histoire évolutive de la famille des Poacées.....	5
3- Intérêts des Poacées	8
3-1- Utilité pastorale et écologique	8
3-2- Utilité thérapeutique	8
3-3- Utilité alimentaire et humaine	9
4- Description générale de Poacées	9
4-1- Morphologie	9
4-1-1. La morphologie de l’appareil végétatif	9
4-1-2. La morphologie de l’appareil reproducteur.....	10
4-2- La reproduction chez les Poacées	11
4-2-1. La reproduction asexuée chez les Poacées	11
a- La reproduction végétative	11
b- Agamospermie	12
4-2-2. La reproduction sexuée chez les Poacées.....	12
a- L’autopollinisation (Autogamie).....	12
b- La pollinisation croisée (Allogamie)	12
4-3- Les Poacées en Tunisie	13
II- LA POLYPLOÏDIE CHEZ LES PLANTES	14
1- Mécanismes de formation des polyploïdes.....	15
2- Effets de la polyploïdie.....	16
III- L’HYBRIDATION ET LES COMPLEXES DES ESPECES DANS LE REGNE VEGETAL	17
1- DEFINITION DES COMPLEXES D’ESPECES	17
2- LES COMPLEXES D’ESPECES DANS LE REGNE VEGETAL	18
3- L’HYBRIDATION ET LA POLYPLOÏDIE CHEZ LES POACEES	18
IV- LE GENRE <i>BRACHYPODIUM</i>	19
1- Histoire taxonomique.....	19
2- Relations entre <i>Brachypodium</i> et les autres genres des Poacées	20

3-	La morphologie de <i>Brachypodium</i>	21
4-	La cytologie de <i>Brachypodium</i>	22
5-	Polypléidisation et hybridation dans le genre <i>Brachypodium</i>	22
6-	Répartition géographique du genre <i>Brachypodium</i>	23
7-	Le genre <i>Brachypodium</i> : Modèle pour les Poacées	25
7-1-	<i>Brachypodium distachyon</i> : modèle pour les céréales et les Poacées fourragères	25
7-2-	Description botanique de <i>B. distachyon</i>	26
7-3-	Caractéristiques biologiques de <i>Brachypodium distachyon</i>	27
7-4-	Intérêts de <i>Brachypodium distachyon</i>	29
V-	ANALYSE DE LA DIVERSITE GENETIQUE	29
1-	Notion de la diversité génétique	29
2-	Méthodes d'analyse de la diversité génétique	30
2-1-	Les approches morphologiques	30
2-2-	Les approches biochimiques: Les allozymes.....	31
2-3-	Les approches moléculaires à base d'ADN	32
2-3-1.	Les marqueurs dominants.....	33
a-	Les marqueurs RAPD (Radom amplified Polymorphic DNA).....	33
b-	Les marqueurs AFLP (Amplified fragment length polymorphism)	34
2-3-2.	Les marqueurs co-dominants	35
a-	Les marqueurs RFLPs (Restricted Fragment Length Polymorphism)	35
b-	Les marqueurs SNPs (Single nucleotide polymorphism)	35
c-	Les marqueurs InDels (INsertions/Délétions)	36
d-	Les marqueurs microsatellites (SSR)	36
3-	Les facteurs influençant la dynamique de la diversité génétique	37
3-1-	Facteurs d'ordre biologique : Les systèmes de reproduction	37
3-2-	Les facteurs d'ordre génétique : Les forces évolutives	38
3-2-1.	Les mutations	38
3-2-2.	La dérive génétique	39
3-2-3.	La migration (Flux des gènes).....	40
3-2-4.	La sélection naturelle	41
3-3-	Les facteurs démographiques	44
3-3-1.	La taille efficace des populations	44
3-3-2.	Les changements démographiques.....	44
3-4-	Les facteurs biophysiques.....	45

MATERIEL ET METHODES 44

I-	MATERIEL VEGETAL	44
1-	Prospection et collecte	44
2-	Mise en culture	47
3-	ANALYSE DE LA VARIABILITE MORPH-PHENOLOGIQUE	48
3-1-	Caractères morphologiques étudiés dans les conditions expérimentales	48
3-2-	Traitement des données et analyses statistiques	50
3-2-2.	Corrélation entre les caractères.....	50
3-2-3.	L'analyse de la variance (ANOVA).....	51
3-2-4.	Estimation de l'héritabilité des caractères	51
3-2-5.	Indice de différenciation morphologique (Qst)	52
3-3-1.	Analyse en Composantes Principales (ACP).....	53

3-3-3. Classification Hiérarchique Ascendante.....	54
3-4- Le Test de Mantel	55
4- ANALYSE DE LA VARIABILITE MOLECULAIRE	55
4-1- Extraction de l'ADN génomique.....	55
4-2- Quantification d'ADN	56
4-3- Identification des lignées de <i>Brachypodium</i> étudiées	56
4-4- Le protocole expérimental adopté pour les analyses microsatellites (SSR).....	57
4-4-1. Choix des amorces utilisées.....	57
4-4-2. Amplification par PCR	57
4-4-3. Description du protocole d'amplification PCR de type « M13 »	58
4-4-4. Protocole d'amplification systématique avec la méthode M13	59
4-4-5. Génotypage par microsatellites	60
4-5- Le protocole expérimental adopté pour les analyses des InDels.....	61
4-5-1. Choix des amorces InDels	61
4-5-2. Optimisation de protocole d'amplification par PCR des InDels	61
4-5-3. Analyse des résultats de génotypage par InDels	62
5- Méthodes d'analyses statistiques	63
5-1- Analyse de la diversité génétique	63
6- Analyse de la structure génétique	63
6-1- L'Analyse Moléculaire de la Variance (AMOVA)	63
6-2- Le Flux génique	64
6-4- Analyse en coordonnées principales (ACoP)	65
6-6- Analyse factorielle des correspondances (AFC).....	65
6-7- Les tests de Mantel (simple et partiel)	66
6-7-1. Analyse Bayésienne	66
CHAPITRE I	68
IDENTIFICATION ET DIVERSITE GENETIQUE DU COMPLEXE D'ESPECES <i>B. DISTACHYON</i>, <i>B. STACEI</i> ET <i>B. HYBRIDUM</i> EN TUNISIE	68
I- INTRODUCTION	67
II- MATERIEL ET METHODES	67
III- RESULTATS	68
1- Identification des lignées de <i>Brachypodium spp</i> étudiées.....	68
2- Caractérisation de la variabilité morphologique du complexe <i>B. distachyon</i>, <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i>	70
2-1- Analyse de la variance	70
2-2- Analyse factorielle discriminante	71
2-1- Analyse en composante principale (ACP).....	74
3- Analyse de la variabilité moléculaire du complexe <i>B. distachyon</i>, <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i>	76
3-1- Analyse de la diversité génétique	76
3-2- Relations phylogénétiques entre les trois espèces	77
4- Discussion des résultats	79
4-1-Identification des espèces et évaluation de leurs fréquences sur le territoire tunisien... 79	

4-2- Variabilité morpho-phénologique du complexe d'espèces <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i> en Tunisie.....	81
4-3- Analyse de la variation moléculaire de complexe d'espèces <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i> à l'aide des marqueurs SSR	83
CHAPITRE II	85
ETUDE DE LA VARIABILITE MORPHO-PHENOLOGIQUE DES POPULATIONS TUNISIENNES DE <i>BRACHYPODIUM HYBRIDUM</i>	85
I- INTRODUCTION	84
II- APERÇU SUR LES METHODES UTILISEES	85
III- LES PRINCIPAUX RESULTATS	86
IV- ARTICLE	88
MORPHO-PHENOLOGICAL DIVERSITY AMONG TUNISIAN NATURAL POPULATIONS OF <i>BRACHYPODIUM HYBRIDUM</i>	88
CHAPITRE III	100
ANALYSE DE LA DIVERSITE ET LA STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS TUNISIENNES DE <i>BRACHYPODIUM HYBRIDUM</i> A L'AIDE DES MARQUEURS MICROSATELLITES	100
I- INTRODUCTION	101
II- APERÇU SUR LA METHODOLOGIE ET LES ANALYSES ADOPTEES	102
III- PRINCIPAUX RESULTATS	102
IV- ARTICLE	103
CHAPITRE IV	132
SYTENIC <i>BRACHYPODIUM</i> INDELS AS A NEW SOURCE OF MARKERS FOR <i>B. HYBRIDUM</i>: GENETIC AND ECOGEOGRAPHIC STRUCTURE IN <i>B. HYBRIDUM</i>	132
I- INTRODUCTION	133
II- MATERIELS ET METHODES	134
III- LES PRINCIPAUX RESULTATS	134
IV- ARTICLE	136
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	158
1- Problématique de la thèse.....	158
1- Le complexe des espèces <i>B. distachyon</i>, <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i> en Tunisie : Variabilité morphologique et génétique	159
2- Variabilité morpho-génétique de <i>B. hybridum</i> en Tunisie.....	160

3- Comparaison entre la caractérisation moléculaire par microsatellites (SSR) et la caractérisation par InDels	162
4-Corrélation entre la caractérisation phénotypique et la caractérisation moléculaire	164
5- Conclusions	166
6- Perspectives	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	170
ANNEXE	196

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Relations phylogénétiques entre les sous familles de Poacées d'après Grass Phylogeny Working Group II (2012).	6
Figure 2: Évolution de la structure des chromosomes du blé, du riz et du sorgho à partir des 5 chromosomes ancestraux (Salse <i>et al.</i> 2008).....	7
Figure 3: La morphologie des Poacées	11
Figure 4: A : Evolution des emblavures céréalière en Tunisie ; B : Evolution des surfaces des 5 céréales majeures en Tunisie. (Source : Observatoire National de l'Agriculture (ONAGRI, 2010))	14
Figure 5: Différentes voies de formation des polyploïdes (Comai, 2005).....	16
Figure 6: Relations phylogénétiques entre <i>Brachypodium distachyon</i> et des céréales d'importance économique (Opanowicz <i>et al.</i> 2008)	21
Figure 7: Distribution géographique de <i>B.pinnatum</i> (Grassland, 2012).....	24
Figure 8: Distribution géographique de <i>B. sylvaticum</i> (Grassland, 2012)	24
Figure 9: Distribution géographique du complexes d'espèces : <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i> (Bleu : <i>B. distachyon</i> ; Rouge : <i>B. stacei</i> ; Jaune : <i>B. distachyon</i> + <i>B. stacei</i> ; Vert : <i>B. distachyon</i> + <i>B. hybridum</i> ; Rose : <i>B. stacei</i> + <i>B. hybridum</i> ; Mauve : Les 3 espèces ensemble) (Catalan <i>et al.</i> , 2012).....	25
Figure 10: La morphologie de <i>B. distachyon</i>	26
Figure 11: Variabilité morphologique de <i>B. distachyon</i> : A- Au niveau de l'appareil végétatif ; B- Au niveau de l'inflorescence ; C : Au niveau des grains	27
Figure 12: Les modes de dispersion des graines ou du pollen en fonction des distances géographiques.....	41
Figure 13: Illustration des différentes formes de sélection au niveau moléculaire au sein d'une population, d'après Audigeos (2010) : (A) la sélection purifiante élimine rapidement les mutations défavorables, (B) la sélection positive fixe rapidement les mutations favorable et (C) la sélection balancée maintient plusieurs mutations bénéfiques en fréquence intermédiaire.	43
Figure 14: Répartition géographique des neuf populations étudiées de <i>Brachypodium spp</i>	46
Figure 15: La morphologie de l'appareil végétatif de deux individus de <i>Brachypodium</i> ..	49
Figure 16: La morphologie de l'appareil reproducteur (Inflorescence) de 4 individus de <i>Brachypodium</i>	49
Figure 17: électrophorétiques des produits d'amplification des ADN génomiques de <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i> avec le marqueur ALB 165	57
Figure 18: Étapes d'amplification PCR avec l'amorce fluorescente M13 (M13).....	59
Figure 19: (De gauche à droite) (1) électrophorèse de la poule A pour un échantillon, les flèches indiquent les signaux détectés de marqueurs microsatellites de la première poule: ALB008, ALB30, ALB034 ALB040 ALB056 ALB086 ALB087 ALB089 and ALB158 (2) électrophorèse de la poule B pour un échantillon, les flèches	

indiquent les signaux détectés de marqueurs microsatellites de la deuxième poule: ALB131, ALB139, ALB100, ALB230, ALB256, ALB257, ALB372, ALB445.....	61
Figure 20: Résultats d'amplification de quelques lignées tunisiennes de <i>Brachypodium spp</i> avec le marqueur ALB 165 sur gel d'agarose 2%.....	68
Figure 21: proportion des trois espèces <i>B. distachyon</i> , <i>B. stacei</i> et <i>B. hybridum</i> en Tunisie.	69
Figure 22: Projection des 180 lignées de <i>Brachypodium spp</i> dans l'espace formée par les deux axes de l'analyse discriminante	72
Figure 23: Graphiques de Box et whisker montrant le niveau de variation de 18 traits morphologiques analysés à l'échelle intra et interspécifique.....	75
Figure 24: Analyse en composante principale des 180 lignées de <i>Brachypodium</i> sur la base des 18 traits morpho-phenologiques.....	76
Figure 25: Analyse Factorielle des Correspondances basée sur des données moléculaires de 15 marqueurs SSR pour les 180 lignées de <i>Brachypodium</i>	78
Figure 26: Inférence de la structure génétique de 180 lignées grâce aux simulations réalisées sur les données 15 SSR par le programme STRUCTURE : Evolution de ΔK en fonction de K (Evanno et al. (2005)).....	78
Figure 27: La structure génétique des 180 lignées de <i>Brachypodium spp</i> analysées déterminée à l'aide du programme STRUCTURE.....	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques détaillées de *Brachypodium distachyon* 28

Tableau 2: Principaux paramètres écologiques des 9 populations Tunisiennes de *Brachypodium spp.*..... 45

Tableau 3: Matrice des distances géographiques (au dessus de la diagonale) et matrice des différences d'altitude (au dessous de la diagonal) par paires de populations. (ALT : Differences d'altitude ; D.G : Distances géographiques)..... 46

Tableau 4: La composition de la solution nutritive en macroelements (Hewitt, 1966).... 47

Tableau 5: La composition de la solution nutritive en Fer et en oligoelements (Hewitt, 1966) 47

Tableau 6: Les 18 caractères morpho-phenologiques étudiés..... 48

Tableau 7: Le nombre des individus de *B. distachyon* *B. stacei* et *B. hybridum* dans les 9 populations étudiées..... 70

Tableau 8: Les moyennes, écarts types, coefficients de la variation et le niveau de significativité des 18 traits morphologiques analysés. 73

Tableau 9: Indices de la diversité génétique basés sur les analyses effectuées par les 15 SSR sur les trois espèces (Ar : richesse allelique ; Na : nombre d'allèles observés ; Ne : nombre effectif d'allèles ; Np : nombre d'allèles privés ; I : indice de Shanon ; Ho : hétérozygotie observée ; He : hétérozygotie attendue ; %P : taux de polymorphisme)..... 77

Tableau 10: Comparaison entre les résultats obtenus par les 15 SSR et les 8 InDels.... 164

LISTE DES ABREVIATIONS

°C: Degré Celsius
ACP: Analyse en Composantes Principales
ADN: = DNA: Acide désoxyribonucléique
AFD: Analyse Factorielle Discriminante
AFLP: Amplified fragment length polymorphism
AMOVA: Analysis of Molecular variance
ANOVA: Analysis of Variance
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
BES: BAC end sequences
BrEt: Bromure d'Ethidium
CAH: Classification Hiérarchique Ascendante
dNTP: Didéoxynucléotides tri-phosphate
EDTA: Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EST: Expression-Sequence-Tag
F: Forward
H²: Héritabilité génotypique
InDel: Insertions/Délétions
IPGRI: International Plant Genetic Resources Institute
km: Kilomètre
m: mètre
MgCl₂: Magnesium Chloride
ml: millilitre
mM: millimolaire
NaCl: Chlorure de Sodium
ng: nonnogramme
Nm: Flux génique
nm: nanomètre
nM: nonnoMolaire
pb: Paires de bases
PCR: Polymerase Chain Reaction
Qst: Indice de différenciation morphologique
R: Reverse
RAPD: Random amplified Polymorphic DNA
RFLP: Restricted Fragment Length Polymorphism
RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR
SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
SNPs: Single nucleotide Polymorphism
SSR: Simple Sequence Repeats (microsatellites)
TBE: Tris Boric EDTA
Tm: Temperature de Fusion
tr/m: Tour/minute

USDA: United States Department of Agriculture

UV: Ultra Violet

v: Volume

μ l: microlitre

σ^2_E : variance environnementale

σ^2_G : la variance génotypique

σ^2_p : variance phénotypique

σ^2_{pbp} : variance inter-population

σ^2_{pwp} : Variance intra-population

Φ_{PT} : Indice de la differenciation génétique

INTRODUCTION GENERALE

La région méditerranéenne abrite une diversité biologique de première importance. La plupart des espèces de la flore spontanée, en Afrique du Nord notamment, est remarquablement résistante et bien adaptée à la sécheresse et à la salinité et constitue une part non négligeable des ressources génétiques locales à valeurs pastorale, fourragère, alimentaire, aromatique et médicinale (Abdelguerfi et Laouar, 1999; Ohba et Amirouche, 2003).

Grâce à sa position géographique privilégiée dans la région méditerranéenne et grâce à la diversité de son relief et de l'impressionnant gradient bioclimatique Nord-Sud qui la caractérise, la Tunisie présente une grande diversité bioécologique et une gamme très importante de milieux naturels, ce qui a suscité l'intérêt des chercheurs pour les ressources phytogénétiques tunisiennes. En plus de leurs intérêts économiques et écologiques certains, ces ressources offrent des opportunités exceptionnelles pour l'évaluation et pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la diversification et l'adaptation des plantes en relation avec l'évolution de leur environnement. Les espèces fourragères et pastorales spontanées en représentent un bon exemple. En effet, la flore tunisienne est extrêmement riche en diverses espèces spontanées souvent consommées par les animaux vu leur potentiel fourrager important et leurs capacités à s'adapter à différentes conditions climatiques sévères (Zoughlami et *al*, 2004). Ces espèces peuvent faire l'objet de culture ou d'introduction au niveau des jachères et / ou dans la réhabilitation des terres de parcours dans les zones dégradées. Toutefois, les ressources fourragères tunisiennes ont connu ces dernières années un important déclin, en raison des changements climatiques et de la succession des périodes de sécheresse, aggravées par une forte activité anthropique. Par ailleurs, la gamme des espèces fourragères cultivées en Tunisie reste limitée et ne satisfait que 18 % des besoins énergétiques du cheptel (Zouaghi, 2001). Face à cette situation, la recherche de nouvelles espèces fourragères et pastorales spontanées locales, à travers la collecte, l'évaluation et la préservation des ressources génétiques locales s'impose donc comme un préalable au développement de nouvelles ressources fourragères.

L'exploitation des *Poacées* comme source de fourrages est privilégiée, en raison l'abondance et de la richesse de cette famille de plantes dans toutes les régions du pays ainsi que leur importance de point de vue valeur nutritionnel et de production de biomasse. En effet, la flore végétale tunisienne est extrêmement riche en *Poacées* spontanées fourragères d'une grande valeur tant du point de vue économique que de la durabilité de l'exploitation agricole durable.

Au sein de la famille des *Poacées*, le genre *Brachypodium spp*, a connu une popularité croissante en raison de ses attributs multiples. Ce genre constitue un groupe d'environ 26 espèces annuelles et pérennes largement distribuées dont les centres de diversification recouvrent le bassin méditerranéen et l'Eurasie (Draper 2001; Hasterok, Draper et al. 2004; Vogel, Gu et al. 2006). En plus de leurs capacités à supporter des conditions de température et de sécheresse extrêmes, les espèces *Brachypodium* ont un intérêt fourrager, une bonne aptitude à coloniser les milieux difficiles, une capacité à réhabiliter les sols dégradés et une bonne résistance aux contraintes biotiques et abiotiques. Le complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* sont sans doute les espèces les plus importantes dans le genre *Brachypodium*. L'espèce diploïde *B. distachyon* ($2n = 10$) est devenue un modèle pour les *Poacées* fourragères en général et les céréales en particulier en raison de son petit génome récemment séquencé (270-300 Mb) (IBI, 2010), son cycle biologique très court (8-12 semaines), sa petite taille (15 cm) (Vogel et al, 2006), sa grande parenté aux céréales les plus importantes dans le monde (l'orge, le blé, le riz et el sorgho) (Garvin et al. 2008) et aussi son potentiel comme biocarburant (Opanowicz et al. 2008; Mur et al. 2011). Une importance marquée à été accordée aux *B. stacei* ($2n = 20$) et *B. hybridum* ($2n = 30$). Ces deux dernières ont été considérées comme deux cytotypes issue d'une série d'autopolyploïdie¹ de l'espèce *B. distachyon*. Récemment, en se basant sur des approches morphologiques, cytogénétiques et moléculaires, Catalan et al. (2012) ont montré que *B. hybridum* n'était qu'une autre espèce allotétraploïde issue d'une hybridation interspécifique entre les deux espèces diploïdes *B. distachyon* ($2n = 10$) et *B. stacei* ($2n = 20$). Toutefois, il est difficile d'identifier taxonomiquement les espèces de ce complexe à partir simplement des caractéristiques morphologiques en raison d'une forte stase morphologique (ou de la convergence), d'une forte plasticité phénotypique, et de phénomènes d'hybridation interspécifique. Ces espèces se différencient le plus souvent par leur habitat, leur distribution géographique ou des caractères subtils.

¹ Voir les détails sur l'autopolyploïdie dans la page 14 (Synthèse bibliographique)

Si l'importance agronomique, économique, et aussi écologique de ce complexe des espèces est indéniable, la variabilité génétique des populations naturelles est encore peu connue. La connaissance de ce paramètre est indispensable à la définition de stratégies de conservation, de gestion, et d'utilisation des ressources génétiques. L'étude des relations phylogénétiques et la structure génétique spatiale de ce complexe des *Brachypodium* a montré que l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* est la plus polymorphe et la plus dominante du point de vue répartition géographique dans le bassin méditerranéen, probablement en relation avec sa grande amplitude écologique, son niveau de ploïdie et sa reproduction autogame dominante (Alvarez lopez et al, 2013).

En Tunisie, le genre *Brachypodium* est représenté par *B. Phoenicoides*, *B. reutesum*, *B. pinnatum*, *B. sylvaticum* et le complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* (Dahaou et al, 2010). En raison de son origine méditerranéenne et sa grande amplitude écologique, *B. hybridum* est sans doute l'espèce la plus répandue en Tunisie. Son aire de répartition géographique, caractérisée par un climat contrasté, s'étend de l'étage bioclimatique aride jusqu'à l'étage bioclimatique subhumide. Toutefois, il n'existe pas au niveau tunisien, une collection centralisée de génotypes qui permettrait de conserver et d'utiliser le matériel génétique adapté aux différentes conditions climatiques de la Tunisie. En l'absence d'une telle collection convenablement caractérisée phénotypiquement et génotypiquement, il est difficilement concevable de développer un programme d'exploitation des ressources génétiques de *B. hybridum*.

Dans le cadre de l'exploration et la valorisation des ressources phylogénétiques tunisiennes, et la recherche d'espèces prometteuses pour la production de fourrage et l'amélioration de la valeur pastorale des parcours dans les zones marginales et les biotopes salins et/ou arides en Tunisie, et persuadé de l'intérêt accordé actuellement à la valeur agronomique, économique, et aussi écologique du genre *Brachypodium*, nous nous proposons d'analyser la diversité génétique des populations naturelles de 3 espèces de *Brachypodium*, de rechercher les processus qui génèrent et entretiennent sa structure génétique spatiale en utilisant des marqueurs morpho-phenologiques et moléculaires, et ce, afin d'obtenir une collection caractérisée phénotypiquement et génotypiquement de *Brachypodium* en Tunisie.

Notre travail a été initié en Juillet 2010 par une prospection du territoire national et une localisation des populations des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*, afin d'avoir des populations représentatives de tous les étages éco-climatiques de la Tunisie. Vu que la

distinction morphologique de ces espèces (*B. hybridum* et les deux ‘progéniteurs’ diploïdes *B. distachyon*, *B. stacei*) est difficile, nous avons collecté aléatoirement 180 accessions de ces espèces à partir de 9 localités à raison de 20 lignées par population.

Le premier chapitre de cette thèse (Chapitre I) a été consacré à l'étude de la variabilité morphologique et génétique du complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* en Tunisie à l'aide de 18 traits morpho-phénologiques et 15 marqueurs microsatellites. L'identification des accessions analysées et la différenciation entre les trois espèces ont été réalisées à l'aide d'une approche moléculaire développée par Giraldo et al (2012).

Dans le deuxième chapitre (Chapitre II), nous avons analysé la variabilité phénotypique des populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum* à l'aide 18 traits morpho-phénologiques. Ensuite, nous avons procédé dans deux autres chapitres. Les chapitres III et IV ont été consacré à la caractérisation moléculaire de *B. hybridum* en Tunisie à l'aide 15 SSR et 8 InDels.

I- Présentation la famille des Poacées

1- Les Poacées : Une famille majeure cosmopolite

La famille des Poacées constitue une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures. Cette famille occupe la 5^{ème} place dans la liste des familles les plus riches avec plus de 700 genres et 12 100 espèces, après les *Orchidaceae* (26 500), les *Asteraceae* (23 000), les *Fabaceae* (19 400) et les *Rubiaceae* (13 500) (Kellog, 2001). En revanche, la famille des *Poacée* est probablement la famille la plus importante en termes de biomasse produite, d'impact écologique et de productivité agricole. Beaucoup d'espèces de cette famille ont la possibilité de former des populations denses et très étendues. Elles déterminent ainsi le paysage végétal (pelouses alpines, prairies, pâturages, steppes, savanes, etc) dans de nombreuses parties du monde. On estime que la surface des terres couvertes par les Poacées, représente entre 31 et 43% de l'ensemble des terres émergées (hors Groenland et Antarctique).

Les Poacées sont une des familles les plus cosmopolites. On les trouve sur tous les continents, y compris en Antarctique, depuis les zones équatoriales jusqu'au cercle polaire et depuis les bords de mer jusqu'au sommet des montagnes.

2- L'histoire évolutive de la famille des Poacées

Par rapport à l'origine des Angiospermes, qui ont divergé il y a 145 millions d'années (Ma), au début du Crétacé ou au dernier à la fin du Jurassique, l'origine des *Poacée* est beaucoup plus récente (80-85 Ma) (Prasad *et al.*, 2005). Les dates de divergence de plusieurs espèces de *Poacées* ont été estimées sur la base de la comparaison des séquences des gènes orthologues d'acetyl-CoA carboxylase (Acc-1 et Acc-2) présents généralement en une seule copie dans les *Poacées* (Huang *et al.* 2002, Chalupska *et al.* 2008). Ces analyses ont servi de référence pour calibrer la divergence moléculaire et calculer les divergences entre les espèces de *Poacées*. Actuellement, les *Poacées* sont divisées en deux grands clades (Figure 1) :

- le clade BEP: composé des sous familles des *Bambusoideae*, *Pooideae* et *Ehrhartoideae*. Il est apparu il y a 53 M et comprend uniquement des plantes en C3.
- le clade PACMAD: composé des sous familles des *Panicoideae*, *Arundinoideae*, *Chloridoideae*, *Micrairoideae*, *Aristidoideae* et *Danthonioideae*. Les sous familles présentent

probablement une photosynthèse de type C4.

Selon Paterson *et al.* (2004), les deux clades BEP et PACMAD ont divergé à partir des 3 sous familles ancestrales : les *Anamachlooideae*, les *Pharoideae* et les *Puelioideae* il y a 50 à 70 millions d'années. Au sein du clade PACMAD, l'ancêtre commun du maïs et du sorgho serait apparu il y a entre 29 et 12 millions d'années, date de la divergence entre ces deux espèces (Paterson *et al.*, 2004; Swigonova *et al.*, 2004). La sous famille des *Chloridoideae* est encore peu étudié, néanmoins, Kim *et al.* (2009) les placeraient avec les *Panicoideae* de 34,6 à 38,5 millions d'années.

La phylogénie des *Poacée* a été intensément étudiée notamment à travers l'apparition de la physiologie en C4 (Kellogg, 2001).

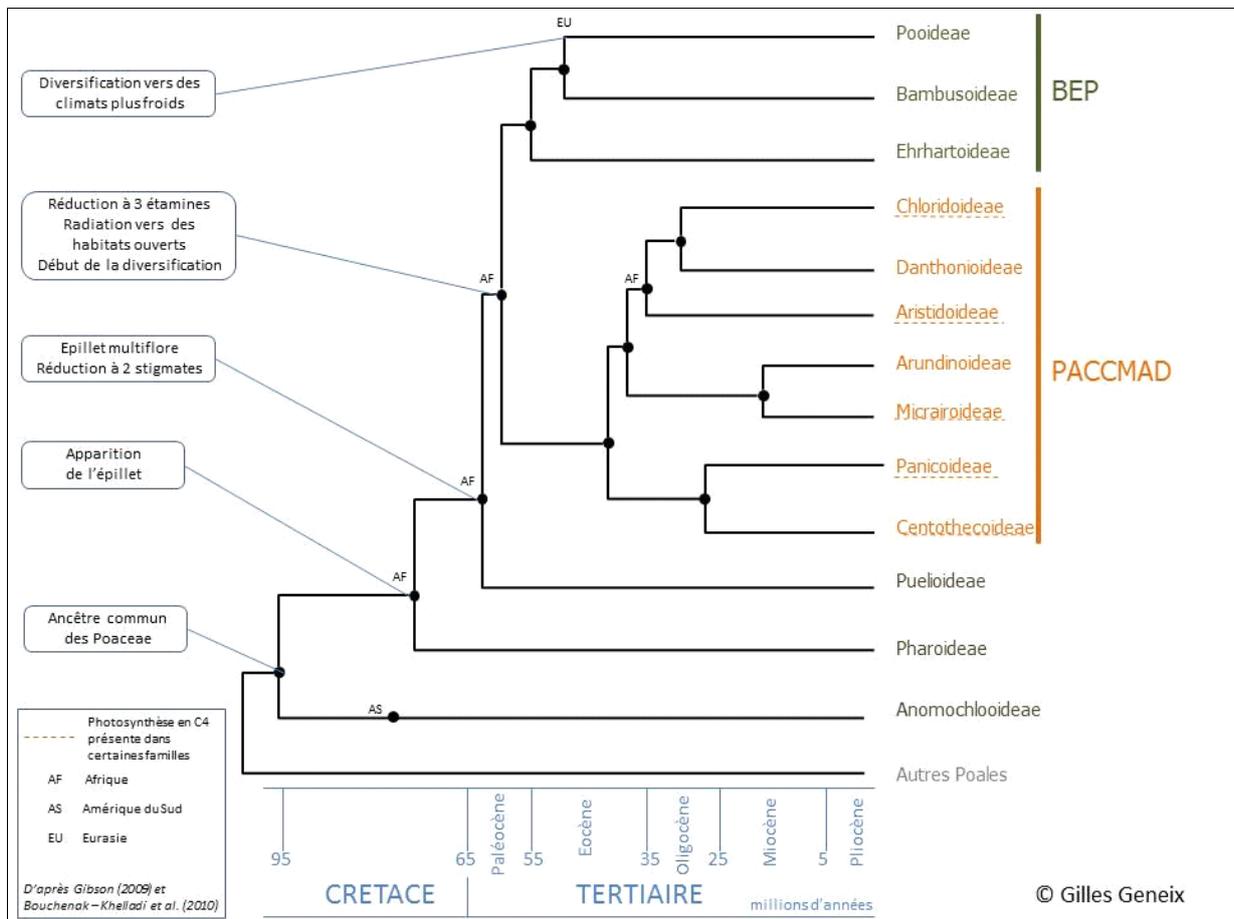


Figure 1: Relations phylogénétiques entre les sous familles de Poacées d'après Grass Phylogeny Working Group II (2012).

Evolution des chromosomes des Poacées à partir de cinq chromosomes ancestraux

Le développement de la génomique fonctionnelle chez les Poacées modèles tel que le sorgho, le riz, le blé et *Brachypodium* a permis de mettre en évidence un grand nombre de duplications et de translocations inter chromosomiques permettant ainsi la reconstruction de l'évolution des chromosomes et la compréhension de la diversification des espèces des *Poaceae*. En effet, afin de déduire les duplications entre les chromosomes du riz, du blé et leurs relations de colinéarité avec le maïs et le sorgho (sous famille des *Panicoideae*), Salse et ses collaborateurs (2008) ont utilisé une méthode d'alignement de séquences orthologues et ont établi un ancêtre commun à 5 chromosomes ayant subi un événement de duplication génomique, il y a 50 à 70 millions d'années (Salse *et al.* 2008) (Figure 2). Les analyses du génome de *Brachypodium* ont révélé que l'insertion de chromosomes entiers dans les centromères d'autres chromosomes représente un mécanisme majeur de la variation du nombre de chromosomes chez les Poaceae. (The International Brachypodium Initiative 2010).

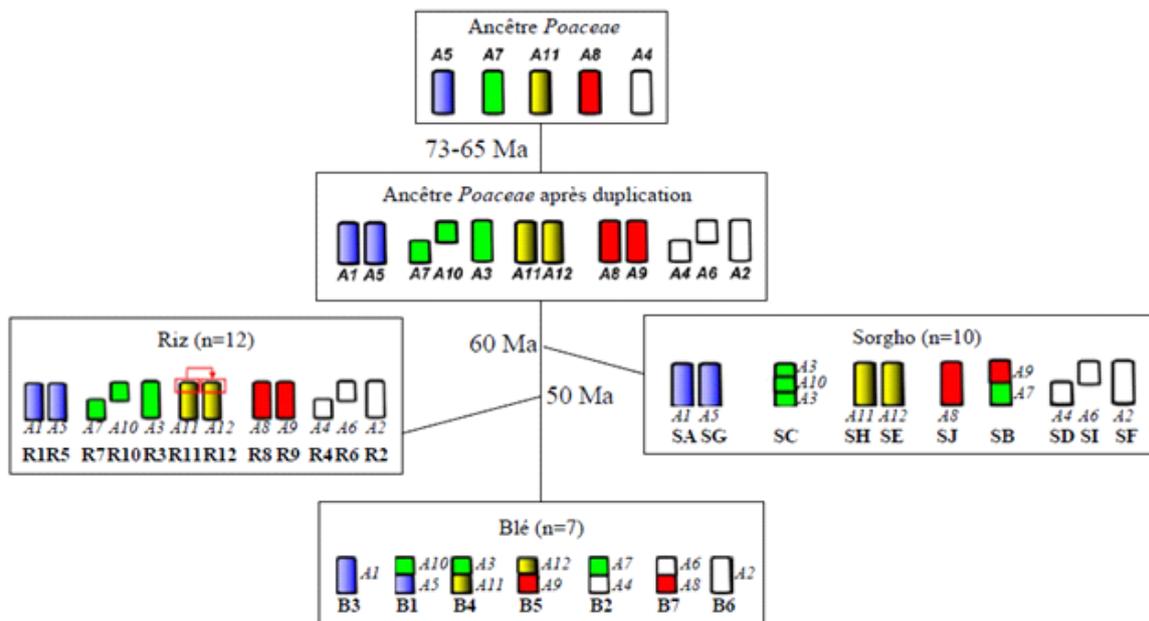


Figure 2: Évolution de la structure des chromosomes du blé, du riz et du sorgho à partir des 5 chromosomes ancestraux (Salse *et al.* 2008).

3- Intérêts des Poacées

Les Poacées constituent une famille cosmopolite qui présente un intérêt économique majeur, assurant une grande partie de la nourriture de l'humanité. Cette famille regroupe un grand nombre de genres et d'espèces dont la plupart d'entre eux sont qualifiées d'espèces à usage multiple. En effet, elles maintiennent l'équilibre écologique, assurent la lutte contre la désertification, présentent un intérêt économique majeur en assurant une grande partie de la nourriture de l'humanité et sont caractérisées par leurs grandes vertus thérapeutiques.

3-1- Utilité pastorale et écologique

Des nombreuses *Poaceae* pérennes telles que le dactyle aggloméré (*Dactylis glomerata*), les fétuques (*Festuca*), les ray-grass (*Lolium*), les bromes (*Bromus*), les Phalaris (*Phalaris aquatica*), les *Brachypodium* (*B. pinnatum* et *B. sylvaticum*) peuvent servir comme sources de des plantes pastorales et de fourrage. Ces Poacées pérennes conviennent aisément aux zones à pluviométrie moyenne et elles sont adaptées pour mettre en valeur les sols qui seraient marginaux pour d'autres cultures fourragères (Hassen et Zoghlami, 2004 ; Khedim et *al.*, 2008). Elles sont persistantes et se maintiennent plus de 6 ans, voire 10 années, sous bonnes conduites. Elles sont bien recommandées par les spécialistes pour la restauration de l'espace pastorale en perpétuelle régression. Les Poacées fourragères pérennes sont très importantes pour leur longue période de production sur le champ, ce qui constitue un atout majeur pour l'élevage extensif, ainsi que pour la protection, la fixation des dunes et la réhabilitation des sols.

3-2- Utilité thérapeutique

La thérapeutique par l'usage des *Poaceae* a été transmise de génération en génération, et grâce aux progrès scientifiques imminents, elle connaît, de nos jours, un regain d'actualité. Grâce à leurs grandes vertus thérapeutiques, plusieurs espèces, à savoir l'avoine, la folle avoine, le chiendent et l'orge, sont qualifiées d'espèces à utilité thérapeutique. D'autres sont connues par leur richesse en huiles essentielles, telles que la citronnelle (*Cymbopogon nardus*) et le vetiver (*Chrysopogon zizanioides*).

3-3- Utilité alimentaire et humaine

Les céréales sont généralement réputées pour leurs valeurs nutritives. Elles ont toujours été l'aliment nourrissant par excellence en donnant de la force physique et de la vigueur reproductive comme le cas de l'avoine. En outre, elles représentent la source de nourriture principale des herbivores domestiques et sauvages, fournissant pâturages, foin et ensilage. De ce fait, la surface dédiée à ce type de cultures est plus importante que la surface de toutes les autres cultures réunies. Des *Poacées* pérennes, comme le miscanthus (*Miscanthus giganteus*) et le panic raide (*Panicum virgatum*), sont prometteurs de cultures bioénergétiques à cause de leur potentiel de production de biomasse avec peu d'intrants, des traits essentiels pour la faisabilité économique et la durabilité environnementale. D'autres sont exploitées pour leurs fibres comme l'alfa (*Macrochloa tenacissima*) pour le papier d'impression de qualité.

4- Description générale de Poacées

4-1- Morphologie

4-1-1. La morphologie de l'appareil végétatif

Les Poacées sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces dépassant parfois 1 m de hauteur. Elles présentent une structure végétative de base assez uniforme. Néanmoins, leurs variabilités morphologiques, anatomiques et génétiques leur confèrent de grandes capacités d'adaptation aux principaux types d'habitats terrestres. Les plantes appartenant à cette famille ont généralement de nombreuses tiges dressées provenant d'une souche souterraine rampante qu'on appelle 'rhizome'. Ces tiges sont creuses dans les entre nœuds et pleines aux nœuds qui sont généralement enflés. Les entre-nœuds des Poacées sont capables de s'allonger longtemps, de sorte que la tige peut s'accroître très rapidement. En effet, comme chez la plupart des plantes, la tige des Poacées croît en longueur sur toute sa partie des entre nœuds et non à partir de son extrémité. A chaque nœud, est rattachée une feuille constituée par un limbe et une gaine entourant la tige (Figure 3).

Les feuilles sont sessiles et comprennent deux parties : la gaine et le limbe. La gaine, caractéristique distinctive des graminées, entoure la tige et soutient la zone située juste au dessus de chaque noeud, composée de tissus de croissance appelés méristèmes.

Le limbe est étroit et linéaire à nervures parallèles, la médiane plus prononcée. A la jonction du limbe et de la gaine se trouve la ligule, languette de tissus membraneux ou de poils entourant la tige comme un col. La forme et la grandeur de la ligule, ou son absence, constituent des caractères importants de détermination de l'espèce au stade plantule, ou avant la floraison.

Une autre caractéristique remarquable des Poacées est **la ligule**, languette poilue ou membraneuse placée à l'endroit où l'enveloppe de la feuille rejoint le pédoncule. La fonction de la ligule reste toujours inconnue. Son rôle est éventuellement d'empêcher l'humidité de s'accumuler entre tige et enveloppe.

Le pédoncule des feuilles est long et étroit, présentant des veines parallèles, de taille et de forme très variées. Il est pourvu d'une zone méristématique, située à l'endroit où il rejoint l'enveloppe.

Les racines principales sont généralement fibreuses et très développées. Des racines secondaires, appelées racines adventives, peuvent provenir des nœuds des tiges et constituer des racines de soutien.

4-1-2. La morphologie de l'appareil reproducteur

Les fleurs chez les Poacées sont peu apparentes. Elles sont groupées en inflorescences caractéristiques appelées **épillets**. **L'épillet** est formé d'un axe ou rachis sur lequel se trouvent, à la base, deux bractées, la glume inférieure et la glume supérieure. Chaque fleur est enveloppée par une glumelle inférieure ou lemme, et d'une glumelle supérieure ou paléole et, au centre, se trouvent l'ovaire, le style, le stigmate et les étamines. La glumelle inférieure est souvent munie d'une arête (Figure 3).

Le fruit des Poacées est généralement un caryopse, c'est-à-dire un akène à graine soudée à la paroi interne.

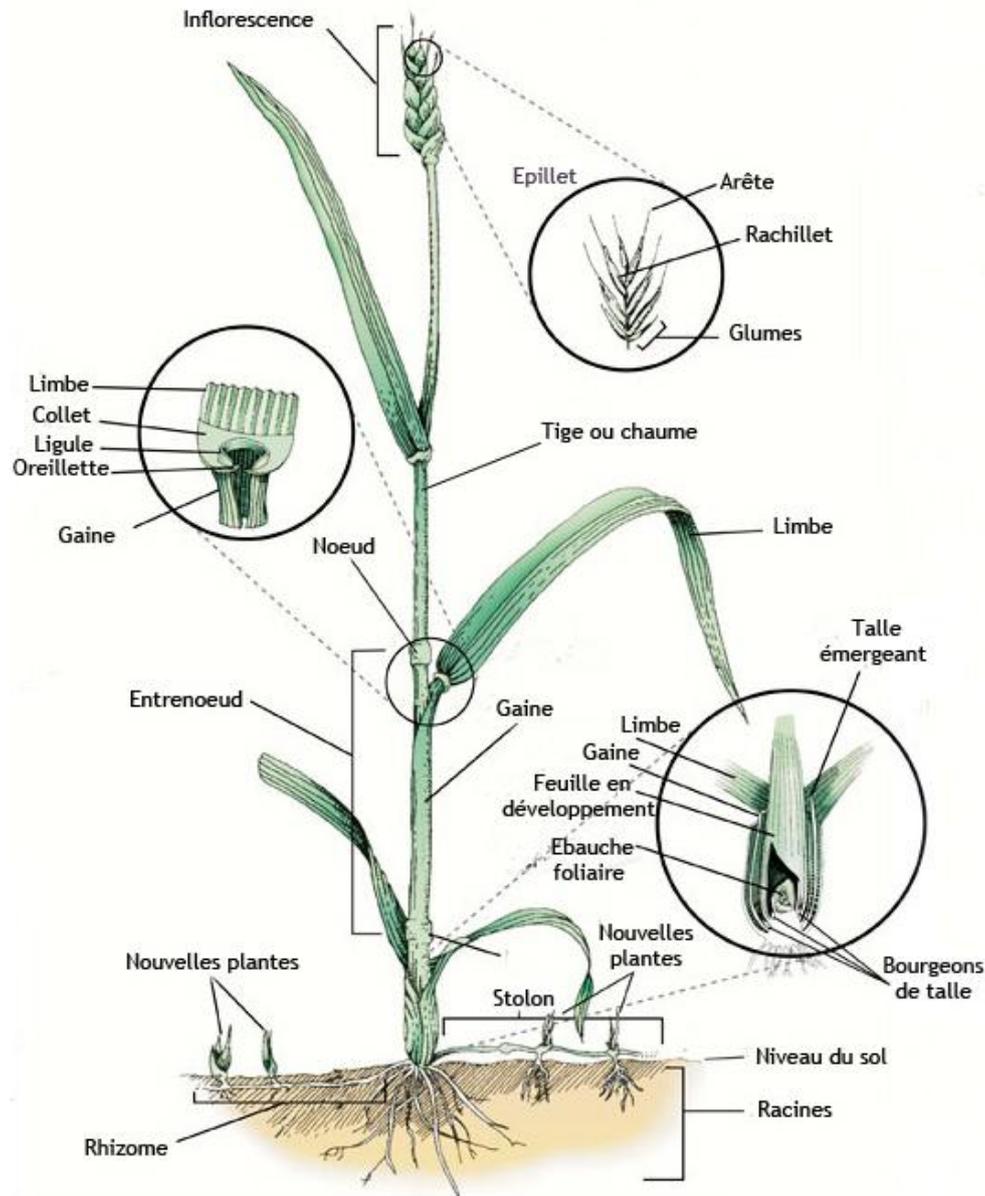


Figure 3: La morphologie des Poacées

4-2- La reproduction chez les Poacées

4-2-1. La reproduction asexuée chez les Poacées

a- La reproduction végétative

Beaucoup de Poacées se présentent sous diverses formes de multiplication végétative (stolons et rhizomes) pour coloniser un habitat approprié et pour une dissémination limitée. Ce type de reproduction est fréquent surtout chez les Poacées pérennes. Cette croissance

clonale assure une capacité d'accroissement rapide des populations avec des coûts de production des clones bien plus faible que par la reproduction sexuée. En revanche, il n'y a pas de brassage génétique et les populations sont génétiquement uniformes.

b- Agamospermie

L'agamospermie est une forme d'apomixie qui consiste en la production de grains viables avec embryon, sans intervention de la sexualité (donc sans fécondation). Elle est particulièrement fréquente chez les *Asteraceae*, les *Rosaceae* et les *Poaceae*. Chez les *Poaceae*, ce phénomène concerne 37 genres et 9% des espèces.

La production asexuée par agamospermie diffère de la multiplication végétative par le maintien de la dissémination des grains et de quelques aspects de la sexualité. Il n'y a pas de méiose normale, ni de brassage génétique. Mais si le génotype est bien adapté (à une niche écologique), il est préservé et copié, avec moins d'effort reproducteur et une assurance de la reproduction. L'agamospermie est la plus fréquente dans la sous famille des *Panicoideae*. Mais des espèces du genre *Poa* comme le *Poa pratensis* sont également agamospermes.

4-2-2. La reproduction sexuée chez les Poacées

a- L'autopollinisation (Autogamie)

On parle d'autopollinisation ou autogamie lorsque le stigmate d'une fleur reçoit du pollen émis par la même fleur ou par une fleur de la même plante. Ce mode de reproduction préserve les génotypes qui sont bien adaptés puisqu'il permet la transmission des 2 lots de gènes d'un même individu en absence de brassage intra-chromosomique. L'autogamie, présente chez 45 genres de *Poacées*, est plus répandue chez les plantes annuelles telle que le blé (*Triticum*), l'orge (*Hordeum*) et l'avoine (*Avena*) que chez les plantes pérennes. Un caractère extrême d'autogamie est la **cléistogamie** : la fleur ne s'ouvre pas à la période de la pollinisation et l'autopollinisation de la fleur se réalise donc à l'aide de son propre pollen à l'intérieur de la fleur close. Ce caractère est rencontré chez presque 70 genres de Poacées.

b- La pollinisation croisée (Allogamie)

L'allogamie est la fécondation d'une fleur par le pollen de la fleur d'une autre plante de la même espèce. C'est le type de fécondation le plus fréquent chez les plantes à fleurs. Cette

pollinisation croisée de fleurs hermaphrodites, qui assure le brassage génétique le plus large, est également le cas le plus fréquent chez les *Poaceae*. Cette pollinisation croisée est favorisée par un mécanisme particulier appelé **la protandrie**. Où il y a maturation des organes mâles avant les organes femelles de la même fleur. Dans ce cas, les anthères mûres libèrent le pollen avant que le stigmate de la fleur ne soit réceptif. La fleur est donc protandre.

4-3- Les Poacées en Tunisie

En 2008, E. Le Floch et L. Boulos ont publié une mise à jour la flore de la Tunisie (Cuénod et al. 1954, Pottier-Alapetite 1979 et 1981). Ainsi, ils ont indiqué que la flore tunisienne est composée par 1486 espèces réparties en 115 familles et 545 genres.. Selon E. Le Floch et L. Boulos (2008), la famille des *Poacées* est représentée par 102 genres et 247 espèces, et occupe la deuxième place après la famille des composées qui est représentée par 115 genres et 282 espèces.

En Tunisie, les Poacées constituent une composante de base dans les systèmes agronomiques traditionnels. Un ensemble d'espèces spontanées, vivaces ou annuelles, ligneuses ou herbacées, plus ou moins nutritives et plus ou moins appréciées par le bétail, constitue un important capital végétal et une richesse biologique diversifiée et conviennent à l'amélioration des parcours naturels et à l'alimentation des troupeaux bovins, ovins, caprins et camelins du pays. D'autres Poacées telles que l'avoine (*Avena sativa*), l'orge (*Hordeum vulgare*), le Ray-grass italienne (*Lolium multiflorum*) et le sorgho fourrager (*Sorghum sudanense*) sont cultivées à grande échelle et elles sont utilisées essentiellement comme source des fourrages. En plus de leur utilisation comme source de fourrage pour les bétails, les Poacées sont largement exploitées comme sources d'alimentation humaine. Les Poacées alimentaires sont principalement les céréales. Dans ce cadre, la céréaliculture en Tunisie a été toujours un enjeu politique ayant pour objectif la fourniture et la satisfaction alimentaire du peuple. La superficie emblavée annuellement se situe en moyenne autour de 1,45 Million d'ha. Mais cette superficie connaît d'importantes fluctuations interannuelles. Au cours des deux dernières décennies, 1990 à 2010, ces emblavures ont varié entre 1,17 million d'ha en 2002 et 2,03 millions d'ha 1996 (Figure 4). Les emblavures de la céréaliculture ainsi que ses rendements sont largement dépendants des conditions climatiques, notamment la pluviométrie.

Dans les régions arides et semi-arides, plusieurs recherches (Taylor et al, 2012) ont

révélé que les *Poaceae* sont à large amplitude écologique, grâce à leur résistance à la sécheresse. Elles se rencontrent sur plusieurs types de sols (argileux, sablonneux, tout comme sur des sols à texture franche) et colonisent de grandes zones géographiques.

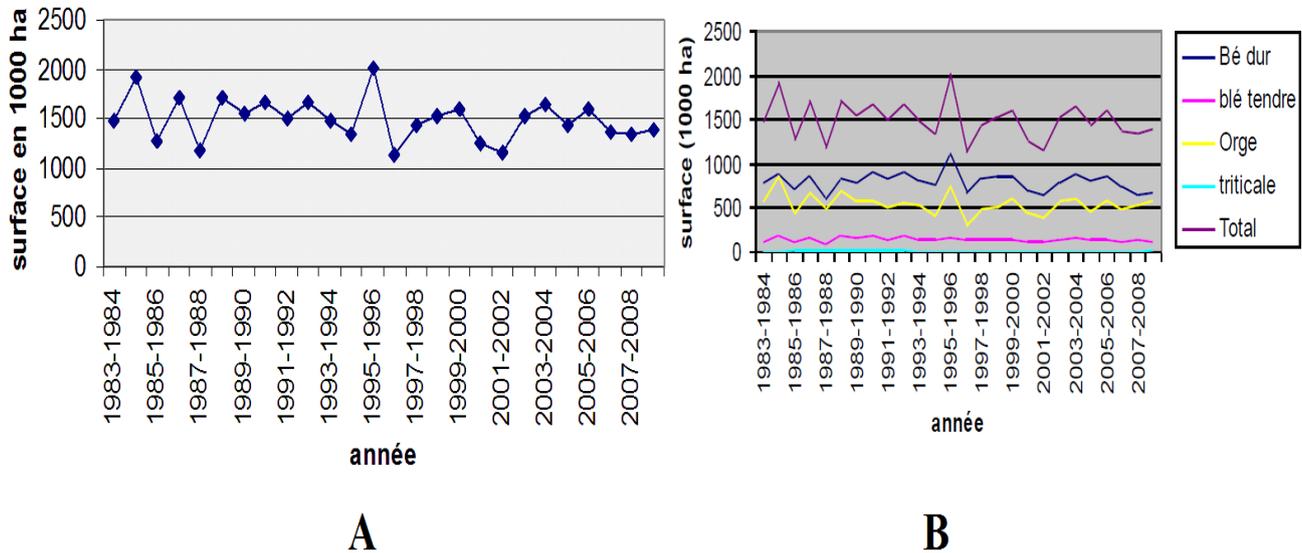


Figure 4: A : Evolution des emblavures céréalières en Tunisie ; B : Evolution des surfaces des 5 céréales majeures en Tunisie. (Source : Observatoire National de l’Agriculture (ONAGRI, 2010))

II- La polyploïdie chez les plantes

La polyploïdie, ou l’assortiment de plusieurs jeux complets de chromosomes dans un noyau, est un facteur important dans l’évolution des génomes des eucaryotes (Otto, 2007 ; Otto et Whitton, 2000 ; Soltis et Soltis, 2000). Chez les plantes, la prévalence des polyploïdes est particulièrement élevée. En effet, ils représentent 90% des ptéridophytes, plus de 50% des monocotylédones et 30% des dicotylédones (Wolfe, 2001, Adams et Wendel 2005, Soltis et Soltis, 2009). Soltis et Soltis (2000) rapportent que la polyploïdie est beaucoup plus fréquente chez les angiospermes que chez les gymnospermes (30 à 80% des angiospermes semblent issus d’un évènement de polyploïdisation). Les gymnospermes ne montrent que 5% d’espèces polyploïdes qui forment un sous-branchement très proche des angiospermes. De très nombreuses espèces, classiquement décrites comme diploïdes, portent sur leur génome des traces d’évènements anciens de duplications, et sont aujourd’hui considérées comme des paléopolyploïdes. Ainsi, le maïs (*Zea mays*), le sorgho (*Sorghum bicolor*) et les espèces

diploïdes du coton (genre *Gossypium*) seraient paléo-allotétraploïde. Le soja *Glycine max*, la tomate *Solanum esculentum*, la pomme de terre *Solanum tuberosum*, et plusieurs autres espèces cultivées (Blanc et Wolfe, 2004) présenteraient également des signatures génomiques d'événements de duplications massifs. De même l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, qui possède l'un des plus petits génomes du règne végétal (125 Mb ou mégabases), semble avoir connu au moins un événement complet de duplication de son génome au cours de son histoire (Bowers et al, 2003).

1- Mécanismes de formation des polyploïdes

La polyploïdie peut résulter de différents phénomènes cellulaires majeurs (Charles, 2010). Un organisme polyploïde peut être soit issu d'un doublement somatique du stock chromosomique dû à une perturbation de la division cellulaire d'un oeuf fécondé (i.e. polyploïdie somatique, Ramsey et Schemske, 1998), soit de la fusion de gamètes contenant plus d'un ensemble complet de chromosomes (gamètes non-réduits) Bretagnolle et Thompson, 1995). On distingue deux types de polyploïdes: Les **autopolyploïdes** et les **allopolyploïdes** (Figure 5).

Les autopolyploïdes se forment par duplication du génome de la même espèce, tandis que les allopolyploïdes résultent de la duplication du génome d'un hybride interspécifique, qui contient de ce fait deux ou plusieurs génomes différenciés (dits homologues) dupliqués. Dans ce dernier cas, la duplication du génome restaure la fertilité plus ou moins limitée des hybrides interspécifiques, chez lesquels les problèmes d'appariement chromosomique rendent les méioses irrégulières. De ce fait, l'allopolyploïdie est un des mécanismes de spéciation les plus répandus chez les plantes, et conduit à la formation de nouvelles lignées montrant des capacités adaptatives souvent supérieures à leurs parents diploïdes. Ces capacités, qui se traduisent dans la nature par une plus large expansion de ces espèces (dont certaines se montrent envahissantes), ont été largement exploitées par l'homme, qui a ainsi domestiqué un grand nombre d'espèces jouant aujourd'hui un rôle économique majeur comme le blé, le coton, ou le maïs (Wendel et Doyle 2005, Paterson 2005, Page et al, 2013).

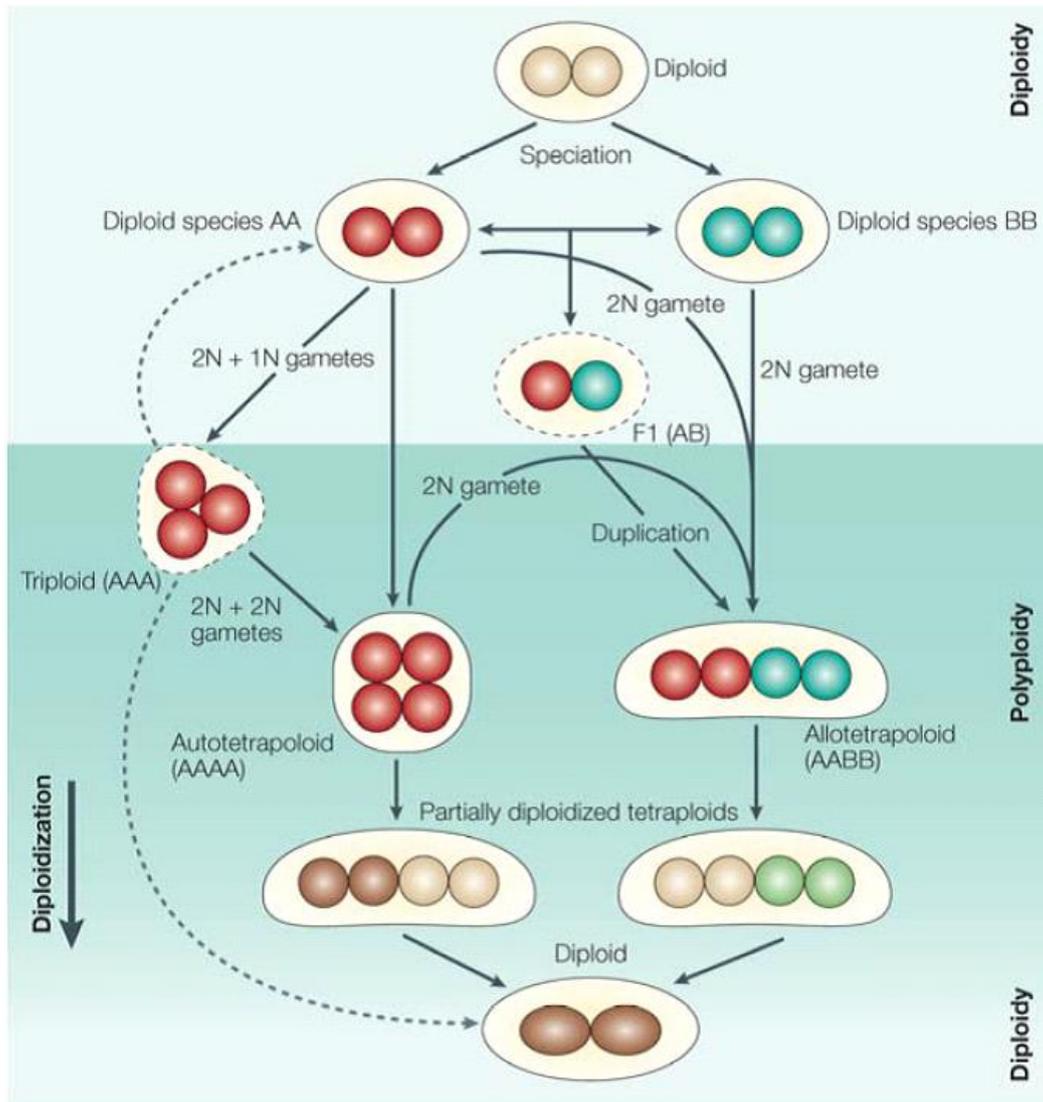


Figure 5: Différentes voies de formation des polyploïdes (Comai, 2005)

2- Effets de la polyplôidie

Diverses modifications morphologiques (taille des grains chez les plantes), physiologiques (taux de développement) et moléculaires (expression des gènes) sont induites par les évènements de polyplôidisation (Adams *et al.*, 2003 ; Adams et Wendel, 2005a ; Madlung *et al.*, 2005 ; Osborn *et al.*, 2003 ; Otto et Whitton, 2000 ; Salmon, 2005 ; Scheid *et al.*, 1996 ; Soltis et Soltis, 1995, 1999). Il en résulte une hétérozygotie élevée par rapport aux diploïdes apparentés (Soltis et Soltis, 2000). Cette forte hétérozygotie et la possession de plusieurs copies d'un même gène permettraient une meilleure plasticité phénotypique de l'organisme polyplôïde. Par conséquent, certaines espèces polyplôïdes occupent des niches écologiques différentes des espèces diploïdes apparentées (Otto et Whitton, 2000 ; Catalan et al, 2012). En effet, les espèces polyplôïdes ont souvent une plus grande distribution

géographique et se retrouvent à de plus hautes latitudes que les espèces diploïdes évolutivement proches (Amirouche et al, 1995). Ces modifications génomiques et phénotypiques pourraient expliquer le succès des organismes polyploïdes dans des environnements marginaux et hétérogènes (Dufresne et Hebert, 1994 ; Lundmark, 2006 ; Otto et Whitton, 2000). L'hybridation est un autre phénomène qui pourrait expliquer l'adaptabilité des organismes polyploïdes dans les milieux extrêmes et hétérogènes (Kearney, 2005). Lundmark (2006) suggère que l'hybridation n'est qu'un pas évolutif afin de former un génome polyploïde plus adapté à des milieux extrêmes. L'hybridation et la polyploïdisation sont deux phénomènes complémentaires et agissants en synergie pour conduire à l'adaptation des organismes polyploïdes vis-à-vis des milieux marginaux (Otto et Whitton, 2000). Il y a déjà près de 40 ans, Ohno (1970) suggérait le rôle évolutif majeur des gènes dupliqués, qui faciliterait l'émergence de nouvelles fonctions et la diversification d'une espèce. La polyploïdie offre donc une réserve de gènes accrus, augmentant potentiellement les possibilités d'évolution et de spécialisation fonctionnelle. Lepais et ses collaborateurs (2009) ont suggéré que l'hybridation joue un rôle majeur dans l'apparition de complexes d'espèces. En effet, ce phénomène facilite l'apparition et l'établissement de nouvelles espèces qui peut se faire par changement de ploïdie (alloploïdie) comme chez le blé (Gaut *et al.* 2000) ou homoploïdie comme chez le tournesol (Baack *et al.* 2005). Ainsi, les polyploïdes observés dans la nature sont en général bien adaptés à leur environnement. Cependant, la polyploïdisation reste un incident génomique et la présence de plusieurs génomes dans les cellules n'est pas sans inconvénient. Les espèces polyploïdes doivent surmonter rapidement les effets à court terme pour survivre.

III- L'hybridation et les complexes des espèces dans le règne végétal

1- Définition des complexes d'espèces

Selon Harlan et De Wet (1971), deux espèces végétales appartiennent au même complexe si dans les conditions naturelles elles peuvent, avec une probabilité non nulle, échanger des gènes par hybridation, soit directement, soit par le relais de plantes intermédiaires. Cette définition exclut les manipulations de laboratoire type fusion de protoplastes, les transferts du type transformation bactérienne, les inoculations virales. Donc, le complexe d'espèces est constitué par l'ensemble des plantes susceptibles d'associer, dans leurs descendance par hybridation, directement ou indirectement, des constituants de leurs

gémones. Des compartiments sont définis dans ces complexes selon le critère suivant: l'hybridation (viabilité et fertilité) réussit avec une probabilité supérieure entre plantes d'un même compartiment qu'entre plantes de compartiments différents. On dit alors qu'il y a un contrôle du flux de gènes entre les compartiments; le degré de contrôle est l'évaluation quantitative du taux d'échanges géniques entre compartiments.

2- Les complexes d'espèces dans le règne végétal

Dans la nature, les complexes d'espèces sont très fréquents chez les plantes (Leigh *et al.* 2004; Mallet, 2005; Mallet, 2008; Lepais *et al.* 2009). Lepais et ses collaborateurs (2009) ont suggéré que l'hybridation joue un rôle majeur dans l'apparition de ces complexes d'espèces. En effet, ce phénomène facilite l'apparition et l'établissement de nouvelles espèces qui peut se faire par changement de ploïdie (alloploïdie) comme chez le blé (Gaut *et al.* 2000) ou non (homoploïdie) comme chez le tournesol (Baack *et al.* 2005). Il peut également faciliter la conquête de nouveaux milieux grâce aux phénotypes extrêmes des hybrides (Roda, 2011) et pourrait alors favoriser la spéciation écologique (Barton 2001; Levin 2004; Seehausen 2004; Rieseberg et Willis 2007; Ma *et al.* 2010). Au contraire, dans certains cas, il est très difficile de démontrer des signes d'hybridation sur la seule base de différences morphologiques avec les espèces parentale, on peut alors avoir recours à l'utilisation de marqueurs moléculaires pour montrer la parenté des espèces appartenant au même complexe (Palmé 2002; Petit 2004).

3- L'hybridation et la polyploïdie chez les Poacées

Certains événements de polyploïdisation détectés chez les Poacées sont anciens (on parle alors de paléopolyploïdie) et donc communs à toutes les espèces de cette famille. D'autres événements sont plus récents et donc restreints à certaines tribus / espèces. C'est le cas pour les génomes du blé où de nombreux événements de polyploïdisation récents et récurrents ont été détectés. Certains de ces événements ont abouti aux espèces modernes de blé cultivées : le blé dur *T. turgidum* ssp. *durum* tétraploïde ($2n=4x=28$, AABB) et le blé tendre *T. aestivum* ssp. *aestivum* hexaploïde ($2n=6x=42$, BBAADD)

Chez les *Triticeae*, les polyploïdes sont généralement plus développés que les diploïdes et dans bien des cas leurs fruits, leurs grains et l'organe de réserve sont plus volumineux. Ces caractères ont été observés depuis l'avènement du développement agricole et les agriculteurs ont sélectionné ces formes polyploïdes de façon inconsciente et sans en connaître la cause.

Un autre événement de polyploïdisation relativement récent a été détecté au sein du genre de *Brachypodium*, essentiellement chez l'espèce modèle *Brachypodium distachyon*. Les circonstances de cet événement sont restées ambiguës pendant plusieurs années. En premier temps, cet événement a été considéré comme un état d'autopolyploïdisation au sein de cette espèce. Puis et à travers diverses analyses cytogénétique et moléculaire, il a été démontré qu'il s'agit d'une allopolyploïdisation entre deux espèces diploïdes au sein du même genre (*B. distachyon* ($2n = 10$) et *B. stacei* ($2n = 20$)) aboutissant à la création d'une nouvelle espèce allotetraploïde appelée *B. hybridum* ($2n = 2(5+10) = 30$) (Catalan et al, 2012).

IV- Le genre *Brachypodium*

1- Histoire taxonomique

L'histoire taxonomique du genre *Brachypodium* est très compliquée. Ce genre a été décrit pour la première fois en 1812 par Palisot de Beauvois avec 22 espèces (Khan and Stace, 1999). En 1824, Dumortier a divisé le genre *Brachypodium* en trois sections: *Dryopyron*, *apalochloa* et *distachys*. Les deux premières sections sont constituées chacune par une seule espèce qui sont *Brachypodium proper* et *Brachypodium nardus* alors que la troisième inclut *B. distachyon* avec autres espèces non définies. En 1855, il a été divisé par Nyman en deux groupes d'espèces. Le premier groupe formé par uniquement *B. distachyon* comme la seule espèce annuelle dans le genre alors que le deuxième groupe inclut toutes les espèces pérennes (Khan, 1984). Récemment, parmi les 22 espèces décrites par Bouvais en 1812, seulement les 5 espèces *B. sylvaticum* (Hudson) Beauv., *B. pinnatum* (L.) Beauv., *B. gracile* Beauv., *B. retusum* (Pers.) Beauv. et *B. distachyon* (L.) Beauv sont classées comme parmi les vraies espèces de *Brachypodium*, les autres sont incluses dans d'autres genres (Pacurar, 2009). Quelques années plus tard, Schippmann (1991) a reconnu sept autres espèces en Europe. Malgré les grands efforts faits pour élucider sa taxonomie et après presque un siècle de la première description du genre *Brachypodium*, le nombre exact des espèces reste inconnu mais il a été estimé qu'il varie entre 18 et 22 (Wolny and Hasterok, 2009). Récemment, une nouvelle révision de la taxonomie de *Brachypodium* basée sur des approches morphologiques, cytologiques et moléculaires a permis d'identifier deux autres espèces nommées *B. stacei* et *B. hybridum* (Catalan et al., 2012). Jusqu'à présent, à l'exception de *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* qui sont annuelles, toutes les espèces identifiées dans le genre *Brachypodium* sont pérennes.

2- Relations entre *Brachypodium* et les autres genres des Poacées

Brachypodium appartient à la sous-famille des *Pooideae*. Stebbins et Crampton (1961) ont suggéré sa classification dans la tribu de Fétuque (*Festuca*) avec plusieurs autres genres tel que, *Bromus*, *Festuca*, *Lolium*, *Scleropoa*, *Puccinellia*, *Torreyochloa*, *Sclerochloa*, *Scolochloa*, *Hesperochloa*, *Loa*, *Briza*, *Catabrosa*, *Dupontia*, *Phippsia*, *Coleanthus*, *Dactylis*, *Cynosurus*, *Lamarckia* et *Arctagrostis*. En 1967, Goodall a utilisé divers caractères morphologiques pour classer le genre *Brachypodium* avec les genres *Agrostis*, *Ampelodesmos*, *Avena*, *Brachyelytrum*, *Bromus*, *Brylkinia*, *Danthonia*, *Glyceria*, *Melica*, *Milium*, *Phalaris*, *Poa*, *Sesleria*, *Stipa* et *Triticum* dans une autre tribu (Khan, 1984). Harz (1880) a décrit pour la première fois la tribu de *Brachypodieae* et il lui a attribué uniquement les trois genres *Brachypodium*, *Bromus* et *Ceratochloa*. Quelques années plus tard, Hubbard (1966) a limité la tribu de *Brachypodieae* au seul le genre *Brachypodium* (Hasterok et al. 2004). Toutes ces classifications ont été basées sur des approches morphologiques.

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, les relations phylogéniques entre *Brachypodium* et les autres Poacées ont été révisées. En effet, en utilisant divers marqueurs moléculaires comme les séquences inter-géniques (ITS), séquences 5.8 s ADN ribosomal, RAPD, RFLP, RAPD et les gènes chloroplastiques *ndf*, *Brachypodium* a été placé entre le riz (*Oryza*) et le blé (*Triticum*) (H Hsaio et al. 1994 ; Catalan et al. 1995 ; Catalan et Olmstead 2000). Des études plus approfondies basées sur deux grandes bases de données comprenant 11 kb de séquences des gènes et 335 BAC ont montré une grande similitude entre *Brachypodium* et les céréales (Blé, orge, riz) (Vogel et al. 2006 ; Huo et al. 2009). Plus récemment, cette grande similitude a été bien confirmée après le séquençage du génome complet de *Brachypodium distachyon*, (62,5% des gènes de blé et d'orge sont conservés) (Figure 6).

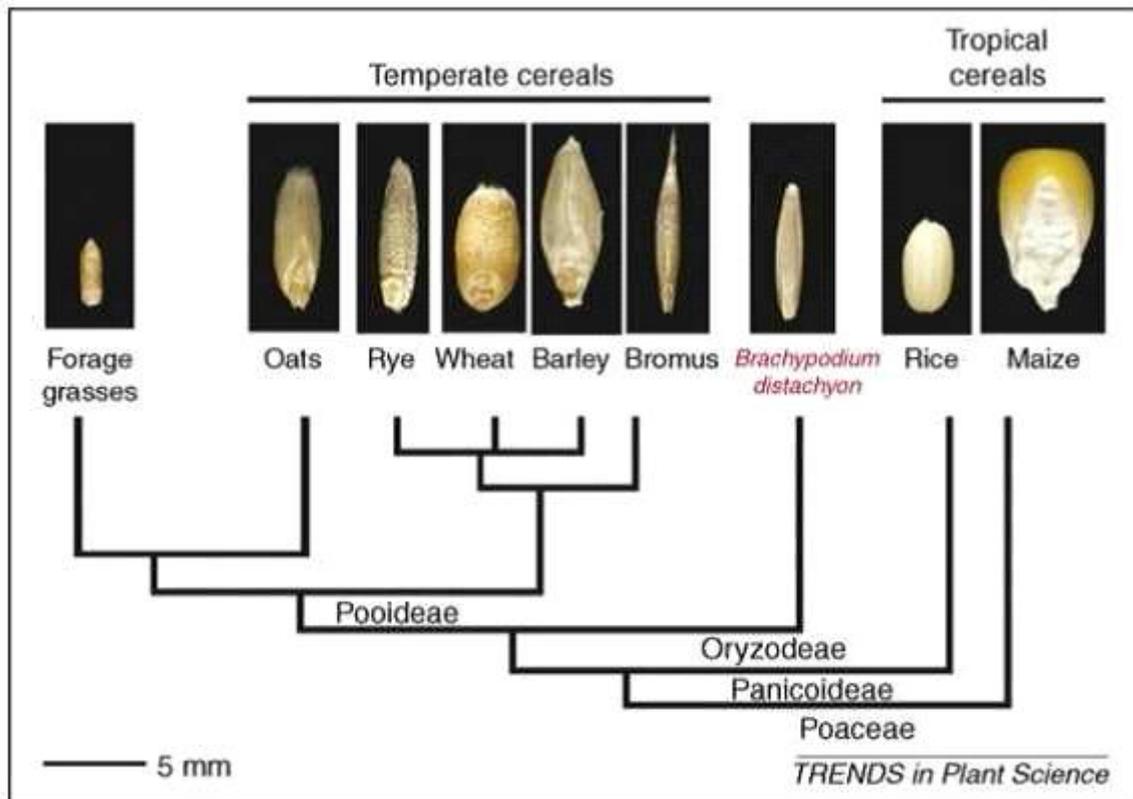


Figure 6: Relations phylogénétiques entre *Brachypodium distachyon* et des céréales d'importance économique (Opanowicz et al. 2008)

3- La morphologie de *Brachypodium*

A l'exception de *B. retusum* qui est caractérisée par une tige ligneuse souvent très ramifiée, la majorité des espèces de genre *Brachypodium* possèdent une tige creuse entièrement herbacée. La présence ou l'absence de pilosité au niveau de la tige est un caractère très important pour la caractérisation des espèces de *Brachypodium*. Chez *B. sylvaticum* la tige est densément poilue au niveau des nœuds; chez *B. pinnatum* la tige est généralement pubescente alors qu'elle est presque glabre chez *B. phoenicoides*. À l'exception de *B. sylvaticum* qui présente des racines superficielles et peu ramifiées, les autres *Brachypodium* présentent des racines généralement profondes et très ramifiées (50 cm de longueur). La forme des feuilles chez *Brachypodium* est utilisée aussi comme caractère distinctif entre les espèces. En effet, à l'exception de *B. sylvaticum* et *B. distachyon*, la majorité des espèces *Brachypodium* ont des limbes foliaires linéaires, acuminés au sommet, plats à l'état frais et convoluté à l'état sec. Le limbe est relativement court chez *B. retusum* et *B. mexicanum* (<10 cm) alors qu'il est particulièrement long chez *B. pinnatum* et *B.*

phoenicoides (> 40 cm). Chez *B. sylvaticum* la longueur du limbe est généralement inférieure à 35 cm. La couleur des feuilles est aussi importante chez quelques espèces. Elle est vert foncé chez *B. phoenicoides*, vert glauque chez *B. glaucovirens* et *B. rupestre*, mi-vert chez *B. sylvaticum* et vert jaunâtre chez *B. pinnatum*. Les nervures des feuilles de *Brachypodium* sont généralement parallèles et occupent le 2/3 supérieur de l'épaisseur de la feuille chez *B. phoenicoides* et la face inférieure de la feuille chez *B. sylvaticum*. La ligule est généralement membraneuse chez toutes les espèces de *Brachypodium*, néanmoins elle varie en longueur qui est comprise entre 1 et 6 mm chez *B. sylvaticum*, peut atteindre 2 mm chez *B. pinnatum* et ne dépasse pas 0.5 mm chez *B. kawakamii*. L'inflorescence chez *Brachypodium* est une grappe d'épillets. Chez *B. sylvaticum*, *B. pinnatum* et *B. phoenicoides*, le nombre d'épillets par inflorescence est beaucoup plus grand que chez les autres espèces. Il varie entre 3 et 8 chez *B. sylvaticum*, entre 6 et 9 chez *B. phoenicoides* et il peut atteindre 12 chez *B. pinnatum*.

4- La cytologie de *Brachypodium*

Les espèces de *Brachypodium* sont caractérisées par des très petits chromosomes (0,8 à 3,7 um) (Khan et *stace*, 1999). Sur le plan cytogénétique, à l'exception de l'espèce diploïde *B. distachyon*, les autres espèces de ce genre sont peu ou mal caractérisées jusqu'à présent. Néanmoins, Il a été estimé que le nombre de chromosomes de base est relativement faible, il varie entre 5 et 9. Kozuharov et Nicolova (1974) ont affirmé que le nombre de base des chromosomes de ce genre semble être $x = 7$ chez les espèces pérennes et $x = 5$ chez les espèces annuelles. Récemment, en se basant sur des techniques de biologie moléculaire, Wolny et Rostock (2009) ont examiné six espèces, *B. distachyon*, *B. retusum*, *B. rupestre*, *B. phoenicoides*, *B. pinnatum* et *B. sylvaticum*, et ils ont montré que le nombre de chromosomes ainsi que la taille du génome varient de $2n = 10$ et 0,631 pg/2C chez *B. distachyon* à $2n = 38$ et 2,57 pg/2C chez *B. retusum*. Certaines études montrent des nombres de chromosomes anormaux parfois très élevé. Dans ce contexte, Kozuharov et al. (1974) ont signalé trois types de caryotypes chez *B. sylvaticum* : $2n = 28$, $2n = 42$ et $2n = 56$ en plus de la normale $2n = 18$. De même, Mehra et Sunder (1969) ont signalé la présence d'un caryotype à $2n = 42$ en plus de $2n = 14$ et $2n = 18$. L'espèce diploïde *B. distachyon* a été considérée aussi pour longtemps avec trois caryotypes correspondant à trois cytotypes différents $2n = 10$, $2n = 20$ et $2n = 30$.

5- Polypléidisation et hybridation dans le genre *Brachypodium*

Pendant longtemps, l'histoire de l'hybridation et de la polypléidisation est demeurée

très ambiguë chez le genre *Brachypodium*. Le premier phénomène d'hybridation a été découvert par Senan en 1911. Selon cet auteur, l'espèce *B. paui senan* est le résultat d'une hybridation entre *B. ramosum* et *B. distachyon*. Quelques années plus tard, d'autres espèces hybrides ont été décrites comme le résultat d'une hybridation entre *B. pinnatum* et *B. sylvaticum* (Anderson, 1931 ; Camus, 1958). En 1974, Kozuharov (1974) a estimé que *B. glaucovirens* pourrait être l'hybride de *B. sylvaticum* et *B. pinnatum* malgré l'absence de la cohabitation de ces deux espèces (Saint-Yves 1934). Récemment, Catalan et al. (2012) ont encore prouvé l'hypothèse d'une autopoléidie chez *B. distachyon* pour donner 3 différents cytotypes ($2n = 10$, $2n = 20$ et $2n = 30$) et ont trouvé que le cytotype $2n = 30$ est une 3^{ème} espèce du complexe *Brachypodium* (*B. hybridum*) résultante d'une allopolyploïdisation entre les deux espèces diploïdes *B. distachyon* ($2n=10$) et *B. stacei* ($2n = 20$).

6- Répartition géographique du genre *Brachypodium*

Comme la plupart des autres genres des sous familles des *Pooideae*, la répartition géographique de *Brachypodium* est susceptible d'être très étendue. En effet, le genre se répartit sur un large panel de climats et de sols. Khan et Stace (1999) ont suggéré que sa distribution s'étend principalement dans les régions tempérées et chaudes. Il a été estimé aussi que la distribution de la majorité des espèces se focalise dans le bassin méditerranéen, le moyen orient et les montagnes de l'Afrique tropicale. D'autres espèces telles que *B. flexum*, *B. bolusii*, *B. pringlei*, *B. longisetum*, *B. kawakamii* et *B. mexicanum* sont caractérisées par une distribution relativement restreinte alors que *B. pinnatum*, *B. sylvaticum* et le complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* sont réparties sur un large éventail de zones géographiques (Figure 7, Figure 8 et Figure 9). Particulièrement, *B. sylvaticum* est l'espèce la plus répandue de ce genre, elle s'étend du Nord d'Afrique à l'Est de l'Asie (Catalan et Olmstead, 2000 ; Rosenthal, 2008).

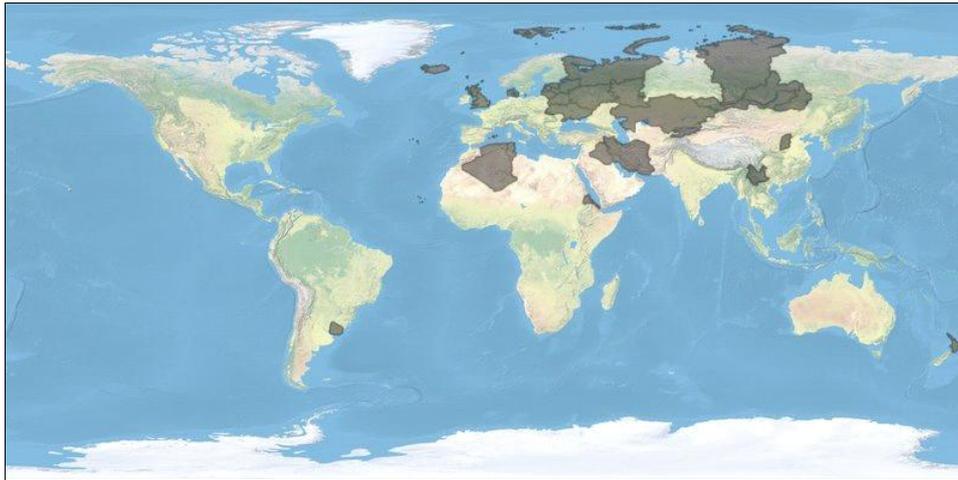


Figure 7: Distribution géographique de *B. pinnatum* (Grassland, 2012)

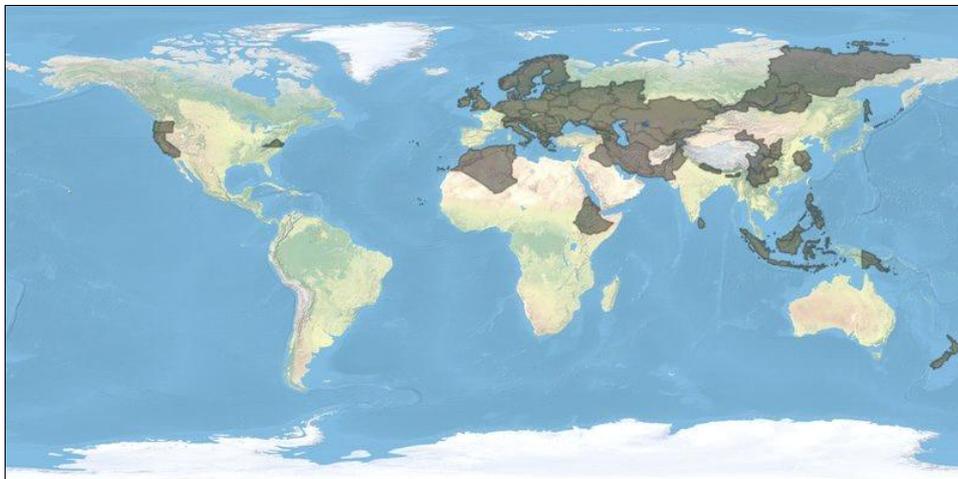


Figure 8: Distribution géographique de *B. sylvaticum* (Grassland, 2012)

Concernant le complexe d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei*, et *B. hybridum*, l'habitat naturel s'étend sur tout le bassin méditerranéen en allant de l'Est de l'Afrique jusqu'à le sud de l'Europe et dans le sous-continent indien y compris le moyen orient, l'Asie occidentale et l'Asie tropicale (Draper 2001; Hasterok et al, 2004;2006, Draper et al. 2004; Vogel et al 2006a ; Vogel et al, 2006b, Gu et al. 2004). En Amérique du Nord, ce complexe est moins fréquent et il est considéré comme exotique. Ces trois dernières espèces poussent sur des sols calcaires, sableux ou graveleux, mais aussi dans les zones acides et les zones gypseuses (Khan, 1984).

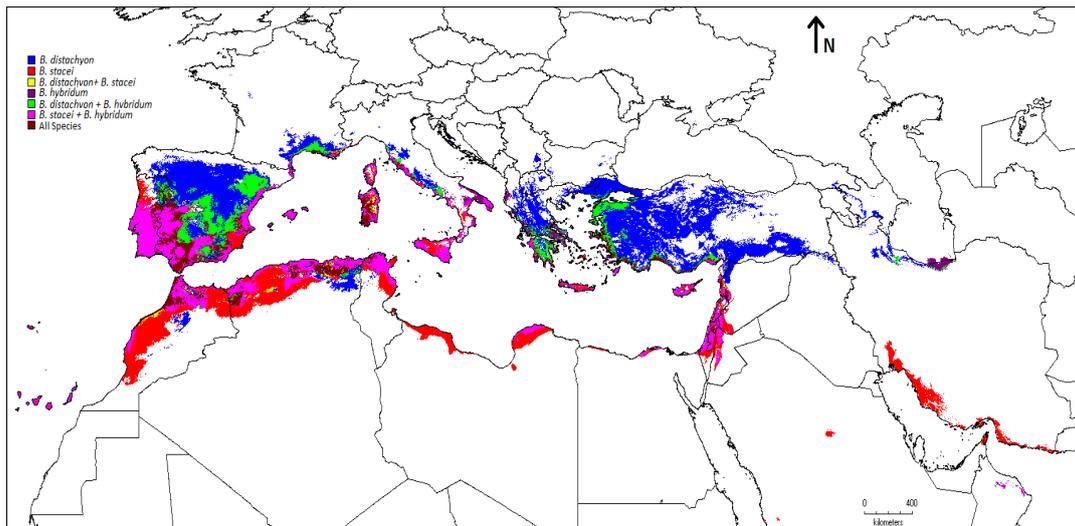


Figure 9: Distribution géographique du complexes d'espèces : *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* (Bleu : *B. distachyon* ; Rouge : *B. stacei* ; Jaune : *B. distachyon* + *B. stacei* ; Vert : *B. distachyon* + *B. hybridum* ; Rose : *B. stacei* + *B. hybridum* ; Mauve : Les 3 espèces ensemble) (Catalan et al, 2012)

7- Le genre *Brachypodium* : Modèle pour les Poacées

7-1- *Brachypodium distachyon* : modèle pour les céréales et les Poacées fourragères

Jusqu'aux années 1990, on ne connaissait que trois espèces végétales modèles. *Arabidopsis thaliana* qui a permis des progrès considérables dans la connaissance des bases moléculaires de la biologie des plantes surtout après le séquençage de son génome en 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). le riz pour les monocotylédones (céréales) et *Medicago truncatula* comme modèle pour les légumineuses et l'association légumineuses-microorganismes. En 2001, Darper et ses collaborateurs ont proposé *Brachypodium distachyon* comme modèle d'étude pour la famille des Poacées. En 2010, *Brachypodium distachyon*, est devenu la seule plante de la sous famille des Pooideae dont la totalité de son génome est séquencée et par conséquent comme modèle d'études génomiques structurales et fonctionnelles chez les Poacées. Avec les nombreux outils génétiques et génomiques développés, les études sur cette plante sont devenus de plus en plus approfondies et divers projets de recherche visant l'évaluation de sa diversité naturelle au niveau phénotypique et génétique ainsi que son comportement vis-à-vis des contraintes biotiques et abiotiques ont été développés dans plus de 400 laboratoires dans le monde (Bevan et al., 2010 ; Thole et al, 2010). D'autres études visant à améliorer les Poacées pour la production de biocarburants sont également en cours de développement.

7-2- Description botanique de *B. distachyon*

Brachypodium distachyon (Figure 10), communément appelé Brachypode à deux épis (purple false brome), est une angiosperme monocotylédone annuelle (rarement bisannuelle) de l'ordre des *Poales*, famille des *Poacée*, sous-famille des *Pooideae* et à la tribu ou infra-famille des *Brachypodieae*. *Brachypodium distachyon* est une plante herbacée à petite taille dont la longueur de la partie aérienne ne dépasse pas 50 cm. L'appareil végétatif est une touffe de tiges pourvues de 2 à 5 nœuds. À chaque nœud correspond une feuille. La feuille est décrite en trois parties : la gaine entourant la partie basale de l'entre-nœud correspondant, la ligule et le limbe. L'appareil reproducteur est une inflorescence en épi court (5-10 cm) formée par 3 à 7 épillets contenant chacun une dizaine de fleurs hermaphrodites qui se développeront en caryopses. Les caractéristiques de *B. distachyon* sont détaillées dans le **tableau 1**.

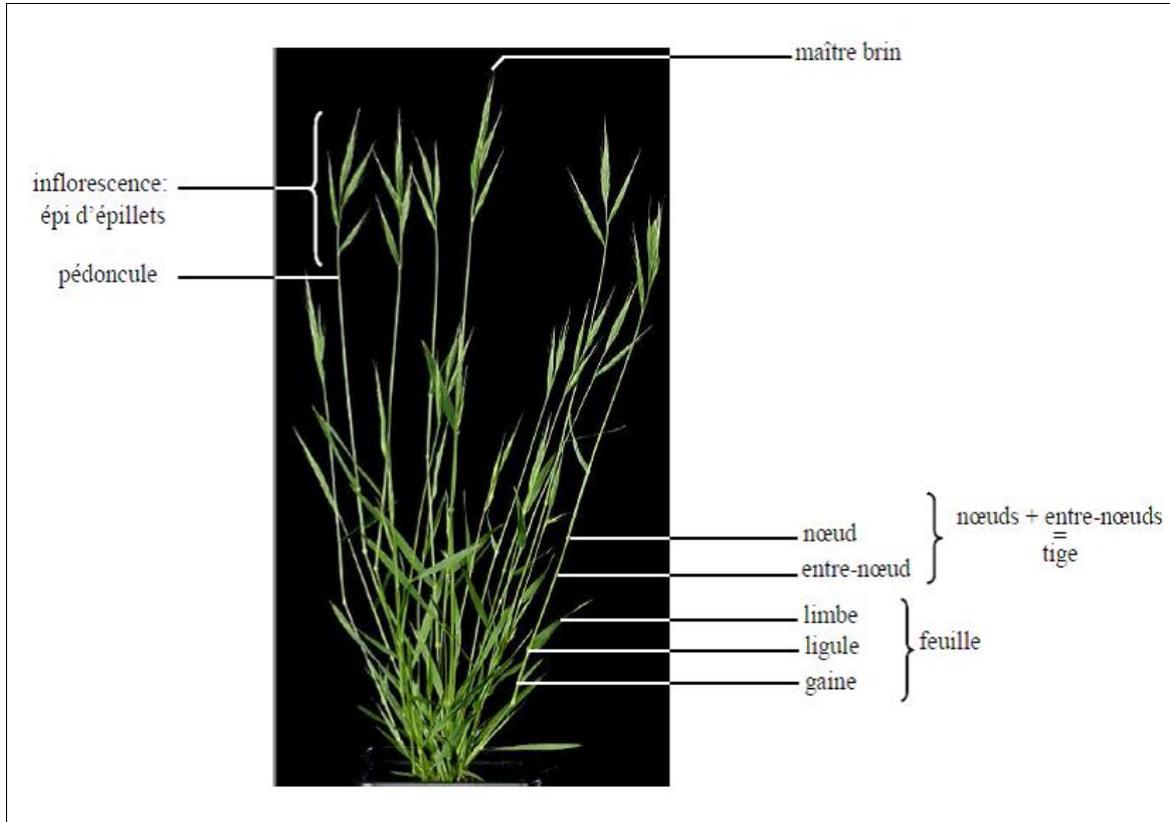


Figure 10: La morphologie de *B. distachyon*

7-3- Caractéristiques biologiques de *Brachypodium distachyon*

Diverses caractéristiques biologiques à importance majeure ont permis de classer *Brachypodium distachyon* comme modèle d'étude pour toute la famille des *Poacées*. En effet, elle est caractérisée par un génome relativement petit ; environ 272 millions de paires de bases et 25532 gènes repartis sur cinq chromosomes (Vogel et al. 2009 ; Bevan et al. 2010). Son génome est défini comme le plus petit de toute la famille des *Poacées*, il est de deux à trois fois plus grand que celui de riz et de celui de *Medicago truncatula* et presque équivalent à celui d'*Arabidopsis thaliana*. En outre, *B. distachyon* est une plante autogame qui est un caractère très important pour le maintien de lignées homozygotes (Vogel et al, 2009). Elle est aussi facile à cultiver en grand nombre (1000 plantes/m²) grâce à sa petite taille qui ne dépasse pas 40 cm et produit un très grand nombre de graines par cycle qui dure entre 8 et 12 semaines dans les conditions contrôlées. *B. distachyon* dispose également d'une forte variabilité morphologique et génétique intra- et inter-populations (Figure 11).

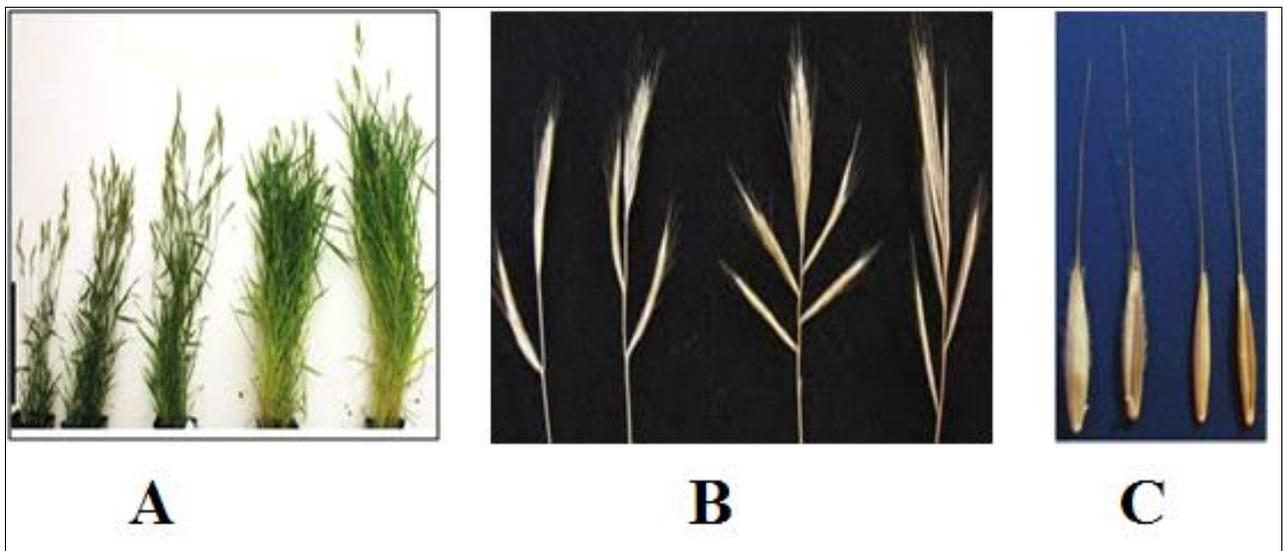


Figure 11: Variabilité morphologique de *B. distachyon* : A- Au niveau de l'appareil végétatif ; B- Au niveau de l'inflorescence ; C : Au niveau des grains

Tableau 1: Caractéristiques détaillées de *Brachypodium distachyon*

Classification	Sous-famille	Pooideae
	Tribu	Brachypodieae
Habitus	Taille de la tige	(5) 10 - 40 cm
	Port de la plante	Plante stolonifère, rhizomateuse ou solitaire
	Plante vivace ou annuelle	Plante annuelle (ou bisannuelle)
Appareil végétatif	Feuilles	(1) 2 - 5 (6) mm ; planes ou presque planes ; pubescentes et velues ou cillées.
	Nombre de noeuds sur la tige	2 - 3 - 4 - 5 et plus
	Caractère de la ligule	Membraneuse - Membraneuse et ciliée
	Taille de la ligule	Courte (< 2mm)
Inflorescence	Inflorescence	En épi unique ou en panicule en forme d'épi
	Disposition des épis sur l'axe	Épillets disposés des deux côtés ou tout autour de l'axe
	Taille de l'épillet	10 - 30 (40) mm
Fleur	Nombre de fleurs fertiles de l'épillet	2 ou plusieurs fleurs
	Glumes	2 glumes (inf et sup) à tailles inégales, non aristées et non munies de cil, ni poils ou soies
	Lemmes	lemmes aristées (avec arête) et munies de cil, poils ou soies
	Forme de l'arête	Droite
	Taille de l'arête	8 - 15 mm
	Insertion de l'arête	Terminale
	Lemmes à dos caréné	Non
	Fleur munie de poils à la base	Non
Ecologie	Habitat	Pelouses, pelouses sèches - Garrigues - Rochers, dalles et éboulis
		sols secs à pH neutre à basique, calciques, pauvres en azote, ou des sols initiaux sur rochers.

7-4- Intérêts de *Brachypodium distachyon*

Les différentes recherches effectuées sur *Brachypodium distachyon* durant la dernière décennie ont suscité divers intérêts majeurs à cette petite herbacée. Sur le plan agronomique, des qualités tels que la production massive de biomasse ainsi que la forte teneur en protéine totale et la prédominance de protéines de réserve de type glutéline dans les grains (Larré et al. 2010), ont conduit à l'exploitation de *B. distachyon* en tant que source de fourrage de bonne qualité pour nombreux herbivores. Le très grand nombre de grains produits présente une source d'alimentation pour des centaines d'espèces granivores telles que les oiseaux et les micromammifères. Outre ses qualités fourragères et grâce à son système racinaire profond et ses capacités de développer diverses stratégie d'adaptation, *B. distachyon* peut contribuer à la restauration ou la conservation de sols vulnérables ou dégradés des zones arides et semi-arides (Hammami et al. 2011). *Brachypodium distachyon* est également caractérisée par des fortes teneurs en polysaccharides (Guillon et al., 2011), caractéristique qui a laissé entrevoir son exploitation comme source d'énergies renouvelables telles que les biocarburants et les biogaz (Darper et al, 2001 ; Garvin et al, 2001). Récemment, l'intérêt fut focalisé sur *B. distachyon* comme plante modèle pour étudier les maladies céréalières (Pradeli et al, 2011) et la tolérance à la sécheresse (Luo et al., 2011). Le séquençage et l'analyse du génome de *B. distachyon* ont permis à la communauté scientifique de développer des outils de génomique et des ressources bioinformatiques accessibles. Des lignées pures dont le génome a été séquencé tel que la lignée Bd21 ont été partagées avec des centaines de laboratoires.

V- Analyse de la diversité génétique

1- Notion de la 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, inter et intra-espèces, qui constituent la matière première des sélectionneurs. Ainsi, la diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes **d'un individu**, **d'une population**, **d'une espèce** ou **d'une communauté** (un ensemble d'espèces). En d'autres termes, la diversité génétique est définie par le niveau de similarité ou de différence dans la composition

génétique des individus, des populations et des espèces. Elle peut représenter un avantage direct pour une population, la valeur adaptative d'un caractère étant généralement supérieure pour un gène présentant plusieurs états alléliques (hétérozygotie) ou pour une population formée d'individus différents et complémentaires (Frankham 2003, 2005). Elle peut de plus se concevoir comme une assurance permettant l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales. En effet, plus une population ou une espèce est diversifiée génétiquement, plus certains de ses membres arriveront à s'adapter aux modifications survenant dans l'environnement. Il est donc souhaitable de comprendre les mécanismes de création et de maintien des formes de diversité observées. L'étude de la diversité génétique à différents niveaux d'organisation (**population, espèce** ou **communauté**) peut apporter une aide précieuse à la biologie des populations et à la biologie évolutive qui sont deux disciplines importantes pour la biologie de la conservation. La diversité génétique est alors devenue un outil primordial pour définir des buts, des méthodes et des priorités dans des programmes de conservation (Stockwell *et al.* 2003).

2- Méthodes d'analyse de la diversité génétique

2-1- Les approches morphologiques

Les descripteurs morfo-agronomiques peuvent être qualitatifs ou quantitatifs et incluent des caractères botaniques et taxonomiques. Parfois on inclut aussi des descripteurs indicateurs des composantes de rendement avec l'objectif de donner au sélectionneur une indication du potentiel du rendement. Souvent ces descripteurs sont influencés par les changements environnementaux.

La publication de nombreux descripteurs de caractérisation par l'International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), pour les espèces végétales, témoigne de l'importance des marqueurs morphologiques. Néanmoins, ces caractères sont souvent le résultat d'une interaction entre le génotype et le milieu. Plusieurs caractères phénotypiques sont gouvernés par un ou plusieurs gènes et sont plus ou moins influencés par les conditions de l'environnement. Ainsi, un même génotype peut donner lieu à des phénotypes différents en fonction de conditions environnementales alors qu'un même phénotype peut être le résultat de l'expression des différents génotypes.

L'approche morphologique : Entre l'environnement et la génétique

L'estimation des niveaux de variation et de différenciation des caractères

morphologiques peut se faire à partir de données collectées dans les populations naturelles ou en conditions contrôlées. Néanmoins, la variation morphologique peut être fortement influencé par l'environnement (Frankham *et al.*, 2002). En effet, les données collectées sur le terrain ne permettent pas de distinguer les effets environnementaux des effets génétiques. Le fait de faire pousser les plantes dans un environnement commun permet d'uniformiser les effets environnementaux, de telle sorte que les différences morphologiques observées entre les plantes peuvent être attribuables à une différence génétique. Ces conditions de culture sont généralement des conditions beaucoup plus favorables à la plante (pas de compétition, eau non limitante...) que celles rencontrées dans la nature, afin d'éviter une mortalité trop forte. Donc une partie importante de la variation génétique (sur la croissance, sur la résistance à telles ou telles conditions) ne s'exprime pas ou est peu visible.

2-2- Les approches biochimiques: Les allozymes

Les marqueurs biochimiques (protéines, iso enzymes...), apparus vers 1970, sont des éléments génétiques issus de l'expression biochimique des gènes, et sont déterminés non seulement par les gènes mais souvent par l'état de développement physiologique ainsi que par l'organe et le milieu où il se trouve.

Les marqueurs biochimiques sont donc des moyens d'étude des facteurs génétiques et non génétiques parce qu'ils permettent de détecter l'influence de l'environnement et du milieu sur le génotype et aident donc à mieux différencier les populations. En effet, chaque être vivant présente des différences dans son génome, donc dans sa constitution protéique, c'est ainsi que l'absence, la présence ou l'abondance d'une protéine donnée, crée un profil spécifique pour chaque individu et chaque population et qui peut être la source d'une grande variabilité génétique. L'étude de la diversité génétique dans les populations végétales a été grandement facilitée par le développement de marqueurs à base de protéines comme les allozymes (Loveless *et al.*, 1984 ; Hamrick *et al.*, 1990 ; Chung *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012) qui ont été largement utilisées pour caractériser les patrons de variation génétique au sein et entre les populations, et d'examiner les processus de dispersion et les modes de reproduction qui influencent les niveaux de la différenciation génétique, ainsi, ils demeurent l'outil relativement approprié pour répondre aux questions de la biologie des populations végétales (Cruzan 1998).

Toutefois, l'emploi des allozymes dans les études sur la diversité génétique présente

quelques problèmes. Tout d'abord, le faible nombre de marqueurs disponibles (limité par le nombre d'enzymes isolables) et le nombre relativement faible d'allozymes pour une enzyme donnée (Avisé, 2004 ; Scholtterer 2004), limitent la précision des études dont le but est de distinguer des populations en fonction de leur particularité génétique. D'autre part, plusieurs allèles peuvent être associés à un même allozyme dans la mesure où ils peuvent être à l'origine des protéines composées d'acides aminés différents, mais ayant la même charge électrique. De ce fait, les protéines ne seront pas séparées lors de l'électrophorèse. Le problème majeur des allozymes reste leur neutralité très relative à l'origine de biais dans l'étude de la structuration génétique ou des effets de dérive génétique (Avisé, 2004).

Certains allozymes peuvent être plus efficaces dans leur fonction que d'autres. Suivant l'importance du rôle de l'enzyme et sa spécificité, le nombre d'allozymes peut varier. Une enzyme agissant sur une large gamme de substrats aura une diversité plus importante qu'une enzyme très spécifique (Gillespie et Kojima 1968). Il a aussi été montré que la complexité structurale de l'enzyme jouait un rôle sur la diversité des allozymes et le nombre de sous-unités protéiques est inversement corrélé au nombre d'allozymes (Harris et al. 1977, Nei et al. 1978): les protéines monomériques ont une diversité plus importante que les protéines multimériques et plus le poids des sous-unités est élevé, plus le nombre d'allozymes est élevé. Finalement, du fait de leur taux de mutation très faible d'environ 10^{-6} à 10^{-8} (par nucléotide et par génération) et de l'effet de la sélection, les allozymes présentent un niveau de diversité génétique réduite comparé à d'autres marqueurs moléculaires.

2-3- Les approches moléculaires à base d'ADN

Les marqueurs moléculaires constituent une nouvelle génération de marqueurs génétiques qui ont été fournis par l'utilisation de l'ADN (Ziegenhagen *et al.*, 2005). Un marqueur génétique par définition, implique les principes de l'évolution : un trait variable ou un phénotype est défini comme marqueur génétique lorsque la relation entre le phénotype et le génotype sous-jacent est clairement déterminée par l'analyse de descendance (Gillet 1999). Les marqueurs moléculaires quant à eux permettent d'observer, de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de séquence de l'ADN de sites ou de locus répartis sur le génome. Ce polymorphisme est détecté soit directement sur des séquences codantes ou non codantes de la molécule d'ADN, d'où le nom de marqueurs moléculaire. Les marqueurs moléculaires ciblent une partie du génome à étudier et ils sont considérés comme des outils versatiles permettant la mise en évidence du polymorphisme moléculaire entre genres, espèces, populations et même

entre individus. Entre autres, ces marqueurs offrent plusieurs avantages par rapport à leurs homologues phénotypiques et biochimiques traditionnels puisqu'ils ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. On admet en général qu'ils révèlent un polymorphisme neutre non soumis à la sélection (Rand, 1996).

Il existe plusieurs types de marqueurs dont certains peuvent détecter des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN ou des différences du nombre de copies de certains motifs répétés. Le marqueur moléculaire est considéré idéal lorsqu'il est :

- Polymorphe : variable entre les individus
- Discriminant : différencie entre les individus apparentés
- Multi allélique : possède plusieurs allèles sur un même locus
- Co-dominant : capable de différencier entre les individus homozygotes et les individus hétérozygotes
- Non épistasique : indépendant de l'expression des autres marqueurs
- Neutre : quel que soit l'allèle présent au locus, la valeur sélective de l'individu est la même
- Reproductible d'une expérience à l'autre
- Manipulable à grande échelle

2-3-1. Les marqueurs dominants

a- Les marqueurs RAPD (Random amplified Polymorphic DNA)

La technique RAPD (Random amplified Polymorphic DNA) est basée sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Williams *et al.*, 1990). Contrairement à la technique mère PCR, l'amplification de marqueurs RAPD nécessite seulement une courte amorce de 6 à 10 bases (Caetano-Anollés *et al.*, 1992; Welsh et McClelland, 1990) et dont la séquence est arbitraire, c'est à dire on n'a pas besoin d'une connaissance préalable de la séquence génomique. Un gel d'agarose permet de visualiser les patrons RAPD (Williams *et al.*, 1990 ; Caetano-Anollés *et al.*, 1992 ; Welsh et McClelland, 1990). Ceux ci sont représentatifs de tout le génome du fait que les marqueurs sont générés à partir des parties codantes et non codantes du génome (Williams *et al.*, 1993). Les produits d'amplification sont séparés sur des gels d'agarose, en présence de bromure d'éthidium et visualisés sous une

lumière ultraviolette (Williams *et al.* 1990 ; Karp *et al.* 1996). Il est largement reconnu que, pour obtenir des profils reproductibles sur les gels, il est absolument essentiel de maintenir des conditions de réaction homogènes. De nombreuses études ont rapporté les effets distincts de la modification des différents paramètres de PCR tels que: le ratio de la matrice d'ADN et l'amorce et la concentration de la Taq polymérase et de MgCl₂ sur les bandes obtenues (Devos *et al.*, 1992 ; Pammi *et al.*, 1994). Bien que d'un coût peu élevé et permettant de mettre en évidence une large variabilité en un faible nombre de réactions, cette technique présente des défauts majeurs et elle a été largement critiquée. La grande faiblesse de la technique RAPD est la dominance des marqueurs (Williams *et al.*, 1990) . Un allèle est amplifiable par PCR (marqueur) , tandis que l'autre ne l'est pas à cause soit d'une mutation, soit d'insertion ou délétion. Chez un individu diploïde, il est en général impossible de distinguer les individus homozygotes dominants (AA) des individus hétérozygotes (Aa). Cependant les traitements statistiques permettent de faire des analyses basées sur des fréquences alléliques. En apportant des corrections pour les échantillons de petite taille, la fréquence de l'allèle nul peut être calculée et un estimé 'asymptomatique' peut être obtenu (Lynch et Milligan, 1994). La faible reproductibilité d'une réaction à l'autre et plus généralement d'un laboratoire à un autre est un défaut majeur qui limite l'utilisation de la technique RAPD.

b- Les marqueurs AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Les marqueurs AFLP rentrent dans la catégorie des marqueurs anonymes tels que les RAPD, ils produisent des marqueurs dialléliques avec un allèle dominant. Ils permettent de concevoir des marqueurs génétiques sans développement antérieur. Ils consistent à la recherche de bandes polymorphes entre les individus dans un profil multi bandes. Ces marqueurs sont le résultat d'une digestion enzymatique de l'ensemble de l'ADN génomique, puis amplification PCR sélective des fragments de restriction (Vos *et al.* 1995). Les AFLP sont bien adaptés à la réalisation de cartes génétiques des espèces non encore cartographiées, en raison du gain de temps et d'argent qu'apporte leur utilisation en comparaison avec les marqueurs microsatellites non encore développés et l'étude de la diversité génétique (Powell *et al.* 1996b ; Angiolillo *et al.* 1999 ; Pometti *et al.* 2012) . Ils sont adaptés pour les espèces ayant des ADN génomiques de grande taille (Han *et al.* 1999), et/ou polyploïdes (McNeil *et al.* 2011). Pour augmenter sa réussite en termes d'élaboration de cartes génétiques chez les espèces polyploïdes, la technique des AFLP a été améliorée en combinant les microsatellites

et les AFLP M-AFLP (Albertini et al. 2003). Le principal avantage de la technique AFLP est, comme le RAPD, la relative facilité de la mise au point des marqueurs qui ne demande pas de connaissance *a priori* du génome de l'espèce étudiée. Cette méthode montre une reproductibilité élevée (Schlotterer, 2004), mais elle présente certaines limites. Elle nécessite un ADN de très bonne qualité et des tests de répétabilité afin d'estimer le taux d'erreur du génotypage (Avisé, 2004). Les marqueurs AFLPs ont été utilisés dans la cartographie de plusieurs espèces végétales comme le riz (Mackill et al. 1996), le maïs (Castiglioni et al. 1999), la tomate (Haanstra et al. 1999), le melon (Wang et al. 1997) et la laitue (Jeuken et al. 2001).

Cependant, la dominance des marqueurs AFLP et RAPD, font d'eux des marqueurs moins informatifs sur la structure génétique des populations surtout au niveau de leur composition hétérozygote, et la recherche des variantes fonctionnelles des gènes pertinents.

2-3-2. Les marqueurs co-dominants

a- Les marqueurs RFLPs (Restricted Fragment Length Polymorphism)

Les RFLPs (Bostein et al. 1980) ont été la première technique d'étude directe de l'ADN (Schlotterer 2004). Cette technique consiste à découper l'ADN à l'aide d'enzymes dites de restriction. Ces enzymes reconnaissent des sites spécifiques de l'ADN dont le nombre et l'emplacement peuvent varier du fait de la mutation, de l'insertion ou de la perte de bases (Schlotterer, 2004). Bien que très prometteuses, les marqueurs RFLPs sont de moins en moins utilisés (Schlotterer, 2004) car des problèmes techniques ont été rencontrés lors de la mise en place des protocoles pour chaque nouvelle espèce (Avisé 2004, Freeland 2005).

b- Les marqueurs SNPs (Single nucleotide polymorphism)

Les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont basés sur le polymorphisme à l'échelle d'une seule paire de base (Brookes, 1999, Avisé 2004) et qui n'ont donc que deux états possibles, homozygote ou hétérozygote. Beaucoup de SNPs n'ont pas d'implications fonctionnelles mais ils définissent un locus unique dans le génome. Les récents progrès en matière de séquences d'ADN et la mise au point de méthodologies à haut débit ont rendu possible l'identification et l'analyse de la variation nucléotidique à grande échelle. Ces marqueurs relativement récents et encore peu utilisés sont prometteurs pour l'étude de la diversité génétique des populations (Morin et al. 2004).

c- Les marqueurs InDels (INsertions/Délétions)

Un polymorphisme d'insertion / délétion, généralement abrégé "insertion-délétion," ou "InDels" est un type de variation génétique dans laquelle une séquence de nucléotides spécifique est présente (insertion) ou absente (suppression). Bien qu'ils soient moins fréquents que les SNPs, les InDels sont largement répartis dans le génome. Les InDels comprennent un total de 3 millions des 15 millions de variantes génétiques connues (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). Une insertion-délétion dans la région codante d'un gène qui n'est pas un multiple de trois nucléotides se traduit par une mutation par décalage de cadre. Le déplacement du cadre de lecture et la séquence de transcription d'ADN peuvent maintenir le code pour un ensemble tout à fait différent d'acides aminés ou d'entraîner un codon stop prématuré, ou de modifier la structure et la fonction des protéines (Rodriguez-Murillo et Rany, 2013). Le polymorphisme InDels peut être détecté en utilisant des méthodologies à haut débit comme il peut être détecté par l'intermédiaire d'électrophorèse de gel d'agarose (Lee et al. 2012). Par conséquent, les études sur ce type de polymorphisme sont devenues les plus appropriées pour l'usage de routine et de haut-débit en recherche fondamentale aussi bien qu'en amélioration appliquée.

d- Les marqueurs microsatellites (SSR)

Les microsatellites sont sans doute les marqueurs les plus employés dans les études de suivi de la diversité génétique. Ce sont des séquences d'ADN non codantes composées généralement de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques répétés en tandem mais ils peuvent être dans certains cas hexa-nucléotidiques (6 nucléotides qui se répètent) (Oliveira et al. 2006). Les plus courantes sont (A)_n, (AT)_n, (GA)_n, (GT)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, (Santoni *et al.* 2000). Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt en génétique des microsatellites réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé sous forme de nombre d'unités de répétition qui constituent la séquence microsatellite. Les crossing-over asymétriques peuvent être une des origines de ce fort polymorphisme des microsatellites, mais ils sont très peu présents dans les séquences codantes (Kijas et al. 1994). De plus, les microsatellites possèdent les caractéristiques requises pour être un marqueur idéal. En effet, ils sont neutres, marquant essentiellement les régions non-codantes, codominants, spécifiques d'un locus, avec un coût et une technicité abordable. Ces caractéristiques sont très importantes pour les études en génétique des populations dont les théories reposent généralement sur des

concepts de neutralité, d'indépendance et de grande variabilité pour différencier les populations et les individus.

Les régions adjacentes de microsatellites, sont conservées ce qui permet de les amplifier par PCR (Weising et al. 1995) à l'aide de deux amorces spécifiques (sens et anti-sens) (Akkaya et al. 1992). Ils constituent une autre génération de marqueurs moléculaires, connus pour leur taux de mutations élevé, ceci est vérifié sur les différences de taille entre deux allèles pour un individu donné (Powell et al. 1996a). La diversité de la taille résulte d'une différence de nombre de répétition du motif SSR (Akkaya et al. 1992). L'unicité et la valeur des microsatellites résultent de leur polyallélisme (Tautz 1989 ; Akkaya et al. 1992), la codominance (Morgante et al. 1993), la facilité de détection par PCR, l'abondance relative et la large répartition dans l'ensemble du génome (Powell et al. 1996a ; Powell et al. 1996b). Leur évolution dans le règne végétal a débuté avec la découverte de leur polymorphisme chez le *Soja* (Akkaya et al. 1992). Par ailleurs, certains auteurs ont montré que les microsatellites jouent un rôle dans la régulation et le fonctionnement des gènes (O'Donnell et al. 1994 ; Kashi et Soller, 1999).

3- Les facteurs influençant la dynamique de la diversité génétique

La dynamique de la diversité génétique des populations est sous l'influence de plusieurs facteurs. Ces facteurs peuvent être d'ordre biologique, génétique, démographique ou biophysique.

3-1- Facteurs d'ordre biologique : Les systèmes de reproduction

Le système de reproduction est l'un des plus importants facteurs déterminant la structure génétique des populations (Hamrick, 1982) et leur aptitude à subir des changements adaptatifs. Différentes structures de la diversité peuvent être générées en fonction du type de reproduction. Ainsi, les plantes principalement autogames peuvent avoir une forte variabilité génétique intra-population et une faible variabilité inter-population. De la même façon, les plantes qui se reproduisent par voie asexuée présentent une plus grande variabilité inter-population. Par contre, pour les plantes qui sont essentiellement allogames, on peut observer jusqu'à 90% de la variabilité au niveau intra-population (Hamrick et Godt, 1997).

3-2- Les facteurs d'ordre génétique : Les forces évolutives

Depuis quelques dizaines d'années, la détermination de la contribution relative des différents processus évolutifs stochastiques et déterministes dans la maintenance de la diversité génétique des populations naturelles est une problématique majeure en biologie de la conservation (Eldredge 1989; Mauricio 2005). Mais il a été démontré que le niveau de diversité génétique des populations et des variations de fréquences alléliques dépend de l'action respective de quatre forces évolutives pouvant interagir les unes avec les autres : la mutation, la sélection, la migration et la dérive génétique. Elles sont à l'origine de la structure de la diversité génétique et de son évolution.

3-2-1. Les mutations

Le phénomène de mutation est la source fondamentale de variation génétique et correspond à un changement héréditaire dans le matériel génétique de l'organisme. Les mutations sont importantes car elles apportent de la richesse par la création de nouveaux allèles.

Les mutations sont des modifications de l'information génétique. Elles peuvent survenir aléatoirement au cours de la réplication de l'ADN mais peuvent aussi être dues à des agents mutagènes physiques (par exemple, les rayonnements ultra-violets), chimiques ou biotiques (virus et transposons).

La recombinaison est un processus qui entraîne un brassage de matériel génétique intra- ou inter-chromosomique et dont la conséquence est la création de nouvelles combinaisons alléliques.

Les mutations (et recombinaisons) qui augmentent ainsi la diversité génétique globale en générant de nouveaux allèles et de nouveaux haplotypes peuvent être de différentes classes. Le polymorphisme chromosomique peut être dû soit à une variation du nombre des chromosomes soit à un changement de leur structure (délétion, duplication, inversion, translocation).

Le polymorphisme d'insertion caractérise des éléments d'ADN capables de s'insérer dans différentes régions du génome. Inversement, le polymorphisme de délétion supprime certaines régions du génome, alors que le polymorphisme d'inversion comme son nom

l'indique provoque un changement dans l'ordre de certaines séquences dans le génome. Le polymorphisme ponctuel signifie des changements à l'échelle du nucléotide (SNP). Enfin, le polymorphisme de taille correspond à une variation du nombre de motifs répétés sur un brin d'ADN, comme nous pouvons l'observer chez les microsatellites (SSR). Différents marqueurs moléculaires existent pour travailler sur ces différents types de polymorphismes

Les mutations affectent l'ensemble du génome. Celles-ci sont silencieuses lorsqu'elles n'ont pas d'impact évolutif. Par contre, des changements fonctionnels peuvent avoir lieu d'une part, lorsqu'elles entraînent des changements d'acides aminés (mutation non-synonyme) dans les régions codantes et donc des modifications structurales et fonctionnelles des protéines. D'autre part, les mutations affectant les régions non-codantes peuvent aussi avoir un impact évolutif. En effet, elles peuvent entraîner des modifications dans les régions de l'ADN ayant un rôle important dans la régulation de la transcription et dans l'organisation du génome et qui sont donc soumises à des pressions de sélection indiquant qu'elles ont un rôle évolutif et fonctionnel majeur (Wang *et al.* 1999).

3-2-2. La dérive génétique

La dérive génétique, qui agit sur tout le génome, représente un changement aléatoire des fréquences alléliques au cours des générations dans une population de taille finie (Falconer et Mackay 1996, Frankam, 2002). En effet, dans une population de taille finie, les fréquences alléliques varient sous l'effet du hasard d'une génération à l'autre. Plus la population sera petite, plus les effets de la dérive seront grands car les écarts de fréquences alléliques y seront d'autant plus visibles d'une génération à l'autre. La dérive peut aboutir à l'élimination ou à la fixation d'un allèle pour tous les individus de la population. Les chances de fixation ou d'élimination d'un allèle dépendent évidemment de sa fréquence dans la population. Plus il est fréquent, plus il aura de chances d'être fixé tandis que plus l'allèle est rare, plus il sera sujet à l'élimination (s'il ne confère bien entendu aucun avantage sélectif). La probabilité de fixation, pour un allèle qui vient d'apparaître dans la population par mutation, en absence de sélection, est de $1/2N$ (avec $2N$: nombre total de gamètes pour une population diploïde). Contrairement aux mutations, la dérive génétique aura tendance à réduire la diversité génétique. Elle se répète au cours des générations successives et conduit à une perte d'allèles. Son importance dépend de la taille de la population et de la variation aléatoire des contributions de chaque génotype à la reproduction.

3-2-3. La migration (Flux des gènes)

En génétique des populations, la migration se réfère au mouvement de gènes entre populations. Les flux géniques sont le résultat de la contribution génétique d'une population migrante sur la future génération de la population « puits ». Ils ont pour effet l'augmentation de la richesse allélique pour les populations qui reçoivent ces migrants. À long terme, lorsque les flux de gènes sont réciproques d'une population à une autre, les fréquences alléliques entre populations s'homogénéisent (Slatkin 1985) induisant une réduction de la différenciation génétique. L'homogénéisation est d'autant plus forte que les flux de gènes sont importants. Il est utile de noter que les flux de gènes ont généralement lieu au sein d'une même espèce, mais il existe aussi des flux de gènes interspécifiques, notamment entre les espèces d'un même complexe

Chez les plantes, les flux de gènes se produisent par la migration des propagules (reproduction végétative), des graines ou encore du pollen. La dispersion des graines et du pollen peut être de deux types : anémochore/anémophile (migration par le vent), ou entomochore/entomophile (migration due aux insectes). Le système de dispersion du pollen et des graines est bien évidemment directement lié à ce processus (Hamrick *et al.* 1993). Son importance pour les espèces végétales dépend du mode de reproduction de la plante, de la répartition spatiale des populations et des modes d'acquisition des variétés et des semences.

Pour les espèces fortement autogames, la migration consiste en des mélanges volontaires ou involontaires de semences issues d'individus dissemblables provenant d'un même site ou des sites géographiquement voisins, on parle dans ce cas d'une dispersion locale, ou d'individus provenant des sites éloignés géographiquement, on parle dans ce cas d'une dispersion à longue distance (Figure 12). La dispersion des graines et du pollen favorise les échanges de gamètes et les recombinaisons génétiques. Pour les espèces allogames, la synchronisation même de la floraison pourrait favoriser rapidement les échanges de gamètes, sans qu'il y ait nécessité préalable de mélange des semences.

Les marqueurs génétiques offrent une aide précieuse pour l'estimation des flux de gènes (Slatkin 1985; Neigel 1997). Ces estimations reposent sur des modèles évolutifs comme le modèle continent-île qui prend surtout en compte des flux de gènes unidirectionnels (de la population la plus grande à la population la plus petite), comme le modèle en îles (Wright 1951) où toutes les populations sont de même taille et échangent le même nombre de migrants

ou comme le modèle de « stepping-stone » (Wright 1943) qui prend en compte les distances géographiques entre populations.

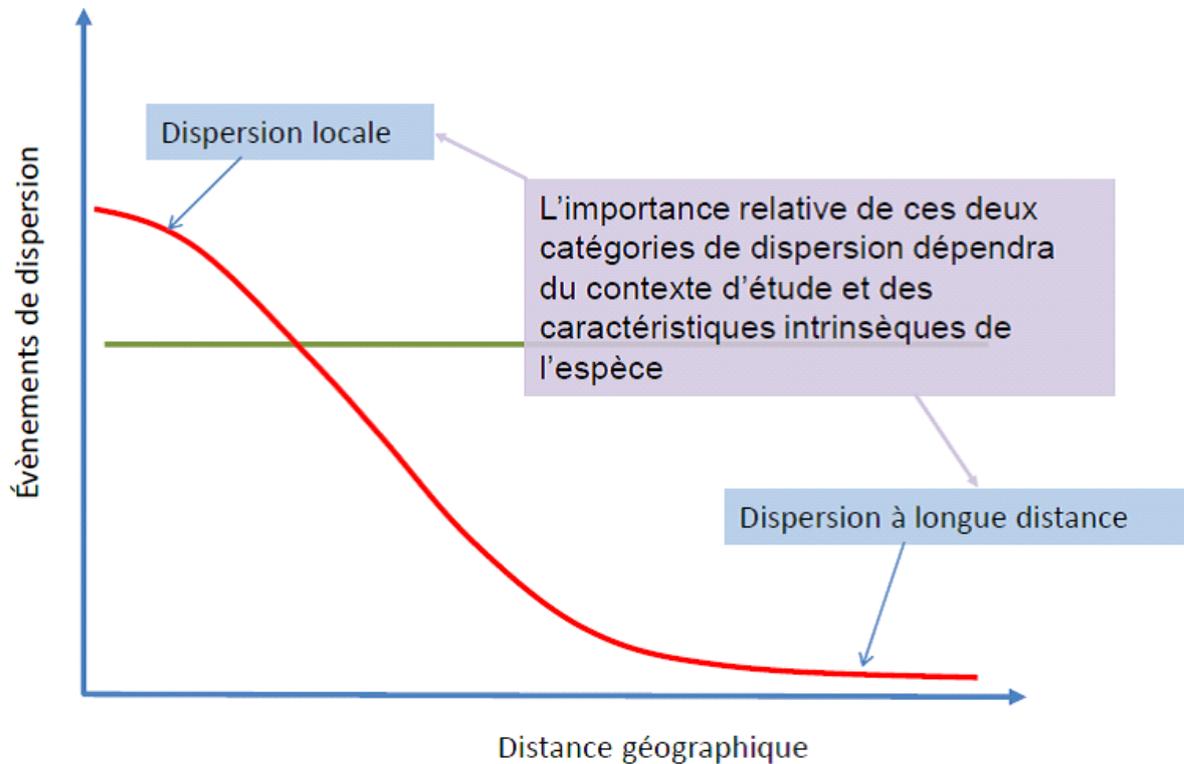


Figure 12: Les modes de dispersion des graines ou du pollen en fonction des distances géographiques.

3-2-4. La sélection naturelle

La sélection est définie comme la compétition pour la survie et la reproduction entre individus et entre populations de la même espèce. Elle fait le tri entre les individus montrant un différentiel de survie et de reproduction dans un environnement. Elle augmente ainsi la fréquence des phénotypes les plus favorables à la survie et à la reproduction (donc ayant une plus grande vigueur) tandis que les phénotypes les moins adaptés tendront à disparaître.

Avancée par Charles Darwin en 1859 dans « L'Origine des espèces », la sélection naturelle est un mécanisme qui contribue à l'évolution des espèces. Elle entraîne le changement des fréquences alléliques dans les populations à chaque génération.

Pour que la sélection agisse, il est nécessaire que (i) les individus d'une population ne soient pas tous identiques (variation de traits), (ii) qu'une part de cette variation affecte les

traits liés à la capacité de survivre et/ou de se reproduire, et (iii) que les différences de survie/reproduction soient dues à des variations génétiques héritables (par conséquent, ces différences doivent être contrôlées par des gènes transmissibles de génération en génération). Les porteurs des mutations avantageuses ont plus de descendants qui à leur tour auront plus de descendants et ainsi de suite, aboutissant alors à une population dont les individus sont adaptés à leur milieu. Contrairement à la migration et à la dérive génétique qui affectent l'ensemble du génome, la sélection n'agit que sur certains loci, et sur leur voisinage direct (locus liés physiquement).

An niveau intra-population, trois types de sélection naturelle sont définies qui engendrent différentes signatures moléculaires (Figure 13): la sélection purifiante, la sélection positive et la sélection balancée :

- La **sélection purifiante** (également appelée sélection purificatrice ou négative) élimine les allèles délétères.
- la **sélection positive**, contrairement à la sélection purifiante, entraîne l'augmentation en fréquence des allèles qui confèrent un avantage sélectif. Une forte sélection positive peut conduire à un balayage sélectif correspondant à une réduction de la diversité autour de l'allèle sélectionné par effet d'entraînement des variants neutres avoisinants qui sont en déséquilibre de liaison avec l'allèle sélectionné (Maynard Smith et Haigh 1974).
- La **sélection balancée** maintient dans une population deux ou plusieurs allèles à un locus donné. Ce maintien de polymorphisme peut être en partie expliqué par l'hétérogénéité spatiale et/ou temporelle de l'environnement (Nielsen, 2005) ou encore par un avantage aux hétérozygotes (Takahata *et al.* 1992).

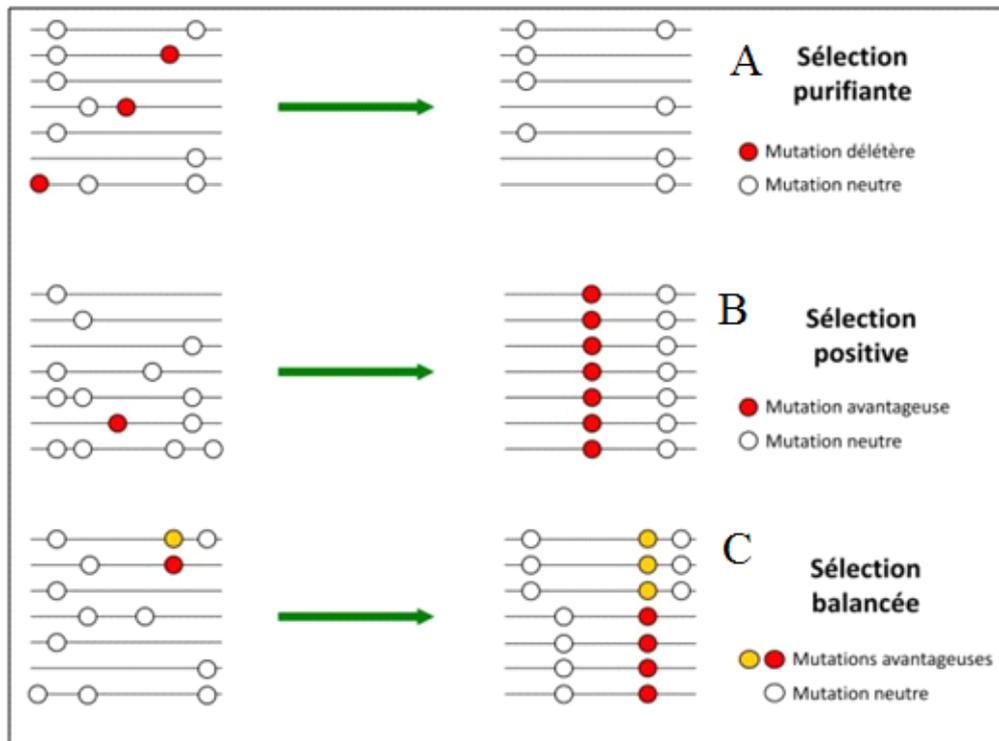


Figure 13: Illustration des différentes formes de sélection au niveau moléculaire au sein d'une population, d'après Audigeos (2010) : (A) la sélection purifiante élimine rapidement les mutations défavorables, (B) la sélection positive fixe rapidement les mutations favorable et (C) la sélection balancée maintient plusieurs mutations bénéfiques en fréquence intermédiaire.

Au niveau inter-population, on fait référence à la sélection divergente. Elle agit dans les populations de façon opposée sur des caractères phénotypiques identiques. Il en résulte l'accumulation de fort niveau de différenciation génétique au niveau des locus soumis à sélection divergente (Nosil *et al.* 2009). Comme elle peut être la résultante de l'adaptation locale.

En résumé, ce sont les interactions entre les quatre forces évolutives, ayant parfois des effets contrastants, qui affectent la structure génétique des populations naturelles. Ainsi, le processus de dérive génétique tendra à augmenter la différenciation entre les populations et ce, d'autant plus que les populations ont de faibles effectifs, tandis qu'une migration efficace entre les populations aura pour effet de les homogénéiser. En conditions environnementales similaires, la sélection naturelle ralentira la différenciation entre les populations alors qu'elle la favorisera lorsque les conditions sont distinctes. La variation génétique d'une espèce, résultant des mutations, sera donc maintenue, éliminée, organisée et/ou distribuée à l'intérieur et entre les populations selon l'équilibre et les interactions complexes entre la sélection naturelle, la migration et la dérive génétique.

3-3- Les facteurs démographiques

3-3-1. La taille efficace des populations

Dans la nature, les individus d'une même espèce ne forment généralement pas une seule population, mais se dispersent (ou sont dispersés) et se répartissent en plusieurs populations. Chacune de ces populations évolue dans des conditions qui lui sont propres et peut acquérir une certaine originalité génétique et/ou démographique caractérisée par des fréquences alléliques et une taille (nombre d'individus) plus ou moins différentes de celles des populations voisines. Par ailleurs, du fait qu'elles subissent diverses forces évolutives (sélection, mutation, dérive génétique) la plupart des populations naturelles ne suivent pas la loi de Hardy-Weinberg².

La relation existante entre la taille de la population et la variabilité génétique a été étudiée chez plusieurs espèces végétales et les résultats de ces travaux sont controversés. Chez *Silene regia* par exemple; le type de corrélation reliant la taille des populations à la variabilité génétique varie en fonction de la région prospectée (Dolan, 1994). Les études réalisées sur des populations expérimentales de *Lolium multiflorum* ont montré que la diminution de la taille des populations entraîne une importante chute de la variabilité génétique (Polans et Allard, 1989). En revanche, chez *Gentiana pneumonanthe*, cette corrélation dépend du paramètre génétique considéré (Raijmann et al., 1994) alors qu'aucune corrélation n'a été mise en évidence chez *Senecio integrifolius* (Widen, 1993). Cependant, d'une façon générale les petites populations ont tendance à perdre de la variabilité génétique au fil du temps. Cette perte de la variabilité génétique peut réduire le potentiel adaptatif ou les changements évolutifs, ce qui accroît la probabilité d'extinction des populations (Hedrick et Miller, 1992).

3-3-2. Les changements démographiques

Au cours des générations, la taille efficace des populations naturelles est rarement stationnaire. En effet, une population peut connaître des phases d'augmentation ou d'expansion démographique qui se traduit par une augmentation de la taille efficace (N_e)

² Dans une population diploïde idéale, les fréquences alléliques d'un gène s'exprimant sous la forme de deux allèles A et a sont constantes au fil des générations. Plus précisément, si p est la fréquence d'apparition de l'allèle A (la fréquence de l'allèle a étant $1 - p$) à la génération n, alors c'est encore le cas à la génération n + 1.

d'une population³. Il en résulte, qu'avec un plus grand nombre d'individus, ce processus démographique provoque une augmentation de la variabilité génétique. En effet, une taille efficace plus grande apporte une probabilité plus grande d'apparition de nouveaux allèles et donc une plus grande richesse allélique. Mais par cet excès d'allèles rares, la diversité génétique observée dans la population en expansion serait alors plus faible que la diversité calculée pour une population en équilibre démographique à partir du nombre d'allèles observée. Inversement, une réduction rapide de la taille efficace d'une population, un goulot d'étranglement (« bottleneck ») a pour conséquence une diversité génétique de la population supérieure à la diversité génétique sous l'équilibre démographique par l'élimination plus rapide des variantes génétiques rares sous l'effet du hasard (du fait des effets importants de la dérive génétique sur les plus petites populations) et provoquera aussi une augmentation de la consanguinité au sein de la population. La reconstruction de l'histoire généalogique des gènes, offre, entre autre, la possibilité de détecter et même de dater de changements démographiques passés (Kingman, 1982; Rosenberg et Nordborg 2002; Nordborg 2004).

3-4- Les facteurs biophysiques

Les contraintes abiotiques regroupent le climat (température, pluviométrie, vent et ensoleillement), le sol, l'altitude, et la topographie. Ces contraintes peuvent agir comme des contraintes sur les plantes. Dans une population génétiquement variée, les individus les mieux adaptés se développent et se reproduisent davantage pendant que d'autres sont pénalisés. Dans ce cas, les contraintes exercent des pressions sélectives sur la population qui va évoluer au cours des générations.

³ On définit l'effectif efficace de la population (ou taille efficace) comme l'effectif d'une population idéale pour laquelle on aurait une fluctuation du polymorphisme équivalente à celle de la population naturelle. C'est donc le nombre d'individus d'une population idéale pour lequel on aurait un degré de dérive génétique équivalent à celui de la population réelle.

MATERIEL ET METHODES

I- Matériel végétal

1- Prospection et collecte

Les prospections et les collectes ont été faites sur le territoire tunisien aux mois de juillet, aout et septembre 2010. En l'absence de données sur la distribution géographique des espèces *Brachypodium* en Tunisie qui sont susceptibles d'orienter l'échantillonnage, nous avons suivi 3 principaux critères de collection :

- La distance géographique entre les sites d'échantillonnage : les distances entre les populations étaient au moins 35 km.
- la diversité des conditions climatiques : notre prospection avait pour objectif de collecter des populations représentatives de toutes les régions bioclimatiques de la Tunisie.
- l'éloignement des agglomérations: les sites d'échantillonnage ont été choisis dans des milieux naturels sauvages encore éloignés des agglomérations urbaines, permettant ainsi, en cas de besoin, de retourner sur le terrain et de faire un nouvel échantillonnage.

Ainsi les sites délimités suite à la prospection sont au nombre de 9 populations. Ces stations de collection couvrent la quasi-totalité de l'aire de distribution de *Brachypodium spp* en Tunisie (Figure 14) et sont suffisamment représentatives de 6 eco-régions (zones bioclimatiques). L'échantillonnage s'étend de la côte méditerranéenne à l'extrême Nord jusqu'au centre de la Tunisie avec une altitude qui varie de 3 à 880 m. Au sein de chaque population, les épis de plus de 20 plantes mères ont été collectés séparément. Afin de minimiser le risque d'échantillonnage d'individus étroitement apparentés nous avons respecté un espacement de 10 m au minimum entre les pieds voisins dans chaque station. Par ailleurs, aucune sélection phénotypique n'a été pratiquée pour garder le maximum de la diversité naturelle. A fin de caractériser les populations échantillonnées dans leurs milieux naturels nous avons noté les principales caractéristiques géographiques et climatiques de chaque station (tableaux 2 et 3). Les distances géographiques et les différences d'altitude entre les populations sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 2: Principaux paramètres écologiques des 9 populations Tunisiennes de *Brachypodium spp.*

Origine géographique	ID	Localité	Longitude (E)	Latitude (N)	Altitude (m)	zone bioclimatique
Nord	7	Sejnen	37°4'38.90"	9°9'51.10"	115	Humide
	9	Zaghouan	36°22'6.80"	10°5'20.00"	450	Semi-aride supérieur
	6	Raouad	36°57'0.00"	10°14'14.00"	3	Semi-aride supérieur
	1	Ain Draham	36°48'10.33"	8°41'29.02"	134	Humide
Centre	3	Fayedh	35° 4'4.1"	9° 40'32.1"	83	Aride
Nord West	5	El Kef	36° 6'36.80"	8°37'39.00"	482	Semi-aride inférieur
Sahel	2	Enfidha	36° 7'8.04"	10°27'44.90"	7	Semi-aride inférieur
Nord West	8	Douar El Hej wniss	35°40'56.40"	8°53'49.00"	880	Semi-aride
Cap-bon	4	Hawaria	37° 2'21.00"	11° 0'53.20"	23	Sub-Humide

Tableau 3: Matrice des distances géographiques (au dessus de la diagonale) et matrice des différences d'altitude (au dessous de la diagonal) par paires de populations. (ALT : Differences d'altitude ; D.G : Distances géographiques)

D.G \ ALT	Fayedh	El kef	Enfidha	Daouar El Hej W	Sejnen	Jbel Zaghoua	Raouad	Ain Draham	Hawaria
Fayedh	0	148,995	136,42	97,461	226,735	149,081	215,115	211,796	249,084
El kef	399	0	165,077	53,773	117,408	135,124	172,795	77,906	237,129
Enfidha	76	475	0	149,997	156,985	43,079	94,486	175,57	113,005
Douar El Hej	797	398	873	0	157,18	133,166	187,016	127,034	243,074
Sejnen	32	367	108	765	0	113,959	97,282	51,031	164,598
Jbel Zaghoua	467	32	443	430	335	0	66,107	134,199	110,374
Raouad	80	479	4	877	112	447	0	139,188	68,872
Ain Draham	151	348	16	746	19	316	111	0	208,038
Hawaria	60	479	443	857	92	427	20	131	0

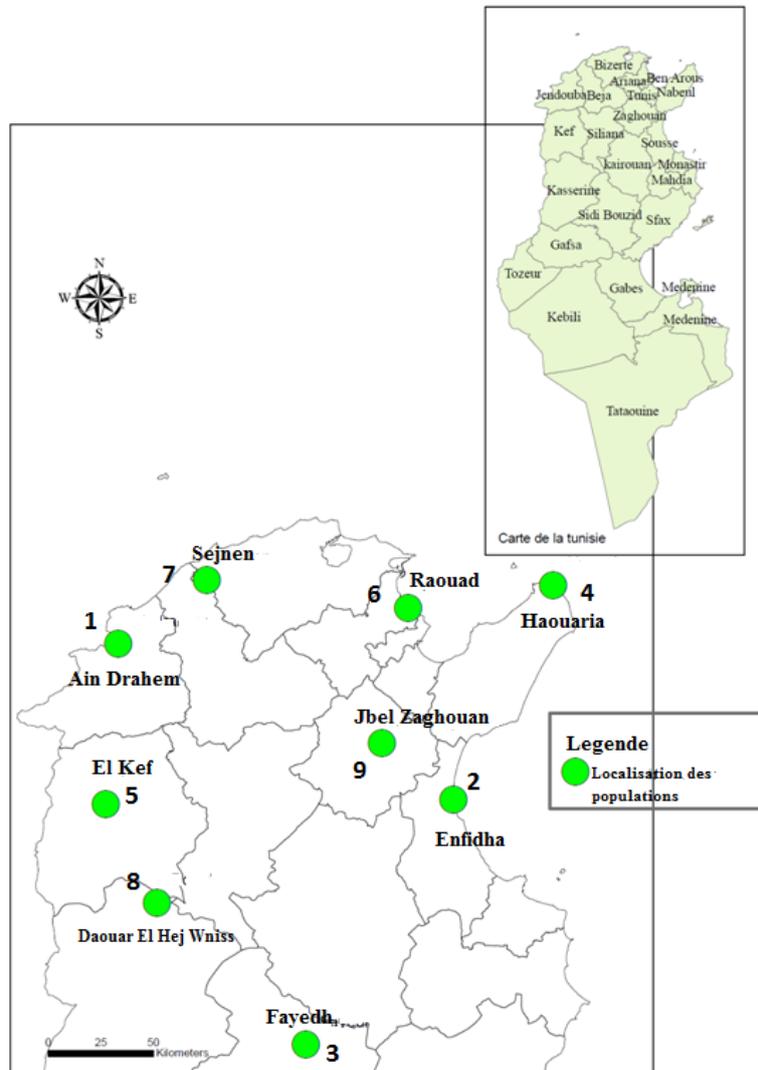


Figure 14: Répartition géographique des neuf populations étudiées de *Brachypodium spp*

2- Mise en culture

En octobre 2010 et pour chacune des 9 populations, 4 à 5 grains issus d'une même plante mère (on a des familles à raison de 4 à 5 répétitions par lignée⁴) ont été choisis au hasard et semés sur un sol sableux-limoneux dans des pots pourvus d'un système de drainage (perforés). Durant la première semaine de culture et afin de faciliter la germination des grains nous avons utilisé l'eau distillée pour l'irrigation. Après germination, les plantules ont été irriguées deux fois par semaine par la solution nutritive de Hewitt (Hewitt, 1966) (Tableaux 4 et 5) jusqu'au stade maturation des grains. La culture des plantes est faite sous serre plastique au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (Tunisie). Les grains obtenues ont été collectés et conservés dans des sachets en papier kraft pour des études ultérieures.

Tableau 4: La composition de la solution nutritive en macroéléments (Hewitt, 1966)

Macroéléments	Concentration (mg/l)	Concentration (mM)
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	370	1.5
KH ₂ PO ₄	218	1.6
K ₂ HPO ₄	70	0.6
KNO ₃	303	3
NH ₄ NO ₃	160	2
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	826	3.5

Tableau 5: La composition de la solution nutritive en Fer et en oligoéléments (Hewitt, 1966)

Oligoéléments	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Mo
Concentration (ppm)	3	0.5	0.04	00.5	0.05	0.02

⁴ Une lignée: C'est un ensemble d'individus sont génétiquement identiques et homozygotes pour tous leurs caractères en raison d'une consanguinité prolongée. Tous les individus d'une lignée pure ont un génotype quasi-identique. Dans notre cas, la lignée est l'ensemble d'individus issus des grains de la même plante mère.

3- Analyse de la variabilité morph-phénologique

3-1- Caractères morphologiques étudiés dans les conditions expérimentales

Dix huit caractères morpho-phénologiques considérés comme descripteurs pour les *Poaceae* sauvages sont mesurés pour chaque lignée étudiée. Ces caractères se rapportent aux développements végétatif et reproducteur (Tableau 6). La morphologie de l'appareil végétatif et l'appareil reproducteur est schématisée dans les figures 15 et 16⁽⁵⁾

Tableau 6: Les 18 caractères morpho-phenologiques étudiés

Acronymes	Les caractères morphologiques liés au développement végétatif
D2L	La date d'émergence de la deuxième feuille
NT	Le nombre de talles
LGT	La longueur de la plus grande talle
MAP	La masse de la partie aérienne
ALT	La Longueur moyenne des toutes les talles
ALL	La Longueur moyenne des feuilles
ANNT	Le nombre moyen de nœuds par talle
AID	La distance moyenne d'entre-nœuds
NLT	Le nombre de feuilles par talle
RL	La longueur des racines
LST	La longueur de la plus petite talle
	Les caractères morphologiques liés au développement d
MS	La masse d'épillets
ALS	La longueur moyenne de l'épillet
ADBS	La distance moyenne entre les épillets
ANSI	Le nombre moyen d'épillets par inflorescence
DH	La date d'épiaison
ALI	La longueur moyenne de l'inflorescence
ANSS	Le nombre moyen de graines par épillet

⁵: Les lignées photographiées ont été choisies aléatoirement et avant l'identification moléculaire des espèces.

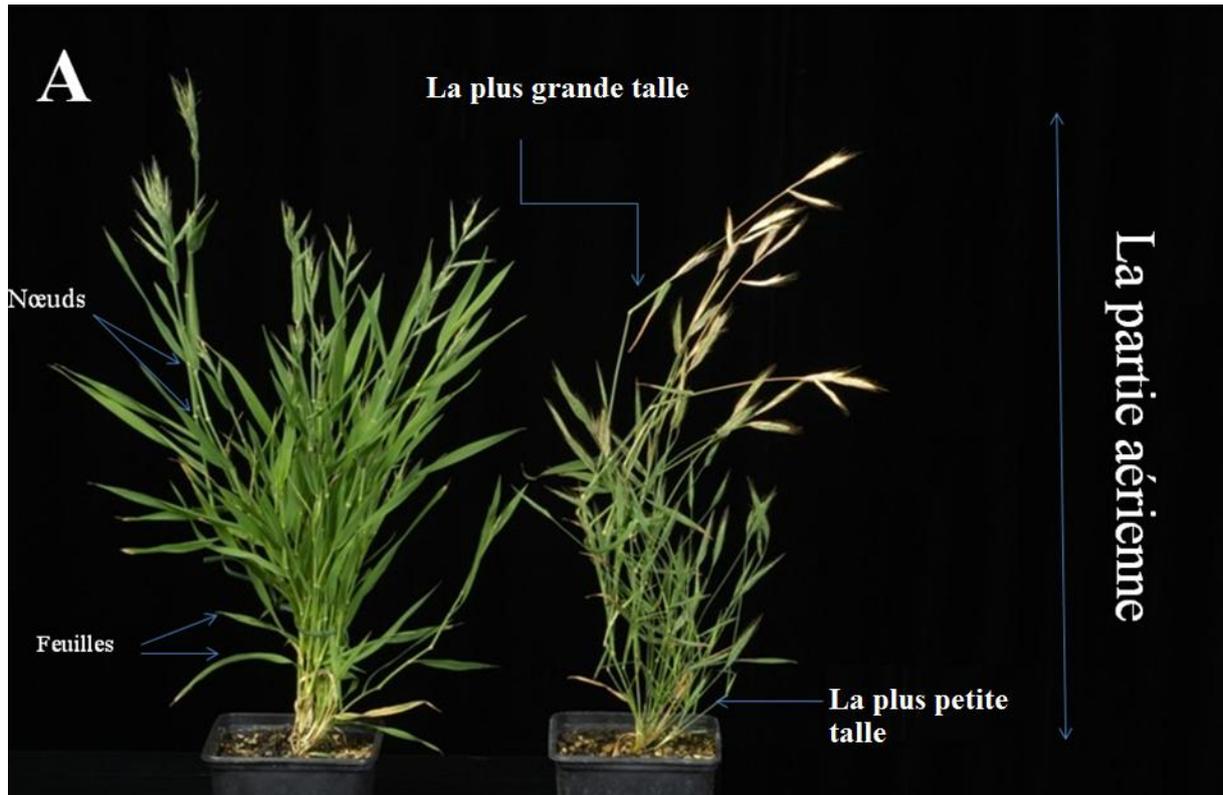


Figure 15: La morphologie de l'appareil végétatif de deux individus de *Brachypodium*

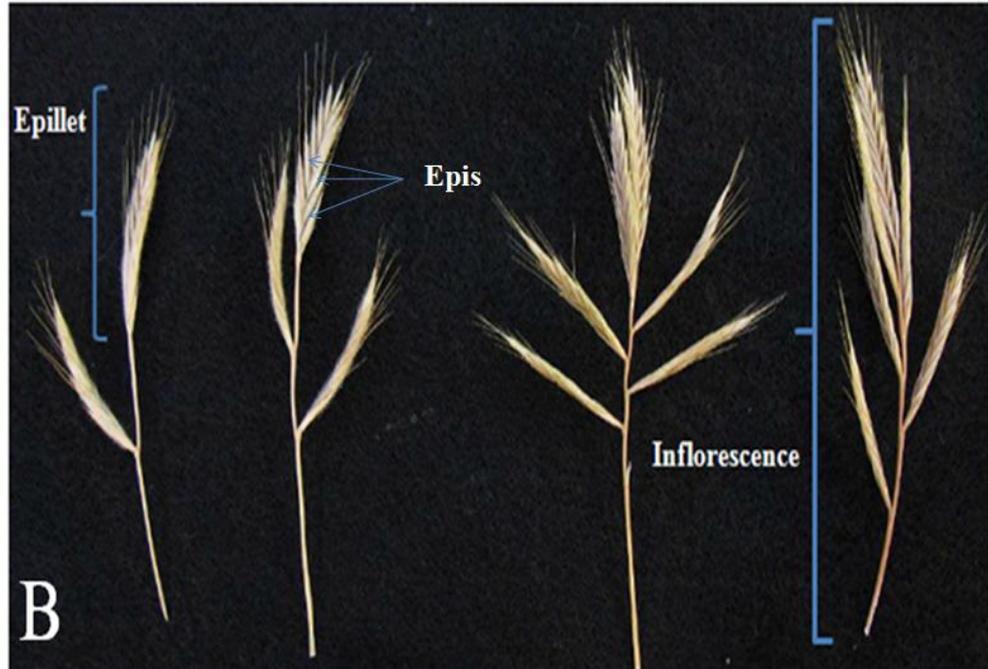


Figure 16: La morphologie de l'appareil reproducteur (Inflorescence) de 4 individus de *Brachypodium*

3-2- Traitement des données et analyses statistiques

Les données relatives aux 18 caractères morpho-phénologiques étudiés ont été analysées au moyen des diverses méthodes d'analyses statistiques uni et multivariées.

En effet, après l'identification de chaque lignée et la différenciation entre *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*, des groupes d'espèces ont été construits et les variations intra et interspécifiques sont mises en évidence. Ensuite, un ensemble d'analyses a été réalisé afin d'étudier la structure de la variation morphologique des populations naturelles de *B. hybridum*. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par les logiciels XLSTAT v13 et SPSS v20.

3-2-1. Statistique descriptive

Au niveau de la statistique descriptive, les paramètres de tendance centrale et la dispersion de chacun des traits mesurés, tels que la moyenne, l'écart type, l'étendue (minimum-maximum) et le coefficient de variation ont été déterminés. Ces statistiques permettent de décrire et de faire ressortir les limites de variation des caractères étudiés. Par ailleurs, elles sont indispensables pour la détermination des variations inter et intra spécifiques.

3-2-2. Corrélation entre les caractères

L'analyse du degré d'association entre les différentes caractéristiques morpho-phénologiques est déterminée à travers le calcul des coefficients de corrélation de Pearson. Ce test donne les coefficients de corrélation entre les différents caractères sous forme de matrice de corrélation selon le type de Pearson. L'estimation des coefficients de corrélations est donnée par la formule entre chaque couple de variables (x, y) :

$$r = \text{Cov } p(x,y) \div (\sigma^2 p x \sigma^2 p y)$$

r : coefficient de corrélation phénotypique entre les valeurs phénotypiques des variables (-1 et +1)

x, y : variables à étudier

Cov p: covariance phénotypique

$\sigma^2 p$: la variance phénotypique d'un caractère étudié

3-2-3. L'analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour évaluer la structure de la variation morphologique de l'ensemble des variables étudiées. Les données acquises ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) hiérarchique (Nested ANOVA) à deux facteurs purement aléatoires pour analyser la structure de la variation morphologique entre les familles de la même population, entre les populations et entre les classes d'altitude.

Pour chaque variable morphologique, l'ANOVA suit le modèle linéaire suivant :

$$Y = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

* Y = phénotype de l'individu « j » de la famille « i »;

* μ = moyenne générale de la variable étudié

* α_i = effet de la $i^{\text{ème}}$ population

* β_{ij} = effet combiné de la $i^{\text{ème}}$ population et la $j^{\text{ème}}$ famille

= effet combiné de la $i^{\text{ème}}$ population et la $j^{\text{ème}}$ classe altitudinale

* ε_{ij} = effet résiduel.

Les différents types d'analyse de la variance ont été suivis d'un test post hoc (test de comparaisons multiples) pour déterminer quelles distributions étaient statistiquement différentes. Nous avons choisi le test HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey, car il est considéré comme conservatif et le plus sévère dans la différenciation de deux groupes.

3-2-4. Estimation de l'héritabilité des caractères

Le modèle d'une ANOVA à un seul facteur de classification (effet famille) a été utilisé pour estimer l'héritabilité génotypique des caractères morphologiques. L'application d'un tel modèle permet d'estimer les principales composantes de la variance qui caractérisent les variables étudiées dans une population permettant d'estimer le taux d'héritabilité (σ^2_P , σ^2_G et σ^2_E). Les mesures prises pour chaque caractère donnent au niveau des moyennes des valeurs apparentes ou phénotypiques (P), qui en réalité, se composent d'une «valeur génotypique» (G) et d'une valeur due à l'effet de l'environnement (E), d'où :

$$\mathbf{P} = \mathbf{G} + \mathbf{E}$$

En termes de variabilité, la variance phénotypique ($\sigma^2_{\mathbf{p}}$) se décompose comme suit :

$$\sigma^2_{\mathbf{p}} = \sigma^2_{\mathbf{G}} + \sigma^2_{\mathbf{E}}$$

Où

$\sigma^2_{\mathbf{G}}$ = la variance génotypique

$\sigma^2_{\mathbf{E}}$ = la variance environnementale

Par définition, l'héritabilité génotypique (H^2) est la part de la variance phénotypique attribuable à l'effet du génotype. Elle traduit le degré d'hérédité de la variabilité génotypique parentale chez les descendants.

$$H^2 = \sigma^2_{\mathbf{G}} / (\sigma^2_{\mathbf{G}} + \sigma^2_{\mathbf{E}})$$

Cette héritabilité au sens large exprime la part de la variabilité totale qui est reproductible à la génération suivante par voie végétative. Si la valeur de H^2 est égale à 1, il y a eu transmission fidèle des caractères par les parents aux descendants.

Concernant l'héritabilité génétique ou l'héritabilité au sens stricte, sa valeur est estimée par la formule suivante :

$$h^2 = \sigma^2_{\mathbf{A}} / \sigma^2_{\mathbf{p}}$$

Où

$\sigma^2_{\mathbf{p}}$ = La variance phenotypique

$\sigma^2_{\mathbf{A}}$ = La variance additive

3-2-5. Indice de différenciation morphologique (Q_{st})

Le niveau de différenciation entre populations pour les caractères quantitatifs est estimé par l'indice Q_{st} (Podolovsky et Holtsford, 1995) qui est analogue à l'indice F_{st} ou l'indice Φ_{PT} calculées par des marqueurs moléculaires. Dans chaque population et pour chaque trait, nous avons évalué les composantes de variance inter-population ($\sigma^2_{\mathbf{p}bp}$) et intra-population ($\sigma^2_{\mathbf{p}wp}$).

Sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg; les deux composantes de la variance ; variance inter-population (σ_{p}^2bp) et intra-population (σ_{p}^2wp), issues d'une ANOVA hiérarchique à deux effets aléatoires (effet « famille » et effet population), nous a permis d'estimer l'indice de différenciation morphologique Q_{st} comme suit :

$$(1) \quad Q_{st} = (1+f) \sigma_{p}^2bp / ((1+f) \sigma_{p}^2bp + 2 \sigma_{p}^2wp)$$

Où f est le coefficient de consanguinité

Les espèces *Brahypodium* sont généralement autogames donc f est supposé égal à 1 et la formule (1) a été simplifiée comme suit :

$$Q_{st} = \sigma_{p}^2bp / \sigma_{p}^2bp + \sigma_{p}^2wp$$

3-3- Analyse multivariée

Actuellement, l'analyse statistique multivariée est un outil incontournable pour étudier des données provenant de nombreuses observations faites sur plusieurs variables. Elle a pour but de résumer l'information contenue dans les données sur un nombre réduit de dimensions reflétant au mieux les proximités entre observations et entre variables. Pour effectuer cette analyse, nous avons eu recours à l'Analyse en Composante Principale (ACP) et l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) et classification hiérarchique (CAH)

3-3-1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Les dix-huit paramètres morphologiques étudiés ont été soumis à une analyse en composantes principales. Cette technique est définie comme méthode de réduction des données pour mettre en évidence les relations entre deux ou plusieurs caractères et pour diviser la variance totale des caractères originaux en un nombre limité de nouvelles variables non corrélés (Wiley, 1981). Elle consiste à rechercher les corrélations existant entre N variables aléatoires parmi un ensemble de K individus en recherchant les directions (ou composantes) de l'espace qui contiennent la plus grande quantité d'informations, la plus grande quantité de variance. Ces directions sont les composantes principales (CP). Ces derniers constituent les composantes principales qui sont définies par un ensemble de valeurs propres traduisant la proportion de l'information portée par les variables de départ. Les résultats de l'ACP peuvent être visualisés sur un graphique bi ou tri dimensionnel. Généralement, les trois premières composantes principales peuvent éventuellement faire l'objet d'une interprétation particulière et les dernières pouvant généralement être négligées.

Les agrégations des individus dans un tel graphique révélera les groupes morphologiquement (génétiquement) similaires (Warburton et Crossa, 2000).

3-3-2. Analyse Factorielle Discriminante (AFD)

Couvrant un aspect explicatif et prédictif, l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) consiste à déterminer les caractères discriminants d'une population répartie en groupes mais aussi à affecter des individus dans les groupes correspondants. Ainsi, au delà de la description des oppositions entre groupes, l'analyse discriminante vise à construire un outil à la décision qui permet d'affecter à une des catégories toute observation nouvelle caractérisée par ses descripteurs mais dont on ignore le groupe d'appartenance. Il s'agit donc, grâce à l'outil statistique construit, de prévoir l'appartenance à un des groupes (Bardos, 2001).

L'analyse discriminante linéaire part de la connaissance de la partition en classes des individus d'une espèce et cherche les combinaisons linéaires des variables décrivant les individus qui conduisent à la meilleure discrimination entre les classes. Parmi les tests adoptés pour ce type d'analyse, le test de sphéricité de Bartlett est construit pour déterminer la dimension de l'espace latent. Ce test vérifie l'hypothèse nulle d'absence de corrélation significative entre les variables. L'analyse utilise aussi le test lambda de Wilk (λ) pour tester la variance des matrices intragroupes (Poulet et al., 2005). Le lambda de Wilk varie entre 0 (pouvoir discriminant maximum) et 1 (pouvoir discriminant nul). Ce rapport est calculé pour chaque variable incluse dans l'analyse. L'application la plus courante de l'AFD est celle qui consiste à inclure de nombreuses variables relevées sur un grand nombre d'individus dans le but de déterminer les variables qui discriminent au mieux les différents groupes. C'est cet aspect qui a été utilisé dans la présente étude pour évaluer la structure de variation morphologique entre les trois espèces de *Brachypodium* et déterminer les variables qui contribuent le plus à leur discrimination.

3-3-3. Classification Hiérarchique Ascendante

L'objectif de la classification hiérarchique ascendante (CHA) est de rassembler des objets dans des classes de plus en plus larges, en utilisant certaines mesures de similarité ou de dissimilarité. Le principe de la CHA consiste à créer une nouvelle partition de l'ensemble des données en agréant les deux éléments les plus proches (basée sur ces similitudes/dissimilitudes) selon une distance choisie à priori pour élaborer à la fin un

dendrogramme basé sur la liaison moyenne entre un ensemble des groupes (Clusters) (UPGMA "unweighed pair-group method using arithmetic averages"). La ressemblance des individus est mesurée par différents indices (similarité, dissimilarité ou distance). Pour des données quantitatives, la distance euclidienne est la plus appropriée.

Méthode de calcul des distances euclidiennes

Soit deux point x et y définie par les vecteurs (x_1, \dots, x_n) et (y_1, \dots, y_n) respectivement. La distance euclidienne entre ces deux points s'écrit alors:

$$D = \sqrt{\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|^2}$$

Dans notre étude, ACH a été utilisée pour rassembler les différentes lignées de *B. hybridum* selon leurs similarités morphologiques.

3-4- Le Test de Mantel

Le test de Mantel (Mantel 1967) est une méthode permettant de comparer la corrélation linéaire entre des matrices d'association (distances, similarités ou connexions). Ce test est communément utilisé en Ecologie pour tester l'hypothèse d'isolement par distance en évaluant la corrélation entre les distances génétiques et les positions géographiques d'espèces ou de populations étudiées. Il permet la détermination d'un coefficient de corrélation (r) qui reflète le degré d'association entre les deux matrices. Dans notre cas, le test de Mantel a été utilisé pour examiner l'effet de distances géographiques et de différences d'altitudes sur la différenciation morphologique entre les populations (estimée par Q_{st}).

4- Analyse de la variabilité moléculaire

4-1- Extraction de l'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée à partir de jeunes feuilles (200 mg) préalablement découpées puis broyées sous azote liquide dans un mortier préalablement refroidi et stockées dans des tubes eppendorf à -80°C jusqu'à utilisation (Geuna et al. 2003 avec quelques modifications). Le protocole adopté est comme suit : 1 ml de tampon d'extraction (20 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 0.5% Sodium Deoxycholate 1 mM EDTA 20% SDS) préalablement chauffé a été ajouté au broyat végétal mis dans un tube Eppendorf de 2 ml. Après une brève agitation manuelle, le mélange a été

placé pendant 30 mn dans un bain-marie à 65°C. Ensuite, 600 µl de chloroforme (isoamyl alcool, 24 :1) ont été ajoutés à l'échantillon puis centrifugé pendant 30 min à une vitesse de 14000 tr/mn. Le surnageant obtenu (La phase liquide) a été transféré à nouveau dans un tube de 2 ml. Afin de précipiter les protéines restantes dans ce surnageant, une solution d'acétate de potassium (5 M, pH 9) a été ajoutée à l'échantillon et le mélange a été incubé entre 15 et 20 minutes dans la glace. Après une centrifugation à 14000 tr/mn à 4°C, la phase liquide a été récupérée une autre fois dans un tube de 2 mL. Des solutions d'acétate de sodium (3M, pH 5.2) et d'isopropanol (2/3 v) ont été ajoutées à l'échantillon et soumis à une agitation légère par rotation. Les mélanges ont été ensuite placés à - 20°C pendant 15 mn puis centrifugés pendant 5 minutes pour la précipitation de l'ADN. Le culot d'ADN a été lavé avec l'éthanol 70%. Après l'élimination de l'éthanol, l'ADN a été suspendu dans 50 µl d'eau stérile et stocké à -20°C jusqu'à usage.

4-2- Quantification d'ADN

L'ADN a été dosé par un spectrophotomètre UV/visible par la mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Le rapport de l'absorbance A260nm/A280nm est utilisé pour estimer la pureté de l'ADN. Le rapport d'absorbance acceptable pour un ADN pur est de 1,7 à 2. La quantité et l'intégrité de l'ADN ont été confirmées par migration sur un gel d'agarose 1% et comparées avec la taille d'un standard (100 pb). Après la quantification, la concentration de l'ADN extrait a été homogénéisée par dilution et ramenée à 30 ng/µl

4-3- Identification des lignées de *Brachypodium* étudiées

En absence des traits morphologiques permettant la différenciation entre les trois espèces du complexe *Brachypodium* : *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*, nous avons adopté une approche moléculaire facile et fiable développée par Giraldo *et al.* (2012) permettant la discrimination entre les trois espèces. Cette approche consiste à amplifier l'ADN génomique par un marqueur microsatellite, nommé ALB165, jugé discriminant entre les 3 espèces. Selon Giraldo *et al.* (2012), l'amplification de l'ADN génomique de ces trois espèces par ALB165 génère trois profils électrophorétiques différents. La révélation sur un gel d'agarose 2% est satisfaisante pour différencier les 3 profils (Figure 17).

- ***B. distachyon* (2n = 10)** : le profil montre une seule bande ayant une taille comprise entre 150 pb et 195 pb.

- *B. stacei* ($2n = 20$) : le profil montre une seule bande ayant une taille comprise entre 137 pb et 139 pb.
- *B. hybridum* ($2n = 30$) : le profil montre 2 bandes.

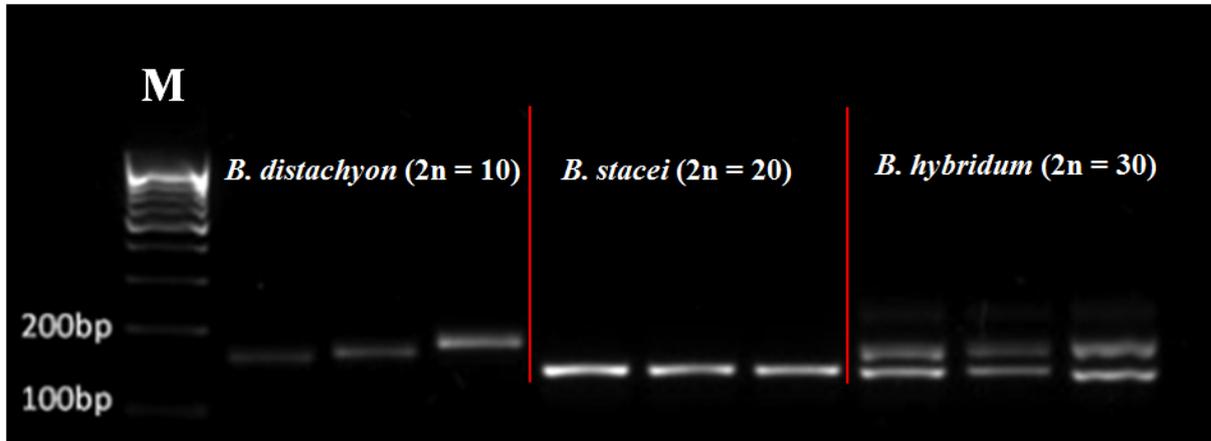


Figure 17: électrophorétiques des produits d'amplification des ADN génomiques de *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* avec le marqueur ALB 165

4-4- Le protocole expérimental adopté pour les analyses microsatellites (SSR)

4-4-1. Choix des amorces utilisées

Les Quinze marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude ont été choisis à partir d'un ensemble de 621 SSR développés par Vogel et al (2009) chez l'espèce modèle *B. distachyon*. Les différents marqueurs microsatellites utilisés (Tableau A, ANNEXE) ont été sélectionnés de telle sorte qu'ils soient polymorphes, montrant un nombre de répétitions variable (entre 5 et 13), présentant diverses unités répétitives (di, tri et tétra-nucléotidique), qu'ils soient dérivés à la fois de EST (Expression-Sequence-Tag) et de BES (BAC end sequences) et surtout dispersés sur tout le génome de *B. distachyon* (sur les 5 chromosomes).

4-4-2. Amplification par PCR

Pour analyser les 15 SSR, nous avons suivi une méthode de marquage développée par Schuelke (2000). Avec cette technique, la réaction PCR inclut trois amorces par locus : l'amorce sens prolongée en 5' par une amorce universelle, la même amorce universelle marquée, et l'amorce anti-sens. Dans notre cas, l'amorce universelle utilisée est le M13 (-21) dont la séquence est "TGTAACAACGACGGCCAGT". Cette amorce supplémentaire peut être marquée par différents fluorochromes selon le besoin et l'objectif des analyses. Les

fluorochromes utilisés dans nos analyses étaient FAM (**Bleu**), NED (**Jaune**), PET (**Rouge**) et VIC (**Vert**).

4-4-3. Description du protocole d'amplification PCR de type « M13 »

La réaction PCR est effectuée en présence d'une molécule d'ADN contenant le motif microsatellite à amplifier, d'une amorce droite R, d'une amorce gauche F couplée à une amorce M13 et d'une amorce M13 couplée à un fluorochrome (F_M13) (Figure 18). Lors du 1^{er} cycle de la réaction, l'amorce droite et l'amorce gauche s'hybrident aux brins de la molécule d'ADN sauf au niveau de la partie M13 qui n'est pas complémentaire et il y a synthèse des brins complémentaires. Lors du 2^{ème} cycle, les mêmes événements se produisent avec en plus synthèse du brin complémentaire à l'amorce M13. L'amplification se déroule lors des 2 premiers cycles comme une PCR classique avec :

(i) Étape de dénaturation : Les deux brins d'ADN à amplifier sont séparés par élévation de la température (environ 95°C) afin d'obtenir des molécules monocaténaïres (un brin).

(ii) Étape d'hybridation : Les deux amorces (F_M13 et R) sont hybridées sur le brin monocaténaire cible par diminution de la température entre 40°C et 65°C.

(iii) Étape d'élongation : Les extrémités 3'-OH des oligonucléotides servent de points de départ à l'ADN polymérase thermostable qui synthétise les brins complémentaires.

Lors du 3^{ème} cycle, l'amorce M13 couplée au fluorochrome peut venir se fixer sur sa région complémentaire pour initier la synthèse d'ADN, la molécule d'ADN synthétisée est ainsi marquée par un fluorochrome. Elle pourra être visualisée par électrophorèse capillaire.

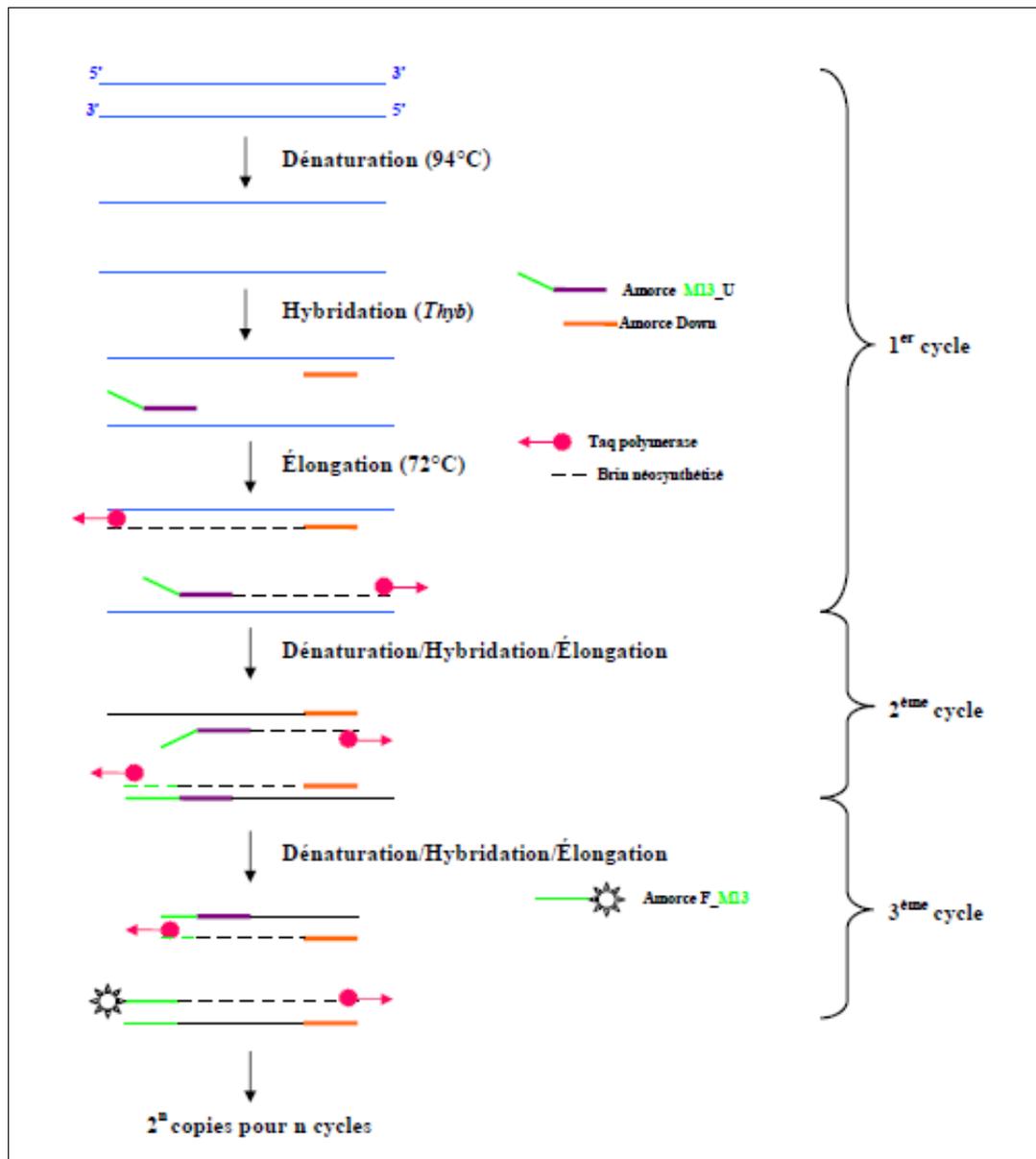


Figure 18: Étapes d'amplification PCR avec l'amorce fluorescente M13 (M13).

4-4-4. Protocole d'amplification systématique avec la méthode M13

Les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées dans une microplaque à 96 puits. Le volume final de 20 μ L était composé de 2 μ L tampon PCR 10X (Invitrogen), 0.5 μ L de dNTP (200 μ M), 0.8 μ L MgCl₂ (50 mM), 0.2 μ L d'amorce F allongé (M13_F) (10 μ M) (PET, VIC, NED ou FAM), 0.5 μ L d'amorce R (10 μ M), 0.15 μ M d'amorce M13 marqué par Fluorescence (F_M13), 20-30 ng d'ADN génomique et 0.5 U d'ADN Polymérase (Invitrogen). L'eau pure a été utilisée pour atteindre le volume réactionnel fixé à 20 μ L. La microplaque a été placée dans un thermocycleur PT-100 (Germany), programmé comme suit :

4 min de dénaturation initiale à 94°C puis 35 cycles avec 30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à la température optimale ($T_m = 54^\circ\text{C}$) et 30 s d'élongation à 72°C, enfin 10 min de synthèse finale à 72°C. Le protocole adopté dans notre analyse est identique à celui utilisé par Vogel et al (2009). Un contrôle sur gel d'agarose à 2 % des produits de PCR a été réalisé afin de vérifier la qualité de l'amplification. Ensuite, toutes les plaques préparées ont été conservées dans un congélateur (-20°C) à l'abri de la lumière à l'aide d'une feuille d'aluminium pour éviter la dégradation des fluorochromes.

4-4-5. Génotypage par microsatellites

Les produits de PCR obtenus ont été multiplexés en deux groupes de marqueurs (A et B) (Figure) afin de maximiser l'analyse simultanée et réduire les coûts de génotypage tout en évitant lors de l'électrophorèse le chevauchement entre les pics générés (les résultats de génotypage) par les marqueurs de même groupe et analysés par un séquenceur ABI 3730 à 64 capillaires (Applied Biosystems). Cette méthode permet d'étudier plusieurs microsatellites de même taille mais portant des fluorochromes différents, au même moment, en multiplexant les produits d'amplification PCR dans un même puit (Figure 19). Pour cela, 5 μL de chacun des produits d'amplification ont été mélangés et complétés avec de l'eau milli Q autoclavée pour obtenir un volume final de 50 μL . Par la suite, un volume de 2 μL a été prélevé de ce mélange, pour être ajouté à 9,850 μL de formamide et 0,175 μL de marqueur de taille (GENESCAN 400HD [LIZ 500] d'Applied Biosystems). Les échantillons ont été ensuite dénaturés, 5 min à 95°C, avant d'être placés dans le séquenceur. Lors de la migration des produits PCR dans les capillaires du séquenceur, les fluorophores sont excités par un laser et l'émission de fluorescence est interprétée par le logiciel Genotyper 3.7 NT (Applied Biosystems). Le standard de taille permet d'attribuer une taille aux différents pics d'intensité.

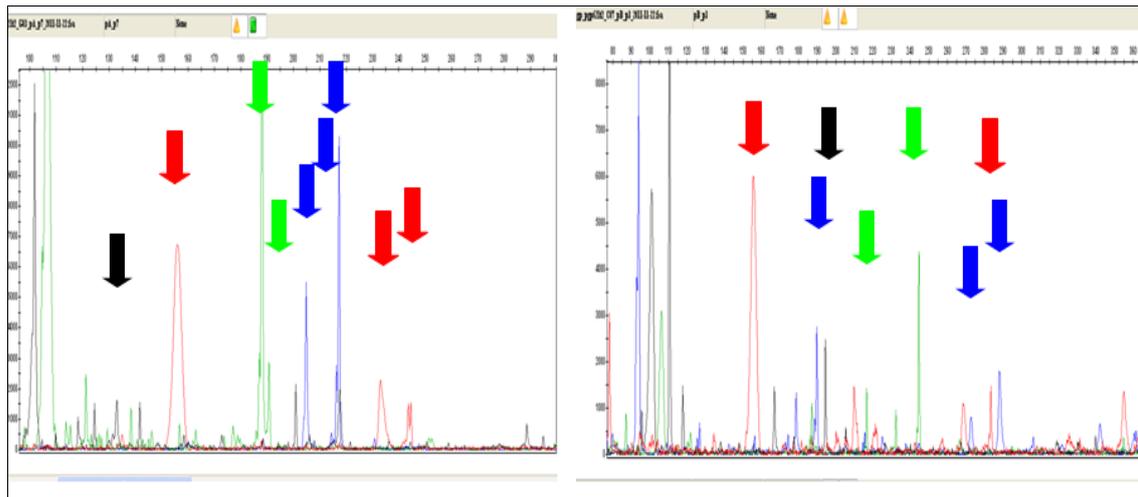


Figure 19: (De gauche à droite) (1) électrophorèse de la poule A pour un échantillon, les flèches indiquent les signaux détectés de marqueurs microsatellites de la première poule: ALB008, ALB30, ALB034 ALB040 ALB056 ALB086 ALB087 ALB089 and ALB158 (2) électrophorèse de la poule B pour un échantillon, les flèches indiquent les signaux détectés de marqueurs microsatellites de la deuxième poule: ALB131, ALB139, ALB100, ALB230, ALB256, ALB257, ALB372, ALB445.

4-5- Le protocole expérimental adopté pour les analyses des InDels

4-5-1. Choix des amorces InDels

A partir d'un ensemble de 287 InDels développées pour l'espèce modèle *B. distachyon* fourni par Dr. Sean Gordon et Prof. Jean Vogel (USDA, Californie, Albany, Etats-Unis), nous avons choisi 24 amorces pour analyser la variabilité génétique des populations naturelles tunisiennes de *Brachypodium hybridum*. Ces 287 amorces n'ont jamais été testées. Pour cette raison, les 24 amorces ont été choisies de telle sorte qu'elles soient dispersées sur la totalité du génome de *B. distachyon*.

4-5-2. Optimisation de protocole d'amplification par PCR des InDels

En utilisant 2 échantillons d'ADN de chaque population (18 au total), les procédés de génotypage par les InDels ont été optimisés en faisant varier 3 paramètres :

- la concentration de l'ADN génomique
- la concentration de $MgCl_2$
- la température d'hybridation

L'ADN de la lignée diploïde Bd21 de l'espèce *B. distachyon* dont le génome est séquencé a été utilisé comme témoin positif lors de la mise au point du protocole

d'amplification des InDels. Après optimisation et selon l'efficacité d'amplification et le taux de reproductibilité, 8 amorces de type InDels ont été retenues pour analyser la diversité des 145 lignées de *B. hybridum*. Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées au cours de ce travail sont données dans le tableau B (ANNEXE). Les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées dans une microplaque à 96 puits avec un volume final de 20 µL. Le milieu réactionnel était composé de 2 µL tampon PCR 10X (Invitrogen), 0.5 µL de dNTP (10 mM), 0.8 µL MgCl₂ (50 mM), 2 µL Amorce F (10 mM), 2 µL Amorce R (10 mM), 3 µL ADN génomique (30 ng/ µL), 0.2 µL (5U/ µL) et 8 µL H₂O stérile. Les réactions PCR ont été réalisées par un thermocycleur PT-100, programmé comme suit : 4 min de dénaturation initiale à 94°C puis de 35 cycles avec 30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à la température optimale (T_m= 57 °C) et 30 s d'élongation à 72°C, enfin 10 min de synthèse finale à 72°C.

4-5-3. Analyse des résultats de génotypage par InDels

Les produits d'amplification des InDels ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 3% (p/v) préparé dans le TBE 0.5X (Tris-base 45 mM ; acide borique 45 mM ; EDTA 1 mM) et visualisé en utilisant 5 µL d'une solution de bromure d'éthidium bromide (BrEt) (0,5 µg/ml). Le produit issu de la PCR est additionné d'un volume v/10 de tampon de charge (glycerol 30% ; bleu de bromophénol 0,25% ; xylène cyanol 0,25%). Ce tampon de charge permet le maintien du dépôt en immersion et la visualisation de la migration. La taille des fragments obtenus sur gel est déterminée par comparaison de leur distance de migration avec celui d'un marqueur de taille 100 bp. L'électrophorèse est effectuée dans une cuve horizontale de 20 cm x 16 cm (Modèle Biorad) pendant 2 heures sous une tension de 100 V dans un tampon TBE 0.5X. Les gels obtenus après migration électrophorétique ont été visualisés et photographiés sous lumière UV à l'aide d'un système de documentation et numérisés sous une haute résolution.

Pour confirmer les résultats de génotypage obtenus par l'électrophorèse sur gel d'agarose, quelques InDels ont été analysés par HRM (fusion à haute tension – High resolution melting) à l'aide d'un PCR en temps réel (RT PCR).

5- Méthodes d'analyses statistiques

Les résultats obtenus par microsatellites ou InDels ont été analysés par diverses approches statistiques. Ces approches visent l'évaluation de la diversité génétique et la structure génétique des populations étudiées.

Les données de génotypage pour chacune des lignées étudiées ont été présentées sous forme matricielle avec, en colonne, les marqueurs et en ligne, les individus. Chaque marqueur est représenté par deux formes alléliques possédant une taille propre en paire de bases (pb). L'ensemble de ces données obtenues a été examiné par des divers programmes bioinformatiques afin d'analyser la diversité et la structure génétique au sein de complexe des *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* puis au sein et entre les populations de l'espèce la plus répandue *B. hybridum*.

5-1- Analyse de la diversité génétique

La variabilité génétique a été décrite par un ensemble d'indices: Le taux de polymorphisme (P), les nombres moyens d'allèles par locus (N_a et N_e), la richesse allélique (A_r), l'indice de fixation (F_{is}), l'hétérozygotie moyenne observée (H_o) et l'hétérozygotie moyenne attendue ou l'indice de diversité génique (H_e). Ces paramètres ont été calculés par les programmes GenAlEx v.5.6 (Peakall et Smouse, 2006) et GENETIX (Belkhir, 2004).

6- Analyse de la structure génétique

6-1- L'Analyse Moléculaire de la Variance (AMOVA)

L'analyse de variance moléculaire (AMOVA) (Excoffier et al., 1992 ; Schneider et al. 2000) permet de mesurer la différenciation génétique existant à plusieurs niveaux d'hierarchie. Elle utilise le fait qu'une somme de déviations au carré entre les observations individuelles et leur moyenne est égale à une double somme de différences au carré (distances) entre les paires d'observations plus une constante. Ainsi, l'analyse de la variance moléculaire est réalisée à partir d'une matrice de distance au carré entre toutes les paires d'observations. Grâce au Φ statistiques (analogues des F statistiques), AMOVA permet d'estimer les proportions de la variabilité génétique chez une espèce donnée qui sont dus : aux variations entre les populations (Φ_{PT}), aux variations entre populations au sein des groupes

(Φ_{PR}), aux variations entre les groupes des populations (Φ_{RT}) et aux variations entre individus au sein des populations.

Φ_{PT} , Φ_{PR} et Φ_{RT} peuvent être calculés à comme suit

- $\Phi_{PT} = (AP + AR) / (WP + AP + AR) = (AP + AR) / TOT$
- $\Phi_{RT} = AR / (WP + AP + AR) = AR / TOT$
- $\Phi_{PR} = \Phi_{PT} + \Phi_{RT}$

Où

AR = Variance entre les groupes

AP = Variance entre les populations

WP = Variance entre individus au sein des populations

Dans notre analyse, l'hypothèse nulle du test spécifie que les individus appartiennent à une même population génétique (donc non structurée) et la significativité des hypothèses alternatives a été testée pour toutes les valeurs par 10000 permutations (valeur de $p < 0,005$).

6-2- Le Flux génique

Le flux génique (Nm) correspond à l'échange de gènes ou de leurs allèles entre différentes populations apparentées en raison de la migration d'individus fertiles ou de leurs gamètes. Les flux géniques peuvent lieu au sein d'une même espèce aussi bien qu'entre les espèces.

Dans notre étude, nous avons utilisé le logiciel *Genepop* pour estimer le flux génique entre les populations tunisiennes de *Brachypodium hybridm* à l'aide d'une méthode basée sur la fréquence moyenne des allèles privés développée par Slatkin en 1985. Selon cet auteur, le flux génique entre sous populations, dans un modèle fragmenté en îlots, peut être estimé à l'aide du paramètre Nm , où (N) représente l'effectif de la population et (m) le taux d'immigrants. Nm a été calculé à partir de l'équation suivante :

$$\ln(p) = a \ln(Nm) + b$$

Où

p : la fréquence moyenne des allèles privés présents dans l'une des sous populations

a et **b** sont des constantes

Slatkin a montré que, pour des fréquences comprises entre 0.001 et 1, les valeurs $a = 0.504$ et $b = - 2.44$ donnent une estimation satisfaisante de N_m . Cet indice est corrigé en fonction de l'effectif moyen (n) analysé dans chaque sous population ($N_m' = 25 N_m/n$).

6-3- Distances génétiques

La distance génétique est utilisée pour quantifier le degré de divergence génétique entre les populations tunisiennes de *B. hybridum* prises deux à deux. Plusieurs indices permettent de mesurer les distances génétiques. Dans cette étude, l'indice de distance génétique de **Nei (1978)** a été utilisé pour estimer le degré de divergence génétique car il est plus adapté aux unités taxonomiques de faible taille.

6-4- Analyse en coordonnées principales (ACoP)

L'analyse en coordonnées principales (ACoP) est une technique multivariée qui permet de trouver et tracer les grandes tendances au sein d'un ensemble de données multidimensionnelles (par exemple, loci multiples et plusieurs échantillons). Elle permet d'étudier la variabilité génétique spatiale en utilisant les fréquences alléliques sur les individus ou les populations, sans forcément répondre au critère d'équilibre de Hardy-Weinberg (Jombart *et al.* 2008). Le principe de l'ACoP est identique à celui de l'analyse en composantes principales décrite précédemment. ACoP est réalisée à l'aide de GenALEX v6 (Peakall et Smouse, 2006).

6-5- Classification hiérarchique ascendante (CHA)

Les matrices des distances génétiques de Nei et les coefficients de différenciation génétiques (Φ_{PT}) par paire de populations ont été transformées au format correspondant au logiciel MEGA v 5.2 (Tamura *et al.* 2007) pour effectuer une classification hiérarchique ascendante sous forme d'un dendrogramme basé sur l'algorithme UPGMA.

6-6- Analyse factorielle des correspondances (AFC)

Cette analyse consiste à projeter les distances génétiques entre individus sur un jeu d'axes qui maximisent les différences entre populations. Elle a été effectuée à l'aide du logiciel GENETIX v4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004). Comme toutes les méthodes d'ordination (ACP, ACoP), sa finalité est d'estimer les axes qui maximisent l'inertie projetée pour obtenir

une représentation simultanée des lignes et des variables dans l'espace de dimensions réduites. A la différence de l'ACP, l'analyse des correspondances multiples (AFC) est basée sur une métrique du Khi-2. Elle considère les lignes et les colonnes de la matrice de façon symétrique, ce qui entraîne une dualité entre l'espace des colonnes et l'espace des lignes. L'autre raison qui peut favoriser l'utilisation l'AFC, c'est que cette dernière prend trop en compte les allèles rares alors que l'ACP n'en tient pas assez compte (Kroonenberg and Lombardo 1999 ; Gimaret-Carpentier et al. (1998).

6-7- Les tests de Mantel (simple et partiel)

Le test de Mantel simple (Mantel, 1967) a été utilisé pour examiner l'hypothèse d'isolement par distance et l'isolement par altitude en comparant la matrice des distances génétiques avec les matrices de distances géographiques et de différences d'altitude. Le test de Mantel partiel (Smouse *et al.* 1986) a été utilisé pour évaluer l'effet combiné des distances géographiques et des différences d'altitude sur la structure génétique spatiale des populations tunisiennes de *B. hybridum*. Les deux tests ont été réalisés au moyen de ZT software.

6-7-1. Analyse Bayésienne

En plus des approches classiques décrites précédemment, nous avons examiné la structure génétique spatiale des populations tunisiennes de *B. hybridum* par une analyse bayésienne à l'aide du logiciel STRUCTURE 2.3.3 développé par Pritchard *et al.*, (2000). Cette approche consiste à supposer que les données génétiques peuvent être expliquées par un modèle probabiliste dont les paramètres sont inconnus. En effet, le modèle de STRUCTURE suppose qu'un ensemble d'individus d'origine inconnue appartiennent à un nombre non prédéfini (K) de populations, et chacune d'elles est caractérisée pour chaque locus par un ensemble de fréquences alléliques et supposée à l'équilibre de Hardy-Weinberg (modèle complexe d'admixture avec corrélation des fréquences alléliques). L'objectif de ce modèle hiérarchique bayésien est de chercher à créer les K populations afin de minimiser l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg au sein de chacune d'elles et d'estimer conjointement les fréquences alléliques et les coefficients d'appartenance ou de métissage des individus (Q) à chacune de ces populations en fonction de leur composition génétique. Pour cela l'algorithme estime la distribution conjointe de ces variables (et des variables cachées) à l'aide de la méthode de Monte Carlo par chaîne de Markov (*Markov chain Monte Carlo*, MCMC).

Le principe de cette approche est de réaliser plusieurs simulations en fixant à chaque fois le nombre de classe K . Le critère de choix de ce modèle, pour déterminer la meilleure valeur de K , est l'estimation de la probabilité postérieure des données, notée $\Pr(X|K)$ (Pritchard et al., 2000). Cette valeur, appelée "Ln P(D)" dans STRUCTURE 2.3.3 est obtenue en calculant, à chaque étape du MCMC, le logarithme de la vraisemblance du jeu de données. A la fin de la simulation et afin d'obtenir le critère de choix : Ln P(D), la moyenne de ces valeurs est déterminée et la moitié de la variance est soustraite. Le nombre réel de classes est généralement identifié comme celui produisant la valeur de Ln P(D) maximale. Toutefois, Evanno et al. (2005) ont montré que le nombre de classes inféré par cette méthode était souvent surestimé. Leurs simulations ont en particulier révélé que, lorsque la valeur de K réelle est atteinte, Ln P(D) (appelé par ces auteurs $L(K)$) ne représente pas toujours un maxima évident. Les valeurs de $L(K)$ obtenues pour des K élevés, continuent de croître légèrement pour former un plateau, et les variances entre les simulations augmentent. C'est pourquoi Evanno et al. (2005) ont proposé d'utiliser un autre indice qui montre un pic clair à la réelle valeur de K : le taux de variation de second ordre de $L(K)$ nommé ΔK . La valeur de K retenue sera donc celle pour laquelle ΔK est maximal.

Dans notre travail, l'approche bayésienne a été utilisée pour analyser la structure génétique au sein du complexe d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* et pour analyser la structure génétique des populations de *B. hybridum*. Les paramètres de simulation utilisés sont les suivants : 10 simulations à une « phase d'allumage » (Burn-in period) de 100000 chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC) et une phase stationnaire de 200000 MCMC.

La valeur de K la plus probable a été estimée en suivant l'évolution de la variation de la probabilité logarithmique des données [Ln P(D)] puis vérifiée par la quantité ad hoc (ΔK) en fonction de nombres des K inférées à l'aide de l'application en ligne STRUCTURE HARVESTER (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Après la détermination de la valeur de K , les résultats de groupement des tous individus visualisé sur un graphique 'Bar plot' à K couleurs montrant les coefficients d'appartenance ou de métissage d'individu (Q) à chacune des populations.

CHAPITRE I

**Identification et diversité génétique du complexe
d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* en Tunisie**

I- Introduction

Les *Poacées* fourragères et les céréales tempérées présentent un intérêt économique et agronomique majeur. Des nombreuses espèces telles que le riz (genre *Oryza*), le maïs (genre *Zea*), le sorgho (genre *Sorghum*), l'avoine (genre *Avena*), le seigle (genre *Secale*), l'orge (genre *Hordeum*) et le blé (genres *Triticum* et *Aegilops*) ont été domestiquées et elles constituent aujourd'hui la base de l'alimentation humaine et animale. Le genre *Brachypodium* (*Brachypodieae*, *Poaceae*), constitue un réservoir d'environ 26 espèces à grand potentiel mais très peu étudiées. Le genre *Brachypodium* est bien décrit d'un point de vue botanique avec cependant plusieurs classifications qui pour certaines espèces laissent des ambiguïtés sur les niveaux taxonomiques. Son aire de répartition naturelle est le bassin méditerranéen, l'Asie d'ouest, le Moyen-Orient et l'Afrique du nord. Il a récemment colonisé et été naturalisé en Australie, en Amérique et en Afrique du Sud (Schippmann 1991; Catalán 2003; Stace 2010). Le genre *Brachypodium* présente un intérêt particulier grâce à ses multiples rôles ; économiques et écologiques. En effet, en raison de sa grande production de biomasse (4 à 193 grains/ plante ; 15 à 77 g de matière sèche/plante) (Filiz et al. 2009), des perspectives ont été ouvertes pour l'exploitation du genre *Brachypodium* dans la production de fourrage de bonne qualité, dans l'alimentation humaine et aussi la production des biocarburants. De point de vue écologique, les espèces de *Brachypodium* peuvent contribuer à la réhabilitation des sols dégradés et la lutte contre les différents types d'érosions. De ce fait, le principal objectif de ce chapitre est de caractériser morphologiquement et génétiquement le complexe d'espèces *Brachypodium distachyon*, *Brachypodium stacei* et *Brachypodium hybridum* en Tunisie.

II- Matériel et méthodes

En raison de la forte ressemblance morphologique entre les trois espèces, nous avons commencé par collecter aléatoirement 180 lignées de *Brachypodium spp* à partir de 9 sites représentatifs des tous les étages bioclimatiques en Tunisie. Nous avons, en premier lieu, utilisé une approche moléculaire pour différencier entre les trois espèces. Ensuite, nous avons utilisé 18 traits morfo-phenologiques et 15 microsattellites pour caractériser la variabilité phénotypique et génétique de ce complexe d'espèces.

III- Resultats

1- Identification des lignées de *Brachypodium spp* étudiées

Les ADN de 180 lignées de *Brachypodium spp* ont été amplifiés par PCR avec le microsatellite ALB 165 (Figure 20). En effet, selon Giraldo et al. (2012) ce marqueur représente un marqueur puissant dans la discrimination des 3 espèces du complexe *Brachypodium* (*B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*). En bref, la révélation des produits d'amplification de l'ADN génomique de toutes les lignées sur un gel d'agarose 2 % (Figure) a montré que :

- 18 lignées présentant une seule bande avec une taille comprise entre 137 pb et 139 pb (*B. stacei* (2n= 20)).
- 17 lignées présentant une seule bande avec une taille comprise 150 pb et 195 pb (*B. distachyon* (2n= 10)).
- 145 lignées présentant 2 bandes (*B. hybridum* (2n= 30)).

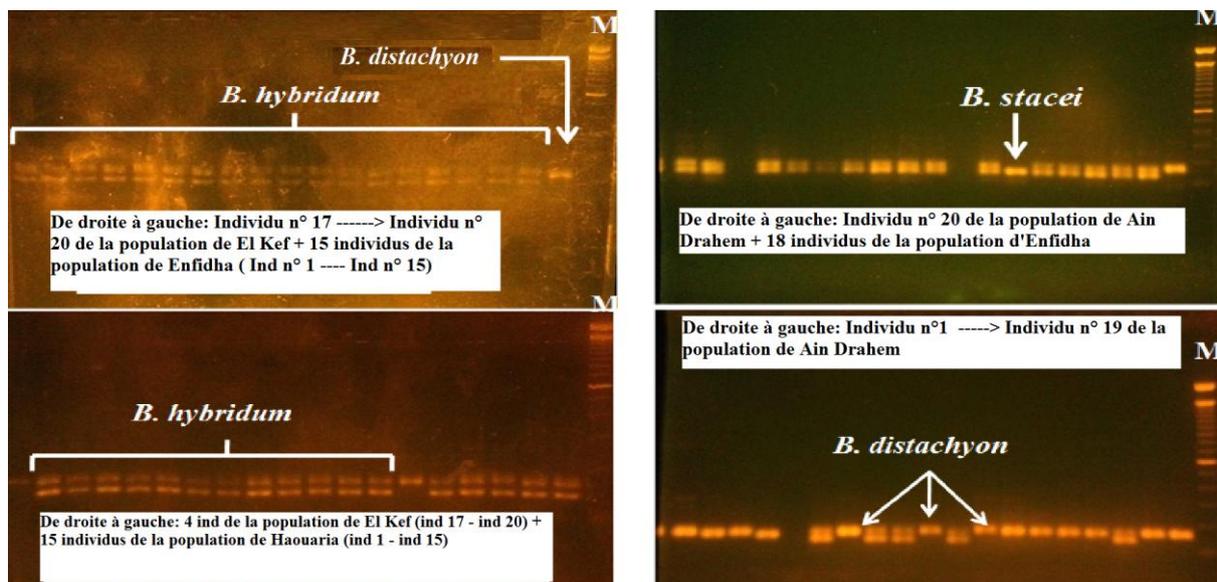


Figure 20: Résultats d'amplification de quelques lignées tunisiennes de *Brachypodium spp* avec le marqueur ALB 165 sur gel d'agarose 2%.

Les résultats suggèrent que, parmi les 180 lignées, 145 lignées (81%) sont allotétraploïdes ($2n = 2(5 + 10) = 30$) (*B. hybridum*), et seulement 35 lignées sont diploïdes (19 %) dont 18 (10 %) sont de l'espèce *B. distachyon* ($2n = 10$) et 17 (9 %) sont de l'espèce *B. stacei* ($2n = 20$). Ceci montre que *B. hybridum* est l'espèce la plus répandue en Tunisie tandis que les deux espèces diploïdes sont de moindre fréquence. Dans certains sites tels que Haouaria, Douar el Hej wniss et Raouad, les lignées étaient exclusivement allotetraploïdes.

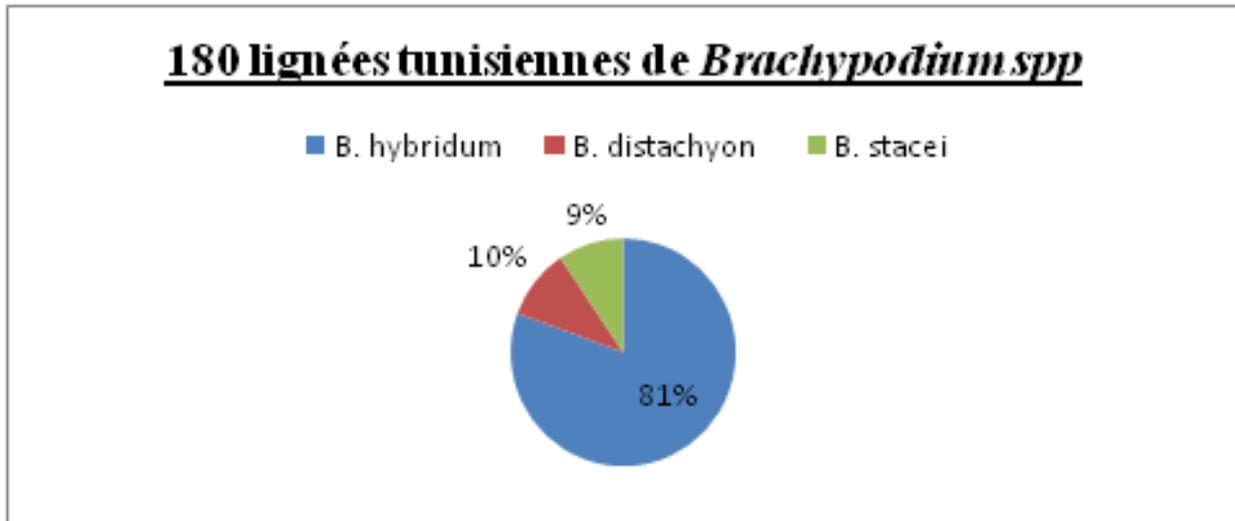


Figure 21: proportion des trois espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* en Tunisie.

Contrairement au *B. hybridum*, qui est représentée dans tous les sites prospectés, les deux espèces diploïdes ont été trouvées préférentiellement dans des sites bien déterminés. En effet, parmi les 18 lignées de *B. distachyon* ($2n = 10$), 16 lignées sont originaires de Ain Drahem tandis que les 2 autres lignées sont originaires d'El kef. En ce qui concerne l'autre espèce diploïde, *B. stacei* ($2n = 20$), la majorité des lignées ont été collectées de Fayedh (11 lignées) et Zaghouan (5 lignées), les deux autres lignées sont originaires d'Enfidha et Sejnen. Il est à noter qu'aucune sympatrie n'a été observée ni entre les deux espèces diploïdes ni entre les trois espèces dans toutes les populations étudiées. Les seuls cas de sympatrie observées étaient entre *B. stacei* et *B. hybridum* dans les populations Fayedh et Zaghouan et dans les populations Enfidha et Sejnen et entre *B. distachyon* et *B. hybridum* dans la population de Ain Drahem (Tableau 7).

Tableau 7: Le nombre des individus de *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* dans les 9 populations étudiées

Location	<i>B. distachyon</i>	<i>B. stacei</i>	<i>B. hybridum</i>
Fayedh	0	12	8
Enfidha	0	1	19
Jbel Zaghouan	0	5	15
Hawaria	0	0	20
Raouad	0	0	20
Sejnen	0	1	19
Ain Drahem	15	0	5
El Kef	2	0	18
Douar El Hej Wniss	0	0	20

2- Caractérisation de la variabilité morphologique du complexe *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*

2-1-Analyse de la variance

L'analyse de variance a montré des effets hautement significatifs ($p < 0,0001$) pour la plupart des caractères étudiés (Tableau 8). Toutefois, les variations observées se sont révélées plus importantes à l'échelle intra-spécifique qu'à l'échelle interspécifique. Ces variations ne sont pas uniformes pour l'ensemble des traits analysés ni entre les lignées de la même espèce ni entre les espèces. D'une façon générale, les traits liés au développement phénologique des plantes sont nettement plus variables que ceux liés au développement morphologique chez les trois espèces. Cependant la variabilité étudiée dans cette partie doit être prise avec précaution vu le nombre faible des lignées représentatives des deux espèces diploïdes *B. distachyon* et *B. stacei*.

L'espèce tétraploïde *B. hybridum* s'est avérée plus variable que les deux espèces diploïdes *B. distachyon* et *B. stacei*. En effet, la majorité des traits analysés chez cette espèce ont montré des coefficients de variations supérieurs à 30%. Les niveaux de variations les plus importants ont été enregistrés avec la longueur moyenne des feuilles (ALL), la distance moyenne d'entre nœuds (AID) et la longueur moyenne d'inflorescence ALI (CV > 0.6) tandis que les niveaux de variations les plus faibles ont été observés pour les traits liés à la précocité (date de l'émergence de la deuxième feuille et la date de maturation), la longueur de la plante (LGT), le nombre des feuilles par thalle (NLT) et le nombre des épillets par épi (ANSS) (CV < 20%).

Au sein des deux espèces diploïdes *B. distachyon* et *B. stacei*, la variation morphologique entre les lignées est avérée faible pour la majorité des traits (CV < 0.3). Chez *B. distachyon*, seuls les traits la masse des épillets (MS), la longueur moyenne des épillets (ALS) et la longueur moyenne entre les épillets (ADBS) ont montré un CV > 30% (36.2%, 34.1% et 67%, respectivement). Ces trois traits sont relatifs à l'appareil reproducteur de la plante. Au sein de l'espèce *B. stacei*, les coefficients des variations les plus élevés ont été enregistrés pour ADBS (CV = 31.7%), LST (CV = 32.3%), AID (CV = 35.7%) et MAP (CV = 37.8).

Lorsque les trois espèces sont analysées ensemble, les niveaux de variations les plus remarquables ont été observés pour les traits AID, ALS et ALI (CV > 60%) avec une moyenne de variation de 0,35 pour tous les traits. Les graphiques de Box et whisker (Figure) montrent un chevauchement important dans la marge de variation pour la majorité des traits entre les trois espèces et confirment qu'elles sont très similaires morphologiquement. Ceci laisse prédire que la discrimination entre eux sur la base de l'ensemble des traits analysés est très difficile.

2-2-Analyse factorielle discriminante

L'analyse factorielle discriminante (AFD) a été utilisée pour évaluer le niveau de différenciation morphologique entre les trois espèces ainsi que la capacité discriminante de chacun des traits analysés. Sur la base de l'ensemble des caractères analysés, l'AFD a montré que la totalité de la variation est expliquée par les deux premiers facteurs (72,7% et 27,3%, respectivement). Le premier facteur a été principalement expliqué par les trois traits liés à la

longueur de la plante (LGT, HNL et ALT), la longueur moyenne de l'inflorescence (ALI) et la date épiaison (HD), tandis que le deuxième facteur est expliqué principalement par la masse des épillets (MS).

La Projection des 180 lignées dans l'espace formé par les deux premiers axes de l'Analyse Factorielle Discriminante a montré la présence des trois groupes. Les lignées de *B. distachyon* se regroupent ensemble dans la partie négative du premier axe de l'AFD, celles de *B. stacei* sont agrégées dans la partie positive alors que les lignées tétraploïdes (*B. hybridum*) forment un 3^{ème} groupe qui se chevauche avec les deux premiers groupes (Figure 22).

Le pouvoir discriminant de chacun des traits analysés a été estimé à l'aide de l'indice de lambda de Wilks. Globalement, les statistiques de Wilks suggèrent que la discrimination entre les trois espèces avec les 18 traits analysés est très difficile, ce qui en concordance avec les résultats par les graphiques de Box et whisker (Figure 23). En effet, tous les traits ont montré des indices de lambda de Wilks relativement élevées et très proches de 1. Les pouvoirs discriminants les plus importants peuvent être attribués aux LST, ALT, HD et ALI ($\lambda = 0.75$, $\lambda = 0.76$, $\lambda = 0.6$ et $\lambda = 0.67$, respectivement).

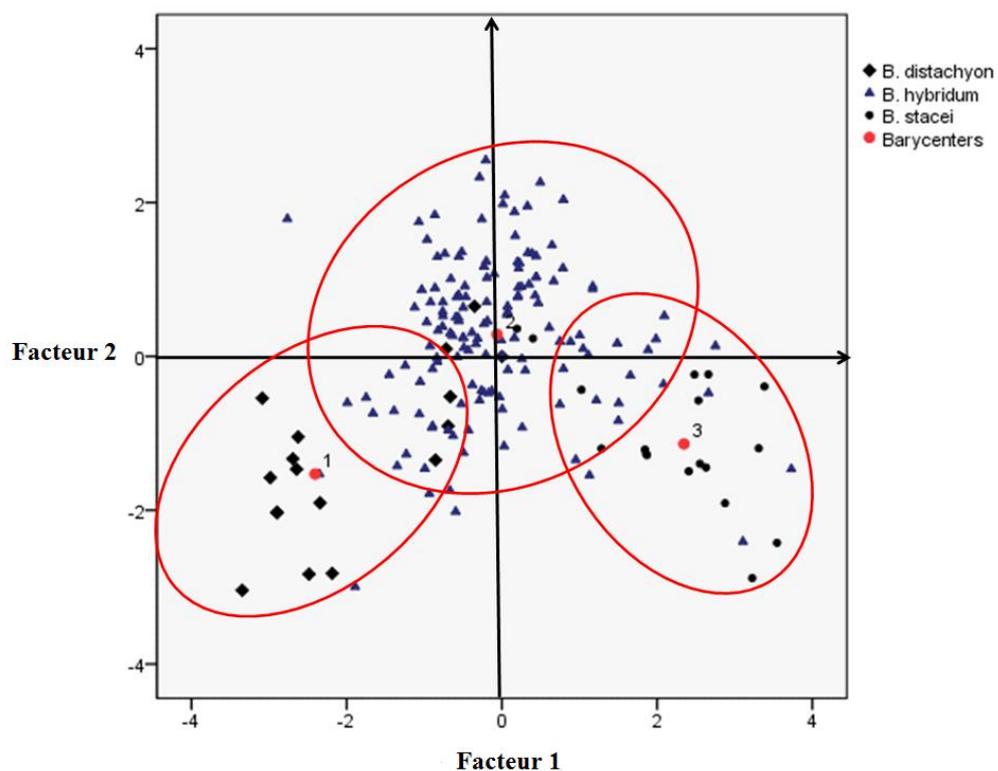


Figure 22: Projection des 180 lignées de *Brachypodium* dans l'espace formée par les deux axes de l'analyse discriminante

Tableau 8: Les moyennes, écarts types, coefficients de la variation et le niveau de significativité des 18 traits morphologiques analysés.

	<i>B. distachyon</i>				<i>B. stacei</i>				<i>B. hybridum</i>			
	Moyenne	ET	CV	P > F	Moyenne	ET	CV	P > F	Moyenne	ET	CV	P > F
D2L	24,327	2,824	0,116	< 0,0001	21,000	2,596	0,124	0,007	22,709	3,124	0,138	0,204
NT	35,510	8,678	0,244	< 0,0001	27,123	7,006	0,258	< 0,0001	26,081	9,810	0,376	< 0,0001
LGT	70,010	9,029	0,129	< 0,0001	94,675	16,409	0,173	< 0,0001	81,947	14,459	0,176	< 0,0001
LST	21,239	6,176	0,291	< 0,0001	48,096	15,511	0,323	< 0,0001	31,468	11,322	0,360	< 0,0001
ALT	34,929	6,336	0,181	< 0,0001	61,351	11,875	0,194	< 0,0001	47,051	11,635	0,247	< 0,0001
ALL	5,501	0,771	0,140	0,043	10,368	2,070	0,200	< 0,0001	8,498	6,013	0,708	0,007
ANNT	7,367	0,825	0,112	< 0,0001	6,719	1,673	0,249	< 0,0001	7,899	1,851	0,234	0,064
AID	5,224	1,344	0,257	0,201	10,356	3,699	0,357	< 0,0001	7,349	4,984	0,678	< 0,0001
NLT	8,857	0,728	0,082	< 0,0001	7,684	1,698	0,221	< 0,0001	8,394	1,438	0,171	0,000
RL	18,327	3,786	0,207	< 0,0001	20,667	4,490	0,217	< 0,0001	21,368	4,362	0,204	0,008
MAP	12,907	3,106	0,241	< 0,0001	14,041	5,310	0,378	< 0,0001	15,195	5,008	0,330	< 0,0001
MS	6,513	2,360	0,362	< 0,0001	7,355	1,059	0,144	0,000	8,649	1,626	0,188	< 0,0001
ALS	1,711	0,583	0,341	< 0,0001	3,289	0,787	0,239	< 0,0001	2,810	2,687	0,956	< 0,0001
ADBS	0,651	0,437	0,670	< 0,0001	1,519	0,482	0,317	0,000	1,232	0,470	0,381	< 0,0001
ANSS	8,838	1,748	0,198	< 0,0001	13,444	2,043	0,152	0,000	11,581	2,048	0,177	< 0,0001
DH	90,865	9,367	0,103	< 0,0001	60,667	8,133	0,134	< 0,0001	75,538	10,744	0,142	< 0,0001
ALI	6,546	1,031	0,157	0,010	10,072	1,764	0,175	0,330	8,060	3,297	0,409	< 0,0001
ANSSP	5,892	0,649	0,110	< 0,0001	5,472	0,860	0,157	< 0,0001	5,876	1,074	0,183	< 0,0001

2-1- Analyse en composante principale (ACP)

Pour mieux comprendre la structure de la variation phénotypique des trois espèces, les 18 caractères phéno-morphologiques ont été soumis à une Analyse en Composante Principale. Les trois premières composantes expliquent respectivement 24.96%, 13.95% et 10.51% de la variation totale avec une variation cumulative de 49.43%. La première composante principale est expliquée principalement par la longueur du plus grand et du plus petit thalle (LGT, LST), la longueur moyenne de tous les thalles (ALT), le nombre moyen des épillets par épi (ANSS) et la date de l'épiaison (DH). La deuxième composante principale est déterminée majoritairement par la longueur moyenne des feuilles (ALL), le nombre moyen des nœuds par thalle (ANNT) et le nombre moyen des épillets par épi (ANSI). La troisième composante qui absorbe moins de variation que les deux premières (10.52%) est déterminée principalement par un caractère végétatif lié à la précocité (date d'apparition de la deuxième feuille (D2L)) et un caractère reproductif lié à la production de biomasse (la masse d'épis (MS)). Le regroupement des 180 lignées étudiées sur le plan formé par les deux premières composantes principales rappelle celui obtenu par l'Analyse Factorielle Discriminante (Figure 24). Un tel groupement suggère un niveau de variation morphologique interspécifique relativement élevée par rapport à celui interspécifique.

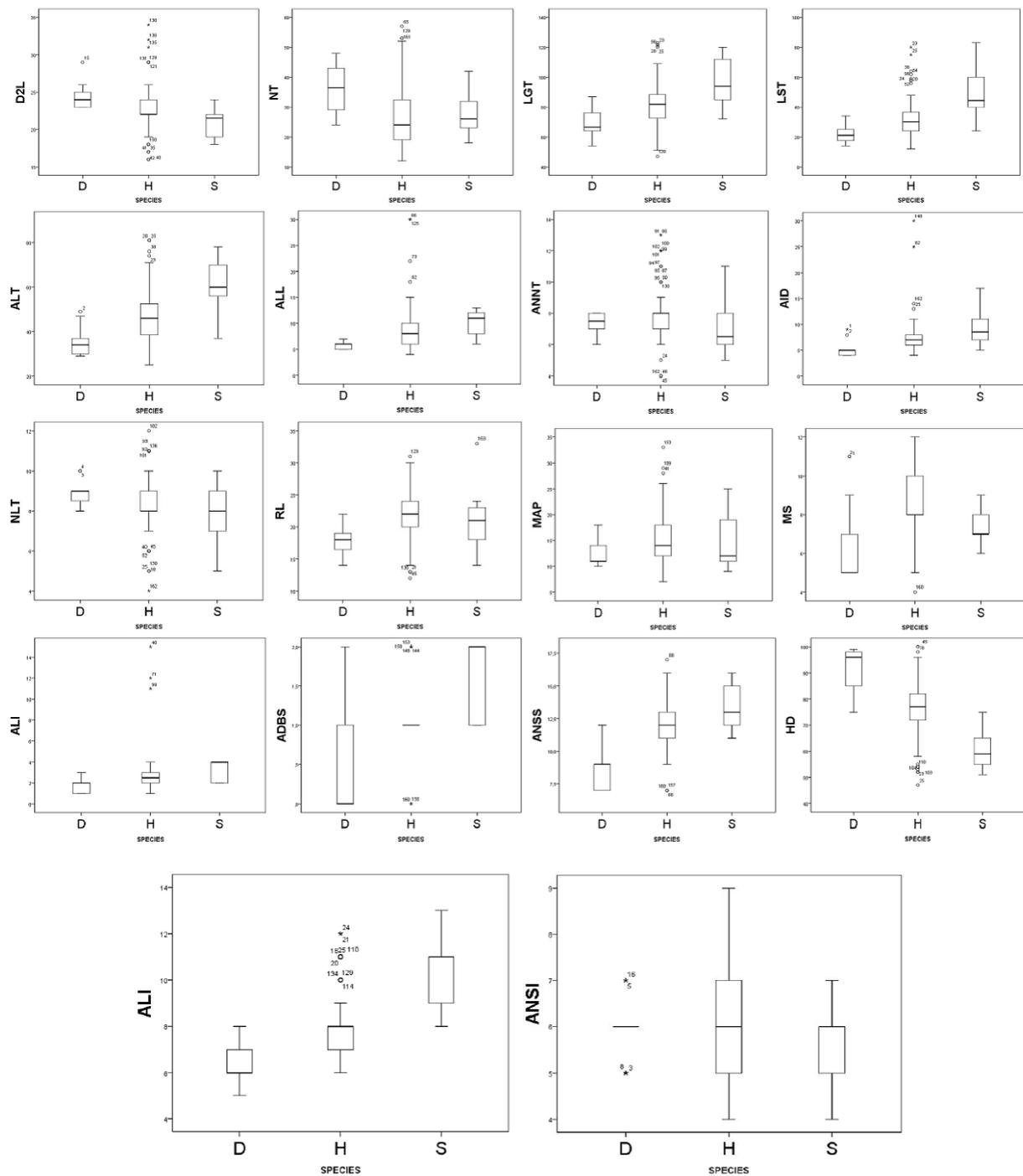


Figure 23: Graphiques de Box et whisker montrant le niveau de variation de 18 traits morphologiques analysés à l'échelle intra et interspécifique.

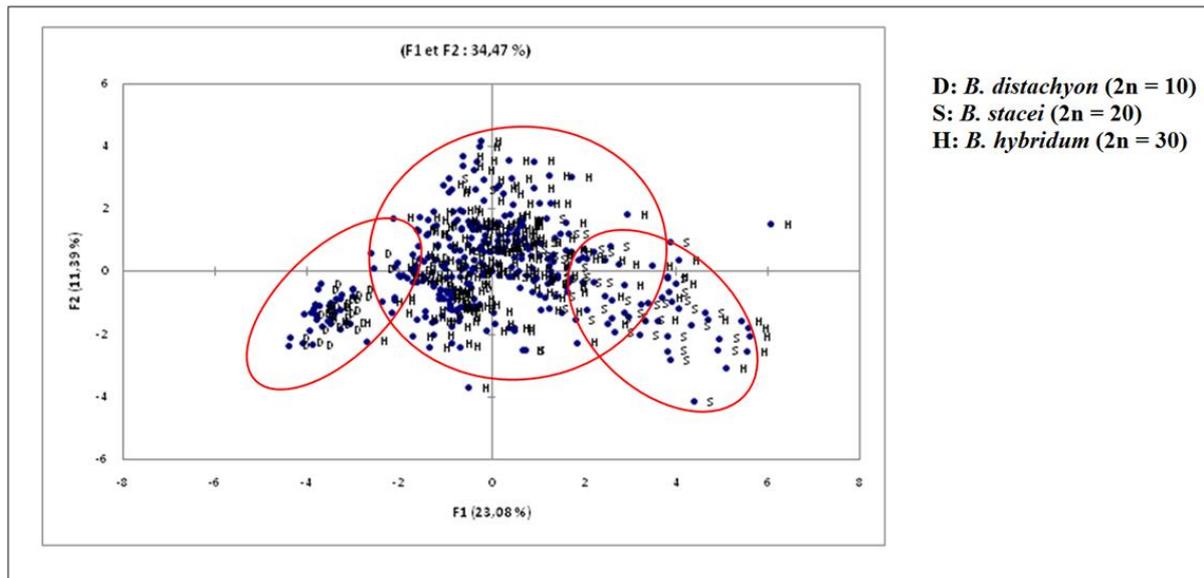


Figure 24: Analyse en composante principale des 180 lignées de *Brachypodium spp* sur la base des 18 traits morpho-phenologiques.

3- Analyse de la variabilité moléculaire du complexe *Brachypodium sp B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*

3-1- Analyse de la diversité génétique

15 microsatellites ont été utilisés pour estimer la diversité génétique des trois espèces. Bien qu'ils aient été développés pour l'espèce *B. distachyon*, les 15 SSR utilisés se sont montrés très informatifs avec un taux de polymorphisme de 100% chez les trois espèces. Au total, 165 allèles ont été recensés avec un nombre moyen d'allèles observés $N_a = 20.53$ et un nombre effectif moyen d'allèles $N_e = 10.8$. Nous avons estimé aussi la richesse allélique A_r au sein de chaque espèce qui n'est pas influencé par le nombre des individus analysés. En effet, l'espèce tétraploïde *B. hybridum* a montré le niveau de richesse allélique le plus élevé ($A_r = 9.7$) suivie par *B. stacei* ($A_r = 7.52$) puis *B. distachyon* ($A_r = 5.47$). Il est à noter que tous les allèles détectés chez *B. hybridum* étaient présents dans les deux espèces parentales. En plus de sa richesse allélique, *B. hybridum* est caractérisée par le niveau de diversité génétique le plus élevé, avec un taux d'hétérozygotie attendue (diversité génétique de Nei) (H_e) de 0.86 et un taux d'hétérozygotie observée H_o de l'ordre de 0.32. En ce qui concerne, les deux espèces parentales, elle montre des niveaux de diversité génétique relativement élevés lieu qu'elles soient représentées par un nombre assez faible de lignées. Au sein de *B.*

stacei, les niveaux d'hétérozygotie attendue et observée sont de l'ordre de 0.78 et 0.17, respectivement. *B. distachyon* s'est avérée l'espèce la moins diversifiée génétiquement avec He et Ho de l'ordre de 0.58 et 0.07, respectivement (Tableau 9).

Tableau 9: Indices de la diversité génétique basés sur les analyses effectuées par les 15 SSR sur les trois espèces (Ar : richesse allélique ; Na : nombre d'allèles observés ; Ne : nombre effectif d'allèles ; Np : nombre d'allèles privés ; I : indice de Shanon ; Ho : hétérozygotie observée ; He : hétérozygotie attendue ; %P : taux de polymorphisme)

Species	Ar	Na	Ne	Np	I	Ho	He	%P
<i>B. distachyon</i>	5.47	9.467	7.200	0.267	2.000	0.328	0.835	100 %
<i>B. hybridum</i>	7.52	14.933	9.040	3.800	2.228	0.368	0.856	100 %
<i>B. stacei</i>	9.7	8.733	6.227	0.267	1.882	0.367	0.811	100%

3-2- Relations phylogénétiques entre les trois espèces

La structure génétique globale et les relations phylogénétiques entre les trois espèces ont été analysées à l'aide d'une Analyse Factorielle des Correspondances et un modèle regroupement bayésien. L'AFC a montré que la totalité de la variation moléculaire est expliquée par les deux premiers facteurs avec des pourcentages de variation de 60.27% et 39.73%, respectivement. La projection des toutes les lignées sur le plan formé par les trois premiers axes de l'AFC une séparation claire entre les trois espèces (Figure 21).

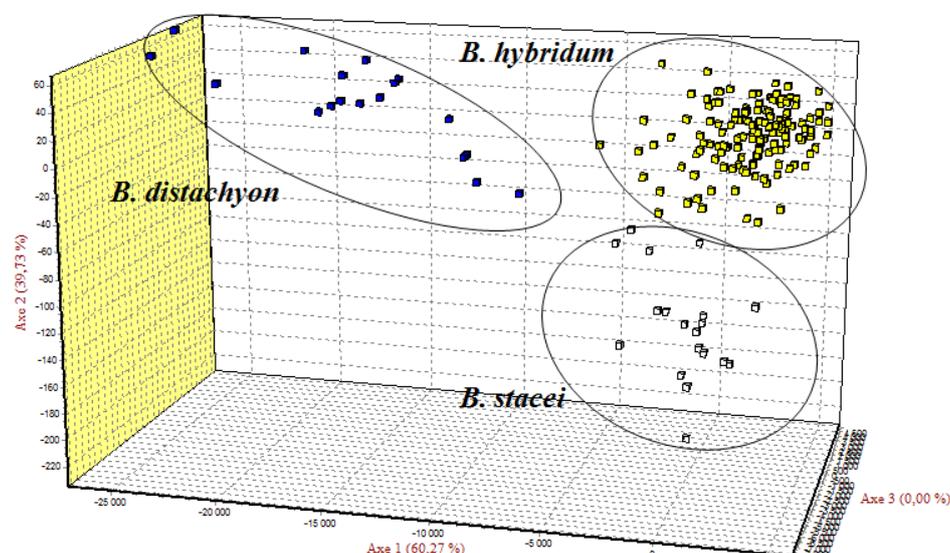


Figure 25: Analyse Factorielle des Correspondances basée sur des données moléculaires de 15 marqueurs SSR pour les 180 lignées de *Brachypodium*.

En concordance avec l'AFC, l'analyse bayésienne réalisée par le programme STRUCTURE indique que, les 180 lignées peuvent être classées en trois groupes majeurs ($K = 3$) (Figure 26). La figure 27 illustre la tendance des probabilités pour chacune des lignées d'appartenir à l'un des trois groupes. Sur l'ensemble des lignées étudiées, 154 lignées (85.6 %) ont été correctement assignées à l'un des trois groupes avec un pourcentage d'affiliation $Q > 75\%$, tandis que 26 (14,4%) ont été trouvées en mixture entre les 3 groupes ($Q < 75\%$). Le premier groupe (rouge) est formé par 106 lignées, dont la majorité est tétraploïde (103 *B. hybridum*, 1 *B. distachyon* et 2 *B. stacei*), le deuxième groupe (vert) est dominé par *B. distachyon* (16 *B. distachyon*, 5 *B. hybridum* et 2 *B. stacei*), tandis que le troisième groupe (bleu) est formé par 11 lignées de *B. stacei* et 14 lignées de *B. hybridum*.

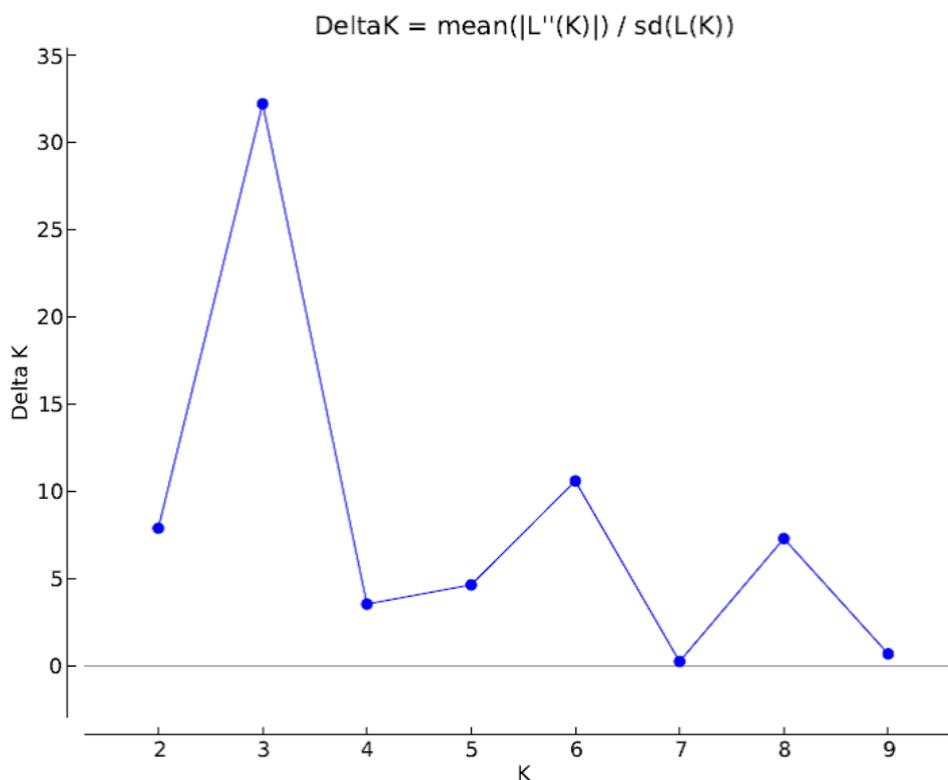


Figure 26: Inférence de la structure génétique de 180 lignées grâce aux simulations réalisées sur les données 15 SSR par le programme STRUCTURE : Evolution de ΔK en fonction de K (Evanno et al. (2005))

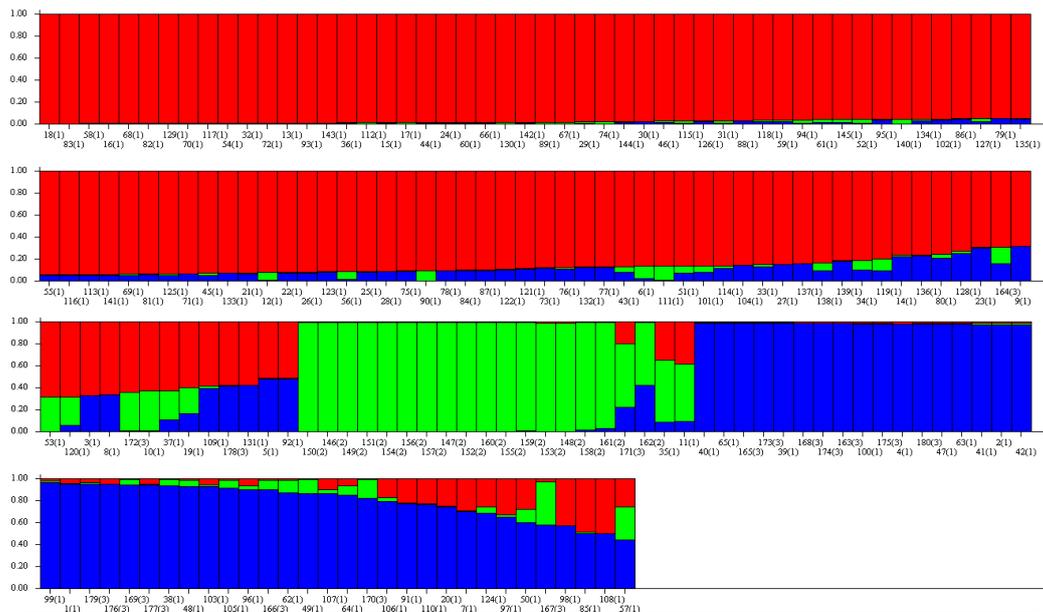


Figure 27: La structure génétique des 180 lignées de *Brachypodium* analysées déterminée à l'aide du programme STRUCTURE.

4- Discussion des résultats

4-1- Identification des espèces et évaluation de leurs fréquences sur le territoire tunisien

L'approche moléculaire développée par Giraldo et al (2012) nous a permis de montrer que 81% des lignées analysées sont de nature tétraploïde et 19 % des lignées diploïdes. Etant donné que les prospections couvrent la totalité de l'aire de distribution du *Brachypodium* en Tunisie, ces résultats suggèrent que, l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* ($2n= 2(5+10) = 30$) est l'espèce la plus répandue sur le territoire tunisien et qu'elle couvre divers étages bioclimatiques et milieux écologiques tandis que, les diploïdes ont une forte propension à s'isoler en petites populations. En effet, *B. distachyon* se concentre essentiellement dans la région d'Ain Drahem, tandis que *B. stacei* dans les régions de Sidi Bouzid (Fayedh) et Zaghouan. Cette localisation marginale de deux espèces diploïdes est probablement associée à la préférence d'habitat et des conditions climatiques. La propension de *B. distachyon* à se concentrer dans l'étage bioclimatique humide, et la tendance de *B. stacei* à préférer les zones bioclimatiques arides et semi arides plaide en faveur de cette hypothèse et suggère que *B. stacei* tolère mieux la sécheresse. Ces observations mettent en évidence que les conditions bioclimatiques en Tunisie jouent un rôle majeur dans la structuration géographique de trois espèces. Par ailleurs, la distribution géographique particulière des taxons diploïdes indique

que, la polyploïdie semblerait avoir un impact dramatique sur la densité et la distribution géographique de ces espèces. Chez *B. hybridum*, la polyploïdie pourrait être l'un des moyens d'adaptation aux milieux marginaux et aux diverses conditions climatiques et écologiques. Plusieurs travaux dans ce sens ont été rapportés pour des autres *Poacées* dans la région méditerranéenne. En Algérie, Amirouche et al (2009) ont montré une forte corrélation entre la distribution géographique, la polyploïdie et les conditions bioclimatiques chez les orges spontanées, précisément chez le complexe *H. murinum*. En effet ils ont montré que les populations tétraploïdes (*H. leporinum* ssp.) sont très polymorphes et sont largement répandues alors que les diploïdes (*H. glaucum* ssp.) montrent un isolement relatif et une distribution marginale associée à la sécheresse et à la salinité. De même, Van Slageren (1994) a montré que les espèces diploïdes du genre *Aegilops* ont des aires de répartition limitées par rapport aux espèces tétraploïdes, caractérisées par une large distribution géographique, au Maroc.

Nous avons observé aussi que, dans plusieurs de leurs aires de distribution, apparemment disjointes, l'espèce tétraploïde ne peut être sympatrique qu'avec l'une ou l'autre espèce des deux autres (que ce soit *B. distachyon* ou *B. stacei*) mais pas avec les deux ensemble. Aussi, aucun rassemblement n'a été observé entre les deux espèces diploïdes. Cependant, la communauté scientifique internationale intéressée par *Brachypodium spp* n'a pas encore trouvé des explications plausibles pour cette répartition. Considérant que ce complexe d'espèces est considéré comme "espèces génétiquement isolées" plutôt que "reproductivement isolées", la notion d'espèces biologiques définie par Rieseberg et Carney (1998), le sympatrisme géographique entre les trois espèces, du moins lorsqu'on cartographie à petite échelle, est possible et pourrait exister en combinaison avec une séparation écologique locale. Des études peuvent plaider en faveur de cette hypothèse.

En ce qui concerne le sympatrisme entre *B. distachyon* et *B. stacei*, plusieurs scénarios peuvent expliquer son absence. Tout d'abord, la propension de deux espèces à occuper des zones biogéographiques et des conditions climatiques différentes peut empêcher le sympatrisme entre eux. En outre, il a été démontré que l'évolution des génomes par polyploïdie est un processus évolutif très rapide du fait que le sympatrisme naturel entre *B. distachyon* et *B. stacei* s'est associé éventuellement à une allopolyploïdie, dont les conséquences sont presque immédiates sur la physiologie, la forme des organismes et souvent à des barrières de reproduction conduisant ainsi à la spéciation instantanée et donc la colonisation de *B. hybridum*. En revanche, la faible divergence phylogénétique entre les

parents, les origines multiples et les flux de gènes entre les populations parentales pourraient apporter d'éventuels conflits provoqués par la présence de deux espèces interfécondes dans le même endroit ce qui favorise l'hybridation, et par conséquent l'évolution du génome polyploïde. Cette dynamique d'hybridation naturelle entre les taxons diploïdes est considérée comme l'une des raisons de leur succès de colonisation de l'espèce polyploïde et l'absence du sympatrisme diploïde-diploïde (Soltis et Soltis 2000, Ainouche et al 2009). Par ailleurs, *B. distachyon* et *B. stacei* semblent assez exigeantes et sensibles à la compétition.

4-2- Variabilité morpho-phénologique du complexe d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* en Tunisie

La caractérisation de la variation phénotypique des espèces végétales à l'échelle intra et interspécifique permet l'estimation de la structure de leur variabilité génétique. De plus, elle fournit des informations utiles sur la valeur agronomique des espèces pour les programmes de sélection et d'exploitation des ressources génétiques. Dans cette partie de travail, nous avons cherché à comprendre la structure de la variation phénotypique du complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* en utilisant 18 traits morpho-phénologiques.

Bien que le nombre des lignées au sein des deux espèces diploïdes ait été restreint, notre étude a mis en évidence une variabilité intra spécifique importante pour la majorité des caractères étudiés suggérant ainsi que les trois espèces sont morphologiquement très variables. De même et en conformité avec ces résultats, de nombreuses études ont montré la grande variabilité morphologique de l'espèce diploïde *B. distachyon* (Draper et al, 2001; Filiz et al 2009; Vogel et al 2009; Schwartz et al 2010 ; Jaroszewicz et al 2012 ; catalan et al, 2012).

D'une façon générale, le niveau de variation intra spécifique domine celui interspécifique et l'espèce tétraploïde *B. hybridum* est morphologiquement plus variable que ses deux pro-géniteurs diploïdes. Toutefois, le nombre restreint des lignées diploïdes (*B. distachyon* et *B. stacei*) reste une limite pour la confirmation de ce constat et rend la comparaison du niveau de variation entre les trois espèces difficile.

La prépondérance de contrastes géographiques des trois espèces suggère que la structure de variation morphologique au sein de ce complexe reflète des différences de pression de sélection du milieu. En effet, plusieurs études ont montré que la variation morphologique est apparemment le résultat d'une réponse adaptative aux conditions environnementales (Badri et al, 2007; Neji et al, 2013). Compte tenu de sa large répartition géographique, le niveau de

variation relativement élevé de *B. hybridum* pourrait être attribué à ses grandes capacités de pousser dans diverses conditions pédoclimatiques. En accord avec ce résultat, Lopez et al, (2012) et Benavente et al, (2013) ont montré que *B. hybridum* présente une grande adaptation aux diverses variables climatiques (température, précipitations etc...). De même, plusieurs travaux ont montré qu'en comparaison avec leurs progéniteurs, les espèces polyploïdes présentent plus d'adaptation phénotypique, physiologique et écologique (Anssour et al 2009; Ni et al 2009; Ramsey 2011). En revanche, d'autres études ont montré que dans la région méditerranéenne, les populations d'espèces largement répandues se trouvent généralement dans des habitats plus divers et instables que les populations de leurs congénères endémiques ce qui leurs permettent de présenter des adaptations morphologiques aux différentes conditions environnementales (Lavergne et al., 2004).

La structure de la variation morphologique du complexe d'espèces établie par l'analyse en composante principale a montré que les lignées de chaque espèce avaient les tendances d'être regroupées ensemble. Les lignées de *B. hybridum* sont groupées ensemble tout autour de l'origine, les lignées de *B. distachyon* se rassemblent dans la partie positive de PC1 tandis que celles de *B. stacei* sont agrégées dans la partie négative du même axe. Le regroupement des lignées tétraploïdes dans une zone intermédiaire et chevauchante avec les lignées diploïdes confirme le phénomène d'hybridation interspécifique et l'origine polyploïde de *B. hybridum*. Une telle structure confirme que la variabilité morphologique au sein de ce complexe est dominée par le niveau intra spécifique et suggère la grande ressemblance morphologique entre les trois espèces. Ceci a été bien confirmé par l'analyse factorielle discriminante. En effet, la majorité des descripteurs morphologiques étudiés ont montré des valeurs des λ Wilks très élevées (proches de 1), ce qui suggère qu'ils ne sont pas puissants dans la discrimination entre les trois espèces. Ces résultats supportent les difficultés rencontrées dans la distinction entre les espèces de *Brachypodium* déjà signalé dans la littérature. En effet, en utilisant 15 caractères morpho-anatomiques, Catalan et al., (2012) ont montré que la discrimination entre le complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* est plus fiable à l'aide des traits anatomiques ou des traits qualitatifs. De même, en utilisant 28 traits quantitatifs et qualitatifs, Paszko (2008) a constaté que, 6 traits seulement peuvent différencier entre les deux espèces pérennes *B. pinnatum* et *B. sylvaticum* dont un seul, qui est la longueur du lemme, conduit à une discrimination fiable.

4-3- Analyse de la variation moléculaire de complexe d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* à l'aide des marqueurs SSR

Dans le monde végétal, la caractérisation de la variabilité génétique à l'aide des caractères morphologiques est souvent complétée par des marqueurs neutres vis-à-vis les fluctuations de l'environnement. La caractérisation moléculaire pourrait fournir une idée claire sur la structure de la variabilité génétique des populations. Dans cette partie du travail, 15 marqueurs microsatellites ont été utilisés afin de caractériser la diversité et la structure de la variabilité génétique de trois espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum*.

Bien qu'ils aient été développés chez *B. distachyon*, les résultats ont révélé que les SSR utilisés sont très informatifs et hautement polymorphes (100%) chez les trois espèces indiquant ainsi la grande transférabilité et sythénie entre ce complexe d'espèces. Nos résultats ont montré aussi que la variabilité génétique, exprimée par l'indice de diversité génétique de Nei (H_e), est relativement élevée chez les trois espèces, ce qui suggère que ce complexe d'espèces est, génétiquement, très variable en Tunisie. Toutefois, cette variabilité génétique est plus importante chez l'espèce *B. hybridum*. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les espèces à large répartition géographique sont généralement plus polymorphes que celles caractérisées par une distribution géographique limitée. Par ailleurs, l'origine hybride de *B. hybridum* pourrait être une explication plausible de sa grande variabilité génétique. En effet, L'hybridation peut avoir plusieurs conséquences évolutives, incluant une augmentation de la diversité génétique, l'apparition ou le transfert d'adaptations génétiques, l'apparition de nouveaux écotypes (Rieseberg, 1997). Des résultats similaires ont été rapportés par Hammami et al. (2012) chez ce complexe d'espèces et par Ainouche et al. (1995) chez *Bromus L.* Toutefois, vu la nature polyploïde de *B. hybridum*, sa diversité génétique devrait dépasser significativement la diversité des progéniteurs diploïdes, ce qui n'est pas le cas dans nos résultats. Ceci pourrait être dû au faible nombre de lignées diploïdes analysées par rapport à celui des tétraploïdes (17 et 18 lignées vs 145 lignées).

Les relations phylogénétiques entre les 180 lignées de *Brachypodium spp* ont été étudiées par une Analyse Factorielle des Correspondances et une analyse bayésienne. Les deux analyses ont fourni un regroupement des lignées similaire à celui établi à partir des données morphologiques. En effet, les lignées de chaque espèce sont regroupées dans un groupe à part. L'analyse bayésienne a montré que les groupes sont très liés génétiquement ($\square = 0.05$) ce qui confirme la grande proximité phylogénétique entre les trois espèces.

Globalement, les résultats des analyses moléculaires corroborent ceux obtenus à partir des données morphologiques suggérant que la structure de variation phénotypique entre les trois espèces a probablement des bases génétiques.

L'objectif de cette partie a été la différenciation entre le complexe d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* et l'évaluation de la structure de la variabilité morphologique et génétique au sein et entre les trois espèces. Nous avons clairement précisé dans ce chapitre l'abondance de l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* en Tunisie, montré sa très importante diversité et sa forte structure génétique et évalué de manière comparative la diversité de *B. hybridum* vis-à-vis de ses pro-géniteurs. Ce qui appelle à effectuer une étude plus fine de la structure de la variabilité morpho-phénologique et génétique de cette espèce. Ces informations seront également importantes pour une meilleure compréhension de complexe d'espèces.

CHAPITRE II

**Etude de la variabilité morpho-phénologique des
populations tunisiennes de *Brachypodium hybridum***

I- Introduction

Pendant longtemps, l'hybridation est restée peu étudiée car l'hypothèse principale consistait à dire que les hybrides sont des intermédiaires entre les deux espèces parentales et ne peuvent donc avoir aucun impact évolutif. Les premières études sur l'hybridation datent de 1760 avec les études expérimentales de Joseph Kolteurer sur le tabac (*Nicotiana*), mais le nombre d'études sur le sujet a fortement augmenté ces dernières décennies, notamment avec l'étude poussée de certaines espèces modèles comme le coton (Rhyne, 1962; Gao *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2006; Vafaie-Tabar et Chandrashekar, 2007) le tabac (Kelly *et al.*, 2009) ou le tournesol (Edelist *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2007).

Seules quelques études parlaient de la contribution de l'hybridation à l'évolution adaptative (Arnold, 2006). Une des conséquences de l'hybridation est la spéciation allopolyploïde où le génome de l'hybride formé est composé des génomes des espèces parentales et qui implique un isolement reproductif des hybrides soit par des réarrangements chromosomiques, soit par une divergence écologique, soit par une séparation spatiale (Buerkle *et al.*, 2000). Ce phénomène est très fortement dépendant des relations phylogénétiques entre les espèces concernées. Deux types de modèles ont été discutés quant au fonctionnement et à la dynamique de l'hybridation. Le premier modèle estime que les hybrides ont un pouvoir adaptatif plus faible que leur parent car ils seraient contre sélectionnés par l'action des barrières post-zygotiques (Barton, Hewitt, 1985), tandis que le deuxième modèle suppose que l'hybridation peut avoir plusieurs conséquences évolutives, incluant une augmentation de la diversité génétique, l'apparition ou le transfert d'adaptations génétiques et que, suite à l'augmentation de leur pouvoir invasif, les espèces hybrides peuvent surpasser leurs parents en terme de capacités adaptatives et abondance géographique (Rieseberg *et al.* 2003). Certaines espèces sont issues d'une spéciation par hybridation interspécifique, un type de spéciation courant chez les plantes, spécialement par allopolyploïdisation (Rieseberg et Willis, 2007). Ces espèces polyploïdes présentent en général des caractéristiques phénotypiques intéressantes pour l'agriculture. L'amélioration génétique de telles espèces nécessite l'approfondissement des connaissances concernant l'aptitude des polyploïdes à disposer de l'information génétique redondante. *B. hybridum* ($2n = 2(5+10) = 30$) est une espèce allotétraploïde au sein du genre *Brachypodium* qui présente deux sous-génomes peu différenciés provenant l'hybridation récente de deux espèces

diploïdes *B. distachyon* ($2n = 10$) et *B. stacei* ($2n = 20$). Les quelques études réalisées sur la biogéographie des trois espèces ont montré qu'elles sont natives de la région méditerranéenne et que l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* est la plus répandue géographiquement (Catalan et al, 2012 ; Alvarez lopez et al, 2012). Ces études ont montré aussi que cette espèce présente des capacités adaptatives à des variations environnementales meilleure que celles espèces diploïdes (Catalan et al, 2012 ; Alvarez lopez et al, 2012 ; Benevante et al, 2013).

Dans le premier chapitre nous avons montré que l'espèce allotetraploïde *B. hybridum* est la plus répandue et qu'elle est caractérisée par une diversité morphologique et génétique importante. La gestion des ressources génétiques de cette espèce passe d'abord par un inventaire de la diversité génétique disponible et la description de l'organisation hiérarchique de cette diversité entre individus, populations. Ces informations précieuses peuvent être la base des programmes d'amélioration des plantes. Cependant, une meilleure compréhension des facteurs historiques, démographiques et évolutifs façonnant la diversité génétique tant au niveau phénotypique que moléculaire est également importante pour pouvoir statuer sur le niveau de diversité existant au sein et entre les populations. D'autre part, la caractérisation phénotypique d'une collection de populations consiste à enregistrer les caractéristiques morphologiques et agronomiques héritées, qui peuvent être facilement observées, et qui s'expriment en fonction de leurs environnements d'origine d'où l'intérêt de ce chapitre, dont les objectifs sont :

- Analyser au moyen de marqueurs morphologiques et phénologiques, la structure de la variation phénotypique des populations tunisiennes de *B. hybridum*.
- Identifier les facteurs qui gouvernent la structure de la variation.

II- Aperçu sur les méthodes utilisées

Les résultats obtenus dans le premier chapitre ont montré que, 145 lignées parmi les 180 lignées du complexe *Brachypodium* sont de *B. hybridum*. Ces lignées sont originaires de 9 populations représentatives des toutes les zones bioclimatiques de la Tunisie. Pour les 145 lignées de *B. hybridum*, les données relatives aux 18 caractères morfo-phénologiques étudiés ont été soumises à une analyse statistique par des diverses méthodes à l'échelle uni et multivariable. D'abord, une analyse statistique descriptive a été appliquée: la moyenne, l'intervalle de variation, la déviation standard et le coefficient de variation ont servi pour

caractériser la tendance centrale et la dispersion de chacun des traits mesurés. Ensuite, la structure de la variation phénotypique a été examinée successivement par :

- 1) L'analyse du degré d'association entre les différents caractères morpho-métriques, à travers le calcul du coefficient de corrélation de Person.
- 2) Une analyse de variance hiérarchique « ANOVA » séparant la variance observée en différents niveaux hiérarchiques.
- 3) Estimation de l'héritabilité génétique des caractères.
- 4) Estimation du niveau de différenciation morphologique au moyen de l'indice de différenciation morphologique (Qst).
- 5) Une analyse en composantes principales (ACP).
- 6) Une analyse par classification hiérarchique.
- 7) Evaluation de la corrélation entre la structure de variation et la distribution géographique (Le Test de Mantel).

III- Les principaux resultats

L'ensemble des statistiques descriptives ainsi que l'analyse de la variance ont montré une diversité phénotypique importante à l'échelle des populations et éco- régions pour tous les traits morpho-phénologiques analysés. Les traits relatifs à l'appareil reproducteur et la production des semences se sont avérés légèrement plus variables que ceux liés au développement végétatif des plantes (34,8% vs 32.8%). Le taux d'héritabilité pour l'ensemble des traits est compris entre 0.026) et 0.9, avec une moyenne de 0.6. Dans l'ensemble, la variation phénotypique intra-population domine celle inter-population pour la majorité des traits (60% vs 40%). Le coefficient de de la différenciation morphologique entre les populations (Qst) varie entre 0.02 pour la longueur moyenne des épillets à 0,78 pour la longueur moyenne des feuilles avec un coefficient de différenciation morphologique global pour tous les traits de 0,4. Les populations originaires de Ain Draham et Jbel Zaghouan sont les plus différenciées morphologiquement (Qst = 0,61), tandis que celles de Haouaria et Raoued sont les proches (Qst = 0,1). Le test de Mantel a montré que la structure de la variation des populations tunisiennes de *B. hybridum* n'est pas liée ni aux distances géographiques ($r = 0,04$) ni aux différences d'altitude ($r = - 0,262$). L'ensemble des résultats obtenus suggère que la structure de la variabilité morphologique de *B. hybridum* en Tunisie

est sous l'influence de l'effet combinée de la sélection naturelle et les flux de gènes par le biais de dispersion de semences à longues distances.

En conclusion, l'analyse de la variabilité morpho-phénologique s'avère très utile pour dresser un premier plan sur la diversité et la structure phénotypique de *B. hybridum* en Tunisie. Elle pourrait aussi être la base de plusieurs programmes d'amélioration des plantes orientés vers la conception de lignées élités tolérantes aux contraintes abiotiques majeures présentes en Tunisie, telle que la salinité et la sécheresse. Toutefois, l'évaluation de la variabilité des caractères morpho-phénologiques reste insuffisante pour une description parfaite de la structure génétique de *B. hybridum*. Pour cela, l'exploitation du polymorphisme des marqueurs moléculaires neutres vis-à-vis de l'environnement, est une approche complémentaire et très utile pour la conception de la gestion des ressources phylogénétiques.

L'ensemble de ces résultats sont détaillées et discutés dans un article intitulé '**Morpho-phenological diversity among Tunisian natural populations of *Brachypodium hybridum***' publié dans '**Journal of Agricultural science**'

Article

Morpho-phenological diversity among Tunisian natural populations of
Brachypodium hybridum

1 CROPS AND SOILS RESEARCH PAPER

2 Morpho-phenological diversity among Tunisian natural populations of *Brachypodium hybridum*

Q1 4 M. NEJI^{1,2*}, F. GEUNA², W. TAAMALLI¹, Y. IBRAHIM¹, M. SMIDA¹, M. BADRI¹, C. ABDELLY¹
5 AND M. GANDOUR^{1††}

6 ¹ Laboratory of Extremophile Plants, Center of Biotechnology of Borj-Cédria BP 901, 2050 HammamLif, Tunisia

7 ² Laboratory of Molecular Genetic, Department of Agricultural and Environmental Sciences (DISAA), Via Celoria,
8 2 – 20133 – Milan, Italy

9 (Received 23 January 2014; revised 2 April 2014; accepted 27 May 2014)

10 SUMMARY

11 *Brachypodium hybridum* belongs to the Poaceae grass subfamily. It has a close genetic relationship with
12 temperate cereal crops, which means that it can be used as a model for temperate cereal and grass crops. In order
13 to improve knowledge on the genetic diversity of this species, 145 lines of *B. hybridum* representative of nine
14 populations and all the ecoregions of Tunisia were characterized on the basis of 18 morpho-phenologic features.
15 The results show a considerable variation between populations and ecoregions in all traits studied. Variation was
16 relatively higher for reproductive than vegetative traits. The majority of traits showed very low to high heritability
17 with low border value for average length of spikelet (ALS) and an average value of 0.64. It is noticeable that high
18 values of heritability were observed for most vegetative descriptors, with low values for reproductive ones.
19 Differentiation between populations (Q_{ST}) varied from 0.02 for ALS to 0.78 for average length of leaves with a
20 mean value across traits of 0.4, which confirms the wide intra-population variation in Tunisian natural population
21 of *B. hybridum*. Pairwise Q_{ST} showed that the greatest differentiation among populations was registered between
22 Ain Drahem and Jbel Zaghouan and the smallest between Haouria and Raoued. Overall, the Ain Drahem
23 population showed the largest differentiation from the rest of the populations. To infer the effect of geographic
24 distribution of the species, a Mantel test was applied between observed pairwise differentiation and geographic
25 distance between populations and between ecoregions: the results show a positive, but not significant, rela-
26 tionship. In addition a significant negative relationship was found between phenotypic diversity and altitude,
27 indicating that genetic diversity decreased with increasing altitude. Taken together, the high levels of intra-
28 population variation and the lack of correlation between genetic differentiation and geographic distribution
29 suggest a potentially important rate of long-distance seed dispersal and confirm the role played by natural
30 selection in the population structure of Tunisian natural populations of *B. hybridum*.

31 INTRODUCTION

32 The majority of calories derived from monocots in the
33 human diet come from grasses, which are increasingly
34 used as a sustainable source of energy (Brkljacic et al.
35 2011). Moreover, they serve as forage crops and
36 provide several desirable genes contributing to eluci-
37 dation of the complex molecular mechanisms of en-
38 vironmental stress tolerance and the improvement of

domesticated grasses (Jauhar 2006; Qi et al. 2007; 39
Trethowan & Mujeeb-Kazi 2008). As a wild grass not 40
directly under human selection, *Brachypodium* might 41
provide some insight into these processes. Thus, sig- 42
nificant investment has been made in developing and 43
using *Brachypodium distachyon* as a model for tem- 44
perate cereal and grass crops. In this context, it is note- 45
worthy that *B. distachyon* is a 'typical' grass at the 46
genome level, as reflected by the overall similarity in 47
gene content and gene families when compared with 48
rice and sorghum (*Sorghum bicolor*) genomes (IBI 49
2010). 50

* These authors contributed equally to this work.

† To whom all correspondence should be addressed. Email:
gandourmed@yahoo.fr

2 M. Neji *et al.*

51 This wild *Poaceae* has many qualities that make it an
 52 excellent model organism. It has a small genome
 53 (recently sequenced c. 300 Mbp for *B. distachyon*;
 54 IBI 2010), a rapid generation cycle under optimized
 55 conditions (8–12 weeks), does not grow very tall
 56 (20–30 cm) at high planting densities, requires few
 57 demanding growth resources and shows good en-
 58 vironmental adaptation (Vogel *et al.* 2009). In addition
 59 to its inherent attributes, a number of resources
 60 have been recently developed to facilitate the use of
 61 *B. distachyon* and its two relatives, *Brachypodium*
 62 *stacei* and *Brachypodium hybridum*, as model species
 63 (Catalán *et al.* 2012). These three species are native to
 64 the Mediterranean region but only *B. hybridum* is
 65 known (to date) as an alien species in other regions
 66 (e.g. California, Australia, South America and South
 67 Africa) (López-Alvarez *et al.* 2012). *Brachypodium*
 68 *distachyon* is common in Mediterranean-type habitats
 69 on many mainly dry soil types and also grows on cultivat-
 70 ed fields (Pacurar 2009). This distribution indicates
 71 that it is a generalist plant. Thus, it has been used to
 72 protect rural soils from erosion, especially in slope
 73 areas where water runoff, wind and other agents cause
 74 soil loss (Hammami *et al.* 2011). The allotetraploid
 75 *B. hybridum* is derived from the natural inter-specific
 76 hybridization between *B. distachyon* ($2n=10$) and
 77 *B. stacei* ($2n=20$). It has a base chromosome number
 78 of $n=15$ ($10+5$) and a genome size of 1.265 pg/2C,
 79 resulting from the sum of the genomes of the
 80 two progenitors (*B. distachyon* 0.631 pg/2C, *B. stacei*
 81 0.564 pg/2C) (López-Alvarez *et al.* 2012). In Tunisia,
 82 *B. hybridum* is distributed in a large range of climatic
 83 conditions. In some areas, it forms mixed populations
 84 with other wild *Poaceae* and even other species of
 85 *Brachypodium* such as *B. distachyon*, *B. stacei* and
 86 *B. retusum*, more rarely with *B. phoenicoides*, but is
 87 not sympatric (or very infrequently) with *B. sylvaticum*
 88 and *B. pinnatum* s.l. However, up to now there appears
 89 to be no detailed studies and also no information
 90 available on patterns of genetic variation within and
 91 among *Brachypodium* germplasm in Africa.
 92 The current work analysed the pheno-morphologic
 93 diversity of wide sampling natural populations of
 94 *B. hybridum* in relation to bioclimatic factors.

95 MATERIALS AND METHODS

96 Collection and sampling

97 The current work was initiated in 2010 by a survey of
 98 the Tunisia territory and localization of the populations

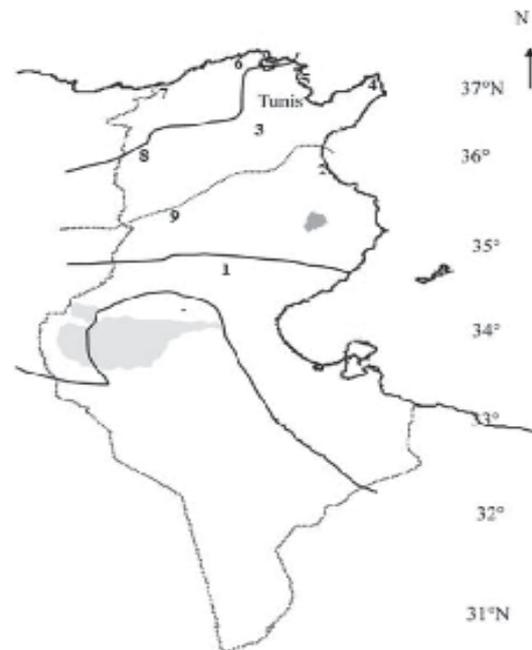


Fig. 1. Tunisian populations of *Brachypodium hybridum* and their bioclimatic regions: 1, Fayedh (arid); 2, Erfdiha (lower semi-arid); 3, Jbel Zaghouan (upper semi-arid); 4, Hawaria (sub-humid); 5, Raouad (upper semi-arid); 6, Sejnen (humid); 7, Ain Drahem (humid); 8, El Kef (lower semi-arid); 9, Douar El Hej Wniss (semi-arid). Shaded areas indicate saline lagoons (chott) and salt flats (sebkha) in Tunisia.

of *B. hybridum* by Global Positioning System (GPS). 99
 The objective of the survey was to ensure inclusion 100
 of populations' representative of all the bioclimatic 101
 stages in Tunisia (Fig. 1). The characteristics of selected 102
 sites are detailed in Table 1. At each location, about 103
 20 mother plants (family: descendants of the same 104
 selfed plant) were collected randomly from each 105
 population. The neighbouring samples were at least 106
 10 m apart to avoid sampling bias from related lines. 107
 Distances between populations were at least 35 km. 108

Pheno-morphological characterization under 109
 greenhouse conditions 110

The experiment was conducted under greenhouse condi- 111
 tions at the Centre of Biotechnology, Borj-Cedria, 112
 Tunisia and consisted of 145 families (lines) of 113
B. hybridum collected across the nine populations 114

Table 1. Characteristics of sites of origin of the studied Tunisian *Brachypodium hybridum* populations

ID	Location	Latitude	Longitude	Altitude (m a.s.l)	Bioclimatic area (ecoregion)
F	Fayedh	35°4'N	9°40'E	83	Arid (1)
E	Enfidha	36°7'N	10°27'E	7	Lower semi-arid (2)
Z	Jbel Zaghuan	36°22'N	10°5'E	450	Upper semi-arid (4)
H	Hawaria	37°2'N	11°0'E	23	Sub-humid
R	Raouad	36°57'N	10°14'E	3	Upper semi-arid (4)
S	Sejnen	37°4'N	9°9'E	115	Humid (6)
A	Ain Drahem	36°48'N	8°41'E	134	Humid (6)
K	El Kef	36° 6'N	8°37'E	482	Lower semi-arid (2)
D	Douar El Hej Wniss	35°40'N	8°53'E	880	Semi-arid (3)

115 sampled. Four seeds from each family were germi-
 116 nated and cultivated in plastic pots until maturity.
 117 Eighteen quantitative traits considered as descriptors
 118 for wild *Poaceae* were measured on 580 individuals
 119 representing the 145 families (four replicates from
 120 each family). Eleven of these were related to vegetative
 121 growth: days to second leaf emergence (D2L), number
 122 of tillers (NT), length of the main tiller (LGT), mass of
 123 the aerial part (MAP), average length of tillers (ALT),
 124 average leaf length (ALL), average number of nodes per
 125 tiller (ANNT), average internode distance (AID), num-
 126 ber of leaves per tiller (NLT), root length (RT) and the
 127 length of the smallest tiller (LST). The remaining traits
 128 were related to reproduction or seed production: mass
 129 of spikelets (MS), average length of spikelet (ALS),
 130 average distance between spikelets (ADBS), average
 131 number of spikelets per inflorescence (ANSI), heading
 132 date (DH), average length of inflorescence (ALI) and
 133 average number of seeds per spikelet (ANSS).

134 Data analysis

135 Data collected from all morphological traits were
 136 subjected to varied statistical analyses using SPSS v.16:
 137 descriptive analysis, analysis of variance (ANOVA)
 138 and Pearson correlations between variables and cli-
 139 mate regions. Along a gradient of increasing humidity,
 140 the bioclimatic regions were scored from 1 for arid to
 141 6 for humid (Table 1). The structure of variation in
 142 phenotypic traits was analysed after running nested
 143 ANOVA, including population and family (nested
 144 within population) as a random effect using SPSS
 145 v.16. For altitudinal effect, the collection was sub-
 146 divided into three classes of altitude (class 1: 0–80 m,
 147 class 2: 80–400 m and class 3: >400 m) (Table 1).
 148 Component of variance allowed estimations of popu-
 149 lation subdivisions (Q_{ST}) as $Q_{ST} = (1+f) V_{AP} / (1+f)$
 150 $V_{AP} + 2 V_C$) under the assumption of no dominance

and epistasis (Spitze 1993; Morgan et al. 2001), where
 151 V_{AP} is the among-population variance component,
 152 V_C is the intra-populations variance component and
 153 f is the coefficient of consanguinity. Since *B. hybridum*
 154 is a predominant autogamous species, f was assumed
 155 to be 1 and Q_{ST} was simplified as $V_{AP} / (V_{AP} + V_C)$
 156

For each population, the same model of ANOVA
 157 was performed to subdivide the within-population
 158 variance into among-family variance and within-
 159 family variance. These components were used to
 160 estimate the broad sense heritability (H^2) as $H^2 = V_C /$
 161 $V_{WP} = V_C / (V_C + V_E)$, where V_C was the genetic variance
 162 between families and V_E was the environmental effect.
 163

The standardized traits mean values were used to
 164 perform Principal Component Analysis (PCA) and a
 165 two-dimensional scatter plot was produced in order to
 166 study the grouping among studied lines (families).
 167 Based on Ward's method for the clustering algorithm,
 168 morpho-phenologic measurements were used to
 169 generate an unweighted pair group method with
 170 arithmetic mean (UPGMA) dendrogram based on
 171 Euclidean distances to illustrate the relatedness be-
 172 tween lines (families). The Mantel test was performed
 173 in order to test the correlation between genetic and
 174 geographical distances among populations (Mantel
 175 1967). Principal Component Analysis, cluster analysis
 176 and Mantel correlations tests were generated by the
 177 13th version of XLSTAT software.
 178

179 RESULTS

180 Morpho-phenologic variation

181 Analysis of variance, estimated as coefficient of
 182 variation (CV), showed significant variations between
 183 the 145 studied lines representing the nine popu-
 184 lations: results are summarized in Tables 2 and 3. The
 185 CV estimated for morphological characters varies
 186 across the 145 lines and indicates variance patterns;

Table 2. Mean values, standard deviation, coefficient of variation, % of variation, Heritability (H^2), coefficient of morphologic diversity (Q_{ST}) and altitudinal effect (class 1: from 0 to 80 m, class 2: from 80 to 400 m and class 3: >400 m) on the vegetative traits (days to the second leaf emergence (D2L), number of tillers (NT), length of the greater tiller (LGT), mass of the aerial part (MAP), average length of tillers (ALT), average length of leaves (ALL), average number of nodes per tiller (ANNT), average internodes distance (AID), number of leaves per tiller (NLT), root length (RT) and the length of the smallest tiller (LST)) of *Brachypodium hybridum* samples from Tunisia

	Vegetative traits													Average
	D2L	NT	LGT	LST	ALT	ALL	ANNT	AID	NLT	RL	MAP			
Mean	22.709	26.081	81.947	31.468	47.051	8.498	7.899	7.349	8.405	21.368	15.195			
Standard deviation	3.124	9.81	14.459	11.322	11.635	6.013	1.851	4.984	1.3	4.362	5.008			
CV	0.138	0.376	0.176	0.36	0.247	0.708	0.234	0.678	0.155	0.204	0.33			
Per cent of variation (%)	13.80	37.60	17.60	36	24.70	70.80	23.40	67.80	15.50	20.40	33	32.78		
H^2	0.563	0.896	0.866	0.814	0.773	0.9	0.893	0.026	0.759	0.47	0.799	0.7		
Q_{ST}	0.349	0.533	0.401	0.481	0.506	0.783	0.652	0.069	0.521	0.204	0.347	0.44		
Altitudinal effect (P)	0.082	0	0.092	0.166	0.003	0.273	0	0.003	0	0.024	0	0		

it was slightly higher for reproductive traits (34.8%) 187
 than for vegetative traits (32.8%). It is worth noting that, 188
 at the species level, spikelet length was the most 189
 variable (95.6%), followed by ALL, AID and ALSL with 190
 CV ranging from 40.6 to 70.8%. The remaining traits 191
 showed narrow variation which did not exceed 0.4. 192
 The least amount of variation was observed for the 193
 days to the second leaf emergence (CV= 0.138). 194

At the population level, most traits showed a broad 195
 range of variation among populations except for the 196
 ALL and the average of internode distances, which 197
 showed a wide range of variation between populations 198
 (from 7.3 and 10.2% in Ain Draham to 139.1 and 199
 110.6% in Sejnem, respectively) and for the ALL, which 200
 varied between 9.3% in Jbel Zagouan and 144% in 201
 El Kef (Table 4). The same results were obtained for all 202
 traits in the studied ecoregions. The majority of traits 203
 showed high heritability (>0.3) with lowest border 204
 value for ALS and a mean value across traits of 0.64. 205
 Traits which showed highest heritability were: 206
 NT (0.89), LGT (0.86), LST (0.81), ALT (0.77), ANNT 207
 (0.89), NLT (0.75), MAP (0.79), MS (0.77), ANSS 208
 (0.79), DH (0.74) and ANSI (0.86). Overall, high 209
 values of heritability were observed for most vegetative 210
 descriptors (average of 0.7) and low values for repro- 211
 ductive ones (average of 0.54). The average heritability 212
 of all the quantitative traits was 0.64, which indicates 213
 that a large proportion of the phenotypic variance 214
 was conserved from generation to generation. 215
 Pearson's correlation coefficients for agro-morpho- 216
 logical traits showed that the most significant and 217
 negative correlations were between the DH and the 218
 majority of traits related to plant height (LGT, LST, ALT, 219
 ALL and ADBS) and biomass production (MAP and 220
 ANSS), whereas the most positive and significant 221
 correlations were among traits related to plant height 222
 and tiller and inflorescence length: LST-ALT ($r=0.855$, 223
 $P<0.001$), LGT-ALT ($r=0.782$, $P<0.001$), LGT-LST 224
 ($r=0.74$, $P<0.001$), ANNT-NLT ($r=0.587$, $P<0.001$), 225
 ANNSI-NLT ($r=0.491$, $P<0.001$), ANNT-ADBS 226
 ($r=0.368$, $P<0.001$), ANSS-ADBS ($r=0.366$, 227
 $P<0.001$), ANSIANNT ($r=0.359$, $P<0.001$) NT-D2L 228
 ($r=0.322$, $P<0.001$) and MS-MAP ($r=0.300$, 229
 $P<0.001$) (Table 5) which indicate that different 230
 plant organs grow synchronously and that NLT is 231
 indicative of the number of spikelets per inflorescence. 232

Structure of morpho-phenologic variation 233

Nested ANOVA showed that, for most characters, 234
 within-population variance was greater than that 235

Table 3. Mean values, standard deviation, coefficient of variation, % of variation, Heritability (H^2), coefficient of morphologic diversity (Q_{ST}) and altitudinal effect (class 1: from 0 to 80 m, class 2: from 80 to 400 m and class 3: >400 m) on the reproductive traits (mass of spikelets (MS), average length of spikelet (ALS), average distance between spikelets (ADBS), average number of spikelets per inflorescence (ANSI), heading date (DH), average length of inflorescence (ALI) and average number of seeds per spikelet (ANSS)) of *Brachypodium hybridum* samples from Tunisia

	Reproductive traits							Average
	MS	ALS	ADBS	ANSS	HD	ALI	ANSI	
Mean	8.649	2.81	1.232	11.581	75.538	8.079	5.876	
Standard deviation	1.626	2.687	0.47	2.048	10.744	3.279	1.074	
CV	0.188	0.956	0.381	0.177	0.142	0.406	0.183	
Per cent of variation (%)	18.80	95.60	38.10	17.70	14.20	40.60	18.30	34.76
H^2	0.775	0.024	0.603	0.791	0.743	0	0.866	0.54
Q_{ST}	0.454	0.0272	0.398	0.462	0.604	0.086	0.364	0.34
Altitudinal effect (P)	0	0	0.482	0.153	0	0.576	0	

236 among populations. In fact, ALT, ANNT and DH
237 were dominated by the inter-populations component
238 (>0.50 of the total variation). NT, LST, NLT, MS
239 and ANSS showed equal levels of intra- and inter-
240 population variations. The remaining traits were domi-
241 nated by the intra-population component (Fig. 2).

242 Inter-population variation

243 Analysis of population and family-within-population
244 variation shows that both population and family
245 have a significant effect for almost all measured traits
246 ($P < 0.001$). The components of variance were used
247 to estimate the inter-populations differentiation (Q_{ST}),
248 which varied according to measured traits ranging
249 from 0.027 for ALS to 0.78 for ALL with an average
250 of 0.402 (Tables 2 and 3). Pairwise Q_{ST} showed that
251 the highest differentiation among populations was
252 registered between Ain Draham and Jbel Zaghouan
253 (0.61) and the smallest was between Haouria and
254 Raoued ($Q_{ST} = 0.1$). Overall, Ain Draham differen-
255 tiated most from the rest of populations (Table 6).

256 Altitudinal variation

257 Although nested ANOVA (population within altitude
258 classes) indicated statistically significant variation be-
259 tween classes for 11 traits (Tables 2 and 3), decompo-
260 sition of variance showed that altitude explains a part
261 of total variation for only MS, MAP and ANNT. These
262 traits should be considered the most affected by
263 altitude in *B. hybridum*.

Principal component analysis

264
265 The 18 morphological characters were subjected to
266 PCA. The first three components, with Eigenvalues
267 greater than unity, explained 0.47 of the total variation
268 among populations for the 18 quantitative traits.

269 The relative magnitude of Eigenvectors from the
270 first component (0.23) indicated that LGT, LST, ALT,
271 ANSS, ADBS and DH were the most important
272 characters. In the second component (0.14), predomi-
273 nant characters were ALL, ANNT, NLT and ANSI,
274 while the third component (0.11) described variation
275 in characters that were related to speed of growth (D2L)
276 and biomass (MS). The second factor reflected the
277 traits of vegetative organs, while the first and the third
278 factors reflected the traits of reproductive organs. The
279 two-dimensional plots of PCA showing the overall
280 morphological variation of the 145 *B. hybridum*
281 lines are depicted in Fig. 3. The PCA plots show
282 that the lines originating from Enfidha, Fayedh and
283 Ain Draham form three different groups, while the
284 other lines are found in an extensive overlap around
285 the origin, which suggests that these three populations
286 display the highest levels of variation. The minimal
287 separation among the three groups was due mainly
288 to the first and second components. These results
289 were confirmed by a PCA analysing the variation
290 among populations. Based on PCA analysis for
291 populations, Fayadh (0.77), Enfidha (0.70) and Ain
292 Draham (0.62) were the most morphologically vari-
293 able populations, whereas Jbel Zaghouan (0.06)
294 was the population with the smallest cumulative
295 variance.

Table 4. Coefficients of variation for all the characters analysed in each population

	Vegetative traits											Traits related to reproduction or to seed production								
	D2L	NT	LGT	LST	ALT	ALL	ANNT	AID	NLT	RL	MAP	Av.	MS	ALS	ADBS	ANSS	DH	ALI	ANSI	Av.
Ain Drahem	0.040	0.143	0.136	0.186	0.106	0.273	0.111	0.102	0.116	0.245	0.296	0.159	0.145	0.173	0.164	0.126	0.064	0.088	0.000	0.109
Enfidha	0.093	0.223	0.162	0.309	0.195	0.138	0.094	0.133	0.106	0.170	0.170	0.163	0.168	1.134	0.275	0.182	0.066	0.906	0.068	0.400
Fayedh	0.104	0.251	0.153	0.287	0.144	0.209	0.214	0.181	0.231	0.222	0.190	0.199	0.166	0.143	0.250	0.079	0.129	0.094	0.136	0.143
Haouania	0.079	0.321	0.168	0.308	0.218	0.161	0.206	0.211	0.125	0.187	0.255	0.204	0.156	0.234	0.213	0.155	0.120	0.136	0.182	0.171
El Kef	0.118	0.233	0.147	0.409	0.229	0.178	0.120	0.171	0.147	0.092	0.195	0.186	0.092	1.440	0.346	0.095	0.086	0.123	0.087	0.324
Raouad	0.099	0.371	0.123	0.181	0.119	1.391	0.123	1.002	0.097	0.243	0.297	0.368	0.162	1.322	0.171	0.103	0.109	0.104	0.169	0.306
Sejnen	0.108	0.201	0.125	0.153	0.198	0.073	0.090	1.106	0.088	0.118	0.328	0.235	0.213	0.164	0.343	0.122	0.092	0.164	0.129	0.175
Douar El Hej Wniss	0.163	0.288	0.163	0.267	0.213	0.986	0.146	0.149	0.000	0.200	0.301	0.261	0.129	0.199	0.281	0.167	0.064	0.187	0.230	0.180
Jbel Zaghouan	0.080	0.118	0.135	0.241	0.163	0.106	0.091	0.149	0.000	0.161	0.229	0.134	0.104	0.098	0.236	0.116	0.135	0.174	0.107	0.139
CV (%)	0.098	0.238	0.145	0.260	0.176	0.390	0.132	0.356	0.101	0.182	0.251	0.212	0.148	0.545	0.253	0.127	0.096	0.219	0.123	0.216

at population level
Av., average.

Table 5. Pearson correlations between the 18 traits analysed. Values in bold type are significant at P=0.05

	D2L	NT	LGT	LST	ALT	ALL	ANNT	AID	NLT	RL	MAP	MS	ALS	ADBS	ANSS	DH	ALI	ANSI
D2L	1																	
NT	0.322	1																
LGT	-0.060	-0.151	1															
LST	-0.073	-0.086	0.741	1														
ALT	-0.116	-0.077	0.702	0.855	1													
ALL	-0.059	-0.051	0.214	0.108	0.064	1												
ANNT	0.025	-0.147	0.222	0.157	0.149	0.280	1											
AID	-0.087	-0.186	0.134	0.261	0.211	-0.007	-0.250	1										
NLT	0.154	-0.012	-0.023	-0.195	-0.139	0.268	0.587	-0.339	1									
RL	-0.174	-0.134	-0.050	-0.126	-0.038	-0.038	0.101	-0.036	0.225	1								
MAP	-0.149	0.059	-0.048	-0.077	0.009	0.032	-0.272	0.068	-0.171	0.001	1							
MS	-0.237	-0.120	-0.134	-0.120	-0.053	-0.108	-0.197	0.042	-0.104	0.066	0.300	1						
ALS	-0.184	-0.118	0.009	0.046	0.040	0.047	-0.062	0.045	-0.193	-0.036	0.139	0.191	1					
ADBS	-0.080	-0.287	0.222	0.184	0.131	0.242	0.368	0.008	0.183	0.227	-0.097	0.050	0.128	1				
ANSS	-0.086	-0.139	0.169	0.204	0.156	0.028	0.153	0.020	0.045	0.211	-0.026	0.143	0.053	0.366	1			
DH	0.165	-0.039	-0.391	-0.441	-0.463	-0.144	-0.030	-0.043	0.052	-0.043	-0.165	-0.049	-0.078	-0.184	-0.312	1		
ALI	0.022	-0.068	0.083	0.143	0.125	0.138	0.146	0.013	-0.046	0.097	-0.139	-0.115	0.020	0.209	0.178	-0.211	1	
ANSI	-0.075	-0.068	-0.023	-0.124	-0.151	0.305	0.359	-0.227	0.491	0.072	-0.143	-0.059	-0.056	0.295	0.132	-0.049	0.189	1

Table 6. Matrix of Q_{ST} for each pairwise combination of *Brachypodium hybridum* populations (F, Fayedh; K, El Kef; R, Raouad; H, Hawaria; E, Enfidha; Z, Jbel Zaghouan; D, Douar El Hej Wniss; S, Sejnen; A, Ain Drahem)

	A	E	F	H	K	R	S	D	Z
A	0								
E	0.52	0							
F	0.58	0.40	0						
H	0.40	0.31	0.34	0					
K	0.43	0.37	0.43	0.12	0				
R	0.34	0.30	0.36	0.10	0.19	0			
S	0.44	0.25	0.33	0.20	0.16	0.20	0		
D	0.29	0.23	0.42	0.18	0.20	0.27	0.18	0	
Z	0.61	0.32	0.41	0.28	0.35	0.27	0.34	0.21	0

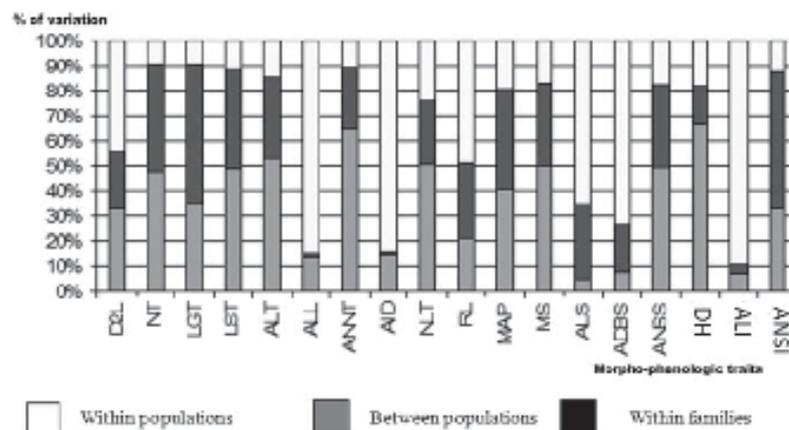


Fig. 2. Hierarchical decomposition of total phenotypic variance components (%) for all morpho-phenological traits derived from nested ANOVA (between populations, within populations and within families) in *Brachypodium hybridum*.

296 Cluster analysis

297 On the basis of Euclidean distances, the hierarchical
 298 cluster analysis was used to examine the aggregation
 299 patterns of 145 *Brachypodium* lines. Three UPGMA
 300 dendrograms were generated; the first was based on
 301 the morphological dissimilarity of the vegetative traits,
 302 the second on the dissimilarity of the reproductive
 303 traits and the third included all the morphological data.
 304 The three dendrograms showed similar patterns of
 305 clustering. In fact, the 145 lines fell into three hetero-
 306 geneous groups without any clear geographically
 307 dependent pattern (Fig. 4). By analysing vegetative
 308 traits alone, the lines originating from Enfidha and Jbel
 309 Zaghouan were clustered together in the first group,
 310 the second group clustered lines originating from
 311 Raoued, Douar El Hej Wniss, Sejnen, Haouaria and
 312 El Kef, whereas Ain Drahem and Fayedh lines were set
 313 apart in cluster 3. When analysing reproductive traits

alone, the same tendency of clustering was found as 314
 that obtained using vegetative traits, except for lines 315
 originating from Sejnen which clustered with those 316
 originating from Enfidha and Zaghouan. 317

The non-relatedness between the morphological 318
 variation and geographic distances was confirmed by a 319
 Mantel test, which revealed a positive, but not significant, 320
 relationship between among-population pheno- 321
 typic differentiation (Q_{ST}) and geographic distance. 322
 Moreover, the correlation analysis of population 323
 phenotypic diversity and altitude showed a significant 324
 negative relationship ($r = -0.262, P < 0.05$). 325

DISCUSSION 326

Morpho-phenologic variation 327

One hundred and forty-five Tunisian *Brachypodium* 328
hybridum lines, collected from nine locations 329

8 M. Neji et al.

Fig. 3 - Colour on line, B/W in print

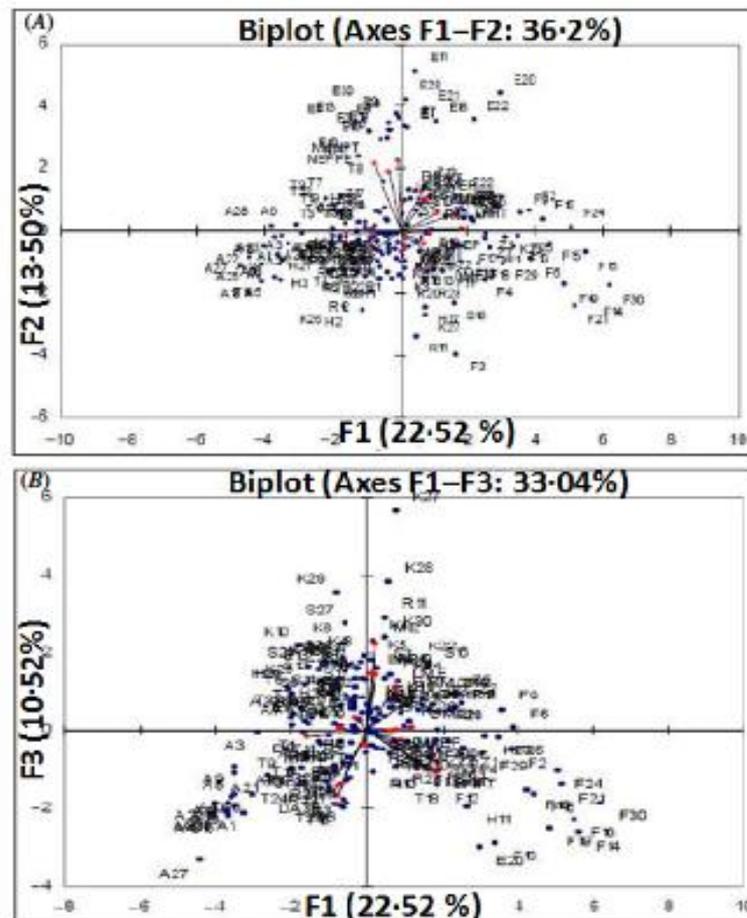


Fig. 3. Principal component analysis of the studied *Brachypodium hybridum* lines (A, axes 1 and 2; B, axes 1 and 3).

330 representing six ecoregions and various altitudes in
 331 the north and the centre of the country, were used
 332 to analyse phenotypic diversity. Eighteen morpho-
 333 phenological characters were used to generate valu-
 334 able information on the studied traits, on the natural
 335 populations and ecoregions and altitude.

336 The current study detected substantial variation
 337 and important heterogeneity for populations and eco-
 338 regions based on vegetative and reproductive traits.
 339 These variations were essentially related to plant
 340 vigour, biomass and seed production, suggesting that
 341 the structure of quantitative traits in natural Tunisian
 342 *B. hybridum* populations was influenced by environ-
 343 mental factors so that the degree of trait variation
 344 differs according to the region where seeds were col-
 345 lected. This agrees with previous studies which

showed that the closely related diploid species 346
B. distachyon was morphologically highly variable 347
 (Draper et al. 2001; Filiz et al. 2009; Vogel et al. 2009; 348
 Schwartz et al. 2010; Jaroszewicz et al. 2012). 349
 Jaroszewicz et al. (2012) found a high morphological 350
 variation not only in quantitative traits but also in some 351
 developmental characteristics, such as the fragility of 352
 the spikelet rachis, the hairiness of the lemma and 353
 the accumulation of assimilates in the endosperm. The 354
 observed variation was not homogeneous across 355
 populations and characters in the *B. hybridum* lines 356
 of the current study. For instance, lines from Fayedh 357
 and Jbel Zaghouan were highly variable for plant 358
 height, leaf length and phenological traits while those 359
 from Sejnén were significantly different for biomass 360
 and grain yield. This finding is in agreement with many 361

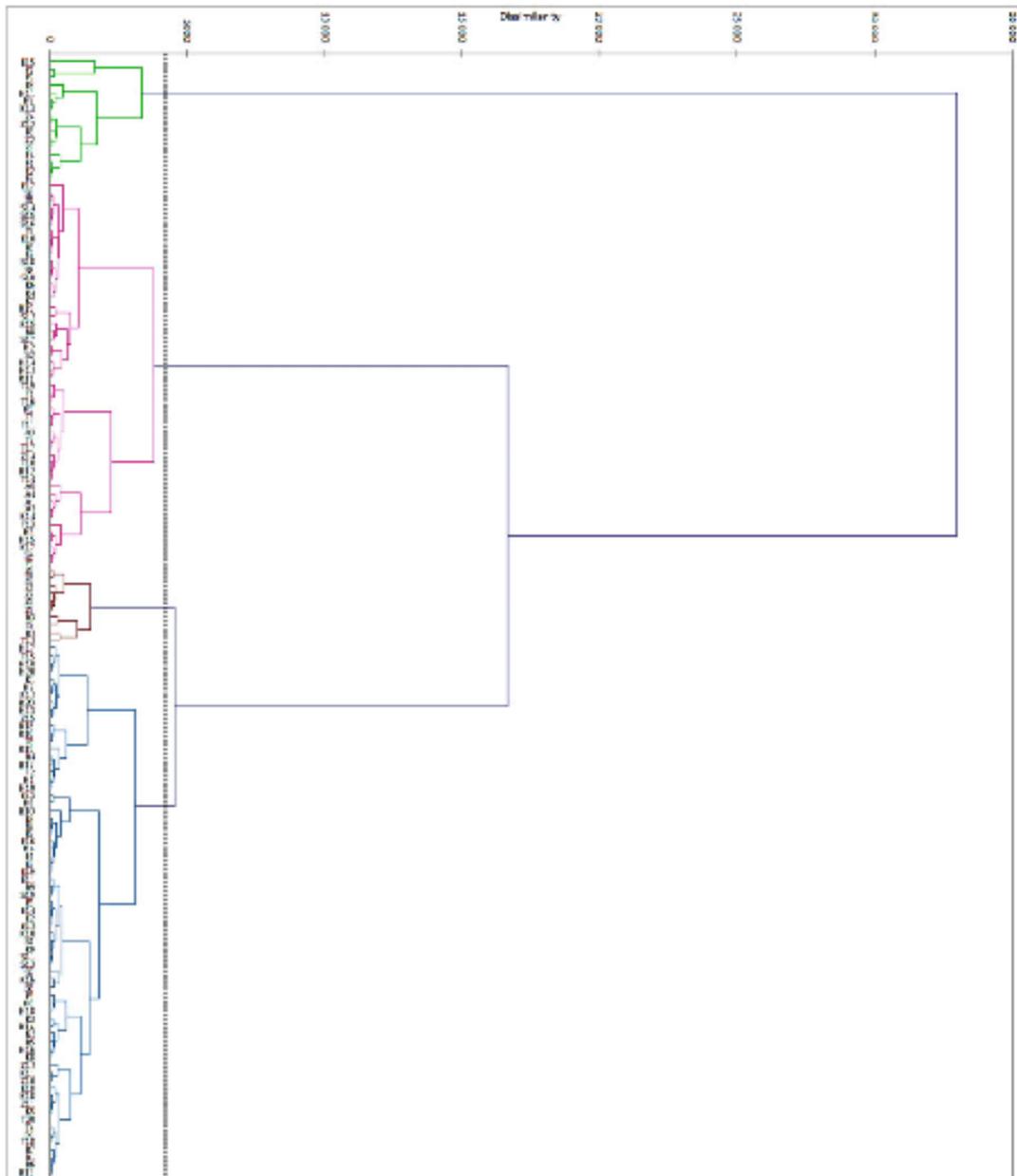


Fig. 4 - Colour online, B/W in print

Fig. 4. Cluster analysis of the 145 studied lines based on Euclidean distances (all the morphological data (vegetative and reproductive traits)).

362 works concerning *Poaceae* species (Ketema 1993;
 363 Asefa et al. 1999, 2001, 2003; Tefera et al. 2003;
 364 Chanyalew et al. 2009).

365 Estimates of variance components among popu-
 366 lations showed that genetic variance was higher

than environmental variance and consequently 367
 had a relatively high average of heritability. Generally 368
 the heritability pattern showed high estimates for 369
 most traits, which are important from the farmer's 370
 point of view in regions suitable for agricultural 371

372 production and diversified culture. When characters
 373 related to biomass production are considered (i.e.
 374 the greatest variation was recorded for tillers and
 375 leaves, and the smallest for seeds), the current results
 376 suggest that the reproductive organs are the stable
 377 characters, and the vegetative organs were sig-
 378 nificantly affected by local conditions such as cli-
 379 mate and soil. This agrees with the high level of
 380 heritability for agro-morphological traits recorded in
 381 the model grass *Oryza sativa* L. (Fahliani et al. 2010;
 382 Nascimento et al. 2011). Significant variation with
 383 respect to different altitude classes in Tunisian
 384 *B. hybridum* and high heritability for MS, MAP
 385 and ANNT indicated the presence of substantial vari-
 386 ation in the germplasm and a possibility of selection
 387 response in these traits. The same result was reported
 388 for days to heading in barley (Esparza-Martínez &
 389 Foster 1998).

390 Decomposition of variation among and within
 391 population indicated that on average 0.40 of the
 392 differentiation was recorded among populations and
 393 0.60 within populations. Such a result is expected
 394 with regard to the autogamous breeding system of
 395 *B. distachyon* s.l and confirms the lack of inter-crossing
 396 pollination (Vogel et al. 2009). This finding does not
 397 agree with that presented by Filiz et al. (2009) using
 398 AFLP markers and Turkish natural populations of
 399 *B. distachyon* but is in accordance with that found
 400 by Mahjoub et al. (2012) in Tunisian natural popu-
 401 lations of *Aegilops geniculata* Roth (Poaceae) using
 402 RAPD markers (0.80 of within-population variation)
 403 and Ehtemam et al. (2009) in *Triticum* species in Iran.
 404 The high level of within-population diversity could be
 405 also explained by fluctuations in macroclimate para-
 406 meters. In Tunisia, climate is characterized by con-
 407 siderable changes in temperature, rainfall distribution
 408 and soil moisture (Zribi et al. 2010). This finding was
 409 corroborated by a Mantel test, which showed no
 410 significant correlation between population morpho-
 411 logical differentiation (Q_{ST}) and geographical distan-
 412 ces. The observed results are comparable to the
 413 previous findings of Filiz et al. (2009), based on AFLP
 414 genotyping of 1500 individual *B. distachyon* plants,
 415 Vogel et al. (2009) based on phenotypic characteriza-
 416 tion and SSR genotyping of 187 lines from 56 Turkish
 417 *B. distachyon* locations and Jaroszewicz et al. (2012)
 418 based on *B. distachyon* s.l morphological traits and
 419 RAPD markers.

420 The current study showed that the pheno-
 421 morphological and agronomic traits used are useful
 422 tools for genotyping natural population of *B. hybridum*

and identifying the most important descriptors 423
 for detecting variation both among and within 424
 populations. 425 Q3

REFERENCES

ASSEFA, K., KETEMA, S., TEFERA, H., NGUMEN, H. T., BLUM, A., 426
 AYELE, M., BAJ, G., SIMANE, B. & KEFYALEW, T. (1999). 427
 Diversity among germplasm lines of the Ethiopian cereal 428
tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Euphytica* **106**, 87–97. 429

ASSEFA, K., TEFERA, H., MERKE, A., KEFYALEW, T. & HUNDERA, F. 430
 (2001). Variability, heritability and genetic advance in 431
 pheno-morphic and agronomic traits of *tef* [*Eragrostis tef* 432
 (Zucc.) Trotter] germplasm from eight regions of Ethiopia. 433
Hereditas **134**, 103–113. 434

ASSEFA, K., MERKE, A. & TEFERA, H. (2003). Multivariate 435
 analysis of diversity of *tef* [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] 436
 germplasm from western and southern Ethiopia. *Hereditas* 437
138, 228–236. 438

BIKILJACIC, J., GROTEWOLD, E., SCHOLL, R., MÖCKLER, T., 439
 GARVIN, D. F., VAN, P., BRUNELL, T., SIBOUT, R., BEVAN, M., 440
 BUDAK, H., CAKEDO, A. L., GAO, C., GU, Y., HAZEN, S. P., 441
 HOIT, B. F., HONG, S. Y., JORDAN, M., MANZANEDA, A. J., 442
 MITCHELL-OLDS, T., MOCHIDA, K., MUIR, L. A. J., PARK, C. M., 443
 SEDBROOK, J., WAIT, M., ZHENG, S. J. & VOGEL, J. P. (2011). 444
Brachypodium as a model for the grasses: today and the 445
 future. *Plant Physiology* **157**, 3–13. 446

CATALÁN, P., MÜLLER, J., HASTEROK, R., JENKINS, G., MUIR, L. A., 447
 LANGDON, T., BETEGHTIN, A., SIWINSKA, D., PIMENTEL, M. & 448
 LÓPEZ-ALVAREZ, D. (2012) Evolution and taxonomic split 449
 of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of* 450
Botany **109**, 385–405. 451

CHANYALEW, S., TEFERA, H. & SINGH, H. (2009). Genetic 452
 variability, heritability, and trait relationships in recombi- 453
 nant inbred lines of *tef* [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. 454
Research Journal of Agriculture and Biological Sciences **5**, 455
 474–479. 456

DRAPER, J., MUIR, L. A. J., JENKINS, G., GHOSH-BISWAS, G. C., 457
 BABLAK, P., HASTEROK, R. & ROUTLEDGE, A. P. M. (2001). 458
Brachypodium distachyon: a new model system for 459
 functional genomics in grasses. *Plant Physiology* **127**, 460
 1539–1555. 461

EHEMAM, M. H., RAHIMINEJAD, M. R., SAEDI, H., SAYED 462
 TABATABAEI, B. E., KRATTINGER, S. & KELLER, B. (2009). The 463
 relationships among the A genome bearing *Triticum* 464
 species as evidenced by SSRs in Iran. *Wheat Information* 465
Service **108**, 33. 466

ESPARZA-MARTÍNEZ, J. H. & FOSTER, A. E. (1998). Genetic 467
 analysis of days to flowering and other characteristics of 468
 two-rowed barley. *Agricultura –Técnica en México* **24**, 469
 131–144. 470

FAHLIANI, R. A., KHODAMBASHI, M. & HOUSHMAND, S. (2010). 471
 Estimation of the heritability of agro-morphological traits 472
 in rice (*Oryza sativa* L.) using F2:3 families. *African Journal* 473
of Agricultural Research **5**, 1297–1303. 474

FILIZ, E., ÖZDEMİR, B. S., BUDAK, F., VOGEL, J. P., TUNA, M. & 475
 BUDAK, H. (2009). Molecular, morphological, and cytologi- 476
 cal analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred 477
 lines. *Genome* **52**, 876–890. 478

	Morpho-phenological diversity of <i>B. hybridum</i>	11
479	HAMMAMI, R., JOUVE, N., CUADRADO, A., SOLER, C. & GONZALEZ, J.M. (2011). Prolamin storage proteins and allopolyploidy in wild populations of the small grass <i>Brachypodium distachyon</i> (L.) P. Beauv. <i>Plant Systematics and Evolution</i> 297 , 99–111.	516
480		517
481		518
482		519
483		520
484	International Brachypodium Initiative (IBI) (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass <i>Brachypodium distachyon</i> . <i>Nature</i> 463 , 763–768.	521
485		522
486		523
487	JAROSZEWICZ, A. M., KOSINA, R. & STANISZEWICZ, P. R. (2012). RAPD, karyology and selected morphological variation in a model grass, <i>Brachypodium distachyon</i> . <i>Weed Research</i> 52 , 204–216.	524
488		525
489		526
490		527
491	JALIHAR, P. P. (2006). Modern biotechnology as an integral supplement to conventional plant breeding: the prospects and challenges. <i>Crop Science</i> 46 , 1841–1859.	528
492		529
493		530
494		531
495	KETEMA, S. (1993). <i>Tef (Eragrostis tef) Breeding, Genetic Resources, Agronomy, Utilization and Role in Ethiopian Agriculture</i> . Addis Ababa, Ethiopia: Institute of Agricultural Research.	532
496		533
497		534
498		535
499	LÓPEZ-ALVAREZ, D., LÓPEZ-HERRANZ, M. L., BETEHTIN, A. & CATALÁN, P. (2012). A DNA barcoding method to discriminate between the model plant <i>Brachypodium distachyon</i> and its close relatives <i>B. stacei</i> and <i>B. hybridum</i> (Poaceae). <i>PLoS ONE</i> 7 , e51058. doi: 10.1371/journal.pone.0051058	536
500		537
501		538
502		539
503		540
504		541
505	MAHJOUR, A., MGLIS, K., ROUAISSI, M., ABDELLAOUI, R. & BEN BRAHIM, N. (2012). RAPD analysis of genetic diversity in natural populations of <i>Aegilops geniculata</i> Roth and <i>Triticum durum</i> Desf from Tunisia. <i>Agriculture and Biology Journal of North America</i> 3 , 466–475.	542
506		543
507		544
508		545
509		546
510	MANTEL, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. <i>Cancer Research</i> 27 , 209–220.	547
511		548
512		549
513	MORGAN, K. K., HICKS, J., SPITZE, K., LATA, L., PFRENDER, M. E., WEAVER, C. S., OTTONE, M. & LYNCH, M. (2001). Patterns of genetic architecture for life-history traits and molecular markers in a subdivided species. <i>Evolution</i> 55 , 1753–1761.	550
514		551
515		552
		553
	NASCIMENTO, W. F. DE, SILVA, E. F. DA & VEASEY, E. A. (2011) Agro-morphological characterization of upland rice accessions. <i>Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)</i> 68 , 652–660.	516
		517
		518
		519
		520
		521
	PAULIAR, D. I. (2009). Turning a wild plant into a model – a déjà vu story. <i>Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca</i> 37 , 17–24.	522
		523
		524
	QI, L., FRIESE, B., ZHANG, P. & GILL, B. S. (2007). Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. <i>Chromosome Research</i> 15 , 3–19.	525
		526
		527
	SCHWARTZ, C. J., DOYLE, M. R., MANZANEDA, A. J., REY, P. J., MITCHELL-OLDS, T. & AMASINO, R. M. (2010). Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in <i>Brachypodium distachyon</i> . <i>Bioenergy Research</i> 3 , 38–46.	528
		529
		530
		531
		532
	SPITZE, K. (1993). Population structure in <i>Daphnia obtusa</i> : quantitative genetic and allozymic variation. <i>Genetics</i> 135 , 367–374.	533
		534
		535
	TEFERA, H., ASSEFA, K., HUNDERA, F., KEFYALEW, T. & TEFERRA, T. (2003). Heritability and genetic advance in recombinant inbred lines of tef (<i>Eragrostis tef</i>). <i>Euphytica</i> 131 , 91–96.	536
		537
		538
	TRETHOWAN, R. M. & MUJEEB-KAZI, A. (2008). Novel germplasm resources for improving environmental stress tolerance of hexaploid wheat. <i>Crop Science</i> 48 , 1255–1265.	539
		540
		541
	VOGEL, J. P., TUNK, M., BUDAK, H., HUO, N., GU, Y. Q. & STEINWAND, M. A. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of <i>Brachypodium distachyon</i> . <i>BMC Plant Biology</i> 9 , 88. doi: 10.1186/1471-2229-9-88.	542
		543
		544
		545
		546
	ZIBIS, M., ANGUELA, T. P., DUCHEMIN, B., LIU, Z., WAGNER, W., HASENALER, S. & CHEHBOUNI, A. (2010). Relationship between soil moisture and vegetation in the kairouan plain region of Tunisia using low spatial resolution satellite data. <i>Water Resources Research</i> 46 , W06508. doi: 10.1029/2009WR008196.	547
		548
		549
		550
		551
		552
		553

Chapitre III

Analyse de la diversité et la structure génétique des populations tunisiennes de *Brachypodium hybridum* à l'aide des marqueurs microsatellites

I- Introduction

D'un point de vue général, la caractérisation de la variabilité phénotypique et la connaissance de la diversité et de la structure génétique est un enjeu primordial pour les espèces que l'on souhaite étudier à des fins d'amélioration à travers la connaissance et la caractérisation des ressources génétiques potentiellement disponibles. En effet, dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une grande variation phénotypique au sein et entre les populations tunisiennes de *B. hybridum*. Nous avons aussi montré que la différenciation morphologique entre les populations n'est pas liée ni aux distances géographiques ni aux différences altitudinales (test de Mantel). Ces résultats suggèrent que la structure de la variation de *Brachypodium hybridum* est gouvernée par l'effet d'un grand flux de gènes par la dispersion des grains entre les populations et un effet de sélection naturelle globale. Dans le but de disséquer les bases moléculaires de la diversité existante, la variabilité phénotypique est souvent suivie par une caractérisation moléculaire à l'aide des marqueurs génétiques neutres vis-à-vis des fluctuations de l'environnement. Les SSR sont considérés comme les marqueurs nucléaires les plus puissants pour estimer : la diversité génétique au sein des espèces (Garner *et al.* 2004), le mode de dispersion (Newman et Squire, 2001), la taille efficace des populations (Rowe et Beebe, 2004), le flux de gènes intra et interspécifique (Babik *et al.* 2003) et pour assigner des individus à leur population d'origine la plus probable (Kim *et al.* 2008).

En raison de la disponibilité d'un large panel des SSR développés chez l'espèce voisine *B. distachyon*, notre premier choix a porté sur 15 des microsatellites développés par Vogel et al (2009).

Les principaux objectifs de l'étude de *B. hybridum* en Tunisie sont :

- 1- la caractérisation de la variabilité génétique intra et inter populations à l'aide des marqueurs SSR.
- 2- l'analyse de l'organisation spatiale de la diversité génétique ainsi que les flux de gènes entre les populations.
- 3- l'établissement des différents facteurs influençant la structure génétique de cette espèce en Tunisie.

II- Aperçu sur la méthodologie et les analyses adoptées

Dans ce chapitre, les 145 lignées de *B. hybridum* déjà étudiées morphologiquement ont été analysées par 15 marqueurs microsatellites. La diversité génétique au sein de ces populations a été évaluée par diverses approches statistiques à savoir l'analyse de variance moléculaire (AMOVA), les descripteurs génétiques de chaque population (nombre moyen d'allèles par locus (N_a et N_e), taux de polymorphisme (P), taux moyen d'hétérozygotie observé (H_o), taux moyen d'hétérozygotie attendu (H_e), indice de fixation F_{IS}) et taux de flux génique inféré par la méthode des allèles privés. Afin d'analyser la structure génétique des populations, les données ont été soumises à différentes analyses multivariées, à savoir l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC), la classification hiérarchique et l'approche bayésienne de classification. L'effet des distances géographiques et des différences altitudinales sur la structure des populations a été évalué par le test de Mantel.

III- Principaux résultats

Les analyses portées sur les 15 SSR ont révélé une variation génétique relativement importante avec 100 % de polymorphisme et un nombre total d'allèles de 159 (avec une moyenne de 8.6 allèles par locus). Une variation intra-population relativement importante a été révélée avec un indice de diversité génétique moyenne (H_e) de 0,79 et un taux moyen d'hétérozygotie (H_o) de 0,31. Ce niveau élevé de diversité intra-population est accompagné d'une différence non significative entre populations indiquant une continuité homogène de la variation génétique. L'importance du flux de gène ($N_m = 2,31$) et la très faible différenciation génétique moyenne entre populations ($\Phi_{PT} = 0,023$) indiquent que la diversité chez *B. hybridum* réside au niveau intra-population (97%) et qu'un niveau d'échange de gènes assez important se réalise entre les populations. L'analyse de différenciation génétique par paire de populations souligne la quasi absence de structuration géographique. En conséquence, le dendrogramme UPGMA basé sur les distances génétiques de Nei et l'analyse factorielle des correspondances suggèrent que les 9 populations étudiées sont groupées en trois unités génétiques distinctes sans une structuration géographique particulière, parfaitement en adéquation avec l'analyse bayésienne réalisée par le programme STRUCTURE. De plus, le test de Mantel a dévoilé que la structure génétique des populations tunisiennes de *B. hybridum* n'est pas liée ni aux distances géographiques ($r=0.046$; $p=0.78$) ni aux différences d'altitudes

($r=-0.29$; $p=0.75$). Tous ces résultats convergent et suggèrent que le flux génique par l'intermédiaire d'une dispersion des graines ou pollen à longues distances joue un rôle majeur dans la répartition de la diversité génétique chez *B. hybridum* en Tunisie.

Globalement, les analyses effectuées par les marqueurs microsatellites ont une grande utilité pour l'évaluation de diversité et la structure génétique des populations naturelles de *B. hybridum* en Tunisie. Dans l'ensemble les résultats obtenus sont en accord avec ceux fournis par la caractérisation morpho-phénologique. Ils indiquent que les populations étudiées montrent une diversité génétique satisfaisante qui pourrait être exploitée comme base pour établir des programmes et des actions de gestion durable de l'espèce. Néanmoins, compte tenu de la prédominance de la variabilité génétique intra-population par rapport à celle entre les populations, il serait intéressant d'examiner la variabilité génétique à l'échelle des populations en augmentant le nombre de marqueurs SSR ou en utilisant d'autres marqueurs moléculaires. Le choix a porté sur les marqueurs InDels comme une approche moléculaire supplémentaire pour apporter une meilleure connaissance sur la diversité et la structure génétique des populations tunisiennes de *B. hybridum*.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article soumis à international journal of plant sciences.

IV-Article

Assessment of genetic diversity and population structure of Tunisian populations of *Brachypodium hybridum* by SSR markers

Mohamed Neji¹⁻², Filippo Geuna², Wael Taamalli¹, Yosra Ibrahim¹, Remo Chiozzotto², Chedly Abdelly¹ and Mhemmed Gandour¹

¹ Laboratory of Extremophile Plants, Center of Biotechnology of Borj-Cédria, BP 901 Hammam Lif 2050 Tunisia.

² Laboratory of Molecular Genetics, Department of Agricultural and Environmental Sciences (DISAA), University of Milan, Via Celoria 2, 20133 Milan, Italy.

Corresponding author: gandourmed@yahoo.fr

Elsevier Editorial System(tm) for Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants

Title: Assessment of genetic diversity and population structure of Tunisian populations of *Brachypodium hybridum* by SSR markers

Article Type: Original Research

Keywords: *Brachypodium hybridum*, genetic diversity, polyploidy, altitudinal effect

Corresponding Author: Dr. Mhemmed Gandour,

Corresponding Author's Institution: CBBC

First Author: Mohamed Neji

Order of Authors: Mohamed Neji; Filippo Geuna; Wael Taamalli; Yosra Ibrahim; Remo Chiozzotto; Chedly Abdelly; Mhemmed Gandour

Abstract:

Premise of research: *Brachypodium hybridum* is recently recognized as allotetraploid specie deriving from natural hybridization between *B. distachyon* and *B. stacei*. The identification of this species which emerged as a new model for the polyploid species has spawned considerable scientific interest and a lot of investigations using highly variable markers and a broad geographical sampling are under way to understand the patterns of their genetic diversity and the contribution of polyploidy on adaptation. **Methodology:** As a step towards understanding the genetic basis for natural variation of this specie in Tunisia, 15 microsatellites markers and 145 genotypes representing 9 populations were used.

Pivotal results: Results exhibit high level of polymorphism (159 polymorphic alleles with an average of 8.6 alleles per locus) and high level of genetic diversity in all the studied populations with expected and observed heterozygosities averaged 0.79 and 0.31,

respectively. AMOVA resulted in a high variation within population (97 %) and altitude as compared to the variation among population (3%, $\Phi_{PT} = 0.23$), altitude and eco-region. Results displayed also that the 9 populations grouped into 3 major clusters without geographic clustering or altitudinal grouping. This grouping was accompanied by a high rate of gene flow between populations ($N_m = 2.31$). Interestingly, Mantel test identified that the extent of genetic differentiation was not correlated to the geographic distances ($r=0.046$; $p=0.78$) nor to the altitudinal differences ($r=-0.29$; $p=0.75$).

Conclusions: These findings show a high synteny between *B. hybridum* and *B. distachyon* and suggest that the genetic structure of the Tunisian populations of *B. hybridum* is subject to the combined effect of gene flow via long seed dispersal and natural selection.

Introduction

Cereal crops have been predominantly used as staple food around the globe since 10000 years ago (Brown et al., 2009). Indeed, this family is host to the most widely cultivated crops in the world such as wheat (*Triticum* spp.), rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), barley (*Hordeum vulgare*), and sorghum (*Sorghum bicolor*) and make up 56 % of the world's calories as food and 44 % for animal feed. However, the climate change impact, the increased demand for biofuels and the need to meet global food demand for the predicted growing population of 9 billion by 2050 require urgent improvement in cereal crop production (Tomlinson, 2011). In order to meet this challenge, a number of approaches are available to cereal scientists. Agricultural practices could be improved to increase the areas under cultivation and maximize production but this should be also coupled with significant improvements in the cereal gene pools (Rosegrant and Cline, 2003). The latter could come through exploitation of wild cereals via screens of crop lines that have been locally maintained through traditional farming (Newton et al. 2010). To enable molecular experiments with direct relevance for

temperate cereal crops, the wild grass *Brachypodium distachyon* - belonging to the *Pooideae* - is now being developed as a new model species. This grass has a small genome size, a short lifecycle (~ 6 weeks), undemanding growth requirements, and a working transformation system (Garvin *et al.*, 2008; Opanowicz *et al.*, 2008; Vogel and Hill, 2008; Alves *et al.*, 2009, Mur *et al.*, 2011; Catalan *et al.*, 2012). Although in the wake of the completed *B. distachyon* genome sequence (IBI, 2010), this species has received much of the attention, the *Brachypodium* genus encompasses diploids, polyploids, perennial and annual species. The majority of them are endemic of the Mediterranean region and one or more different species are found in other parts of the world including regions of Africa, Central and South America and Asia (Catalán and Olmstead, 2000). Until recently, roughly 18 *Brachypodium* species (15-18 species) have been described throughout the world (Catalán *et al.* 2014). However, because of the huge morphological variation within and between 1 *Brachypodium* species, their variable chromosome numbers and ploidy levels, the circumscription and taxonomy of this genus was not satisfactorily resolved and has varied considerably. A recent phylogenetic reassessment of the *B. distachyon* complex has provided two species named *B. stacei* ($2n=20$) and *B. hybridum* ($2n=30$) which are previously regarded as autotetraploid and autohexaploid cytotypes of the model species *Brachypodium distachyon* ($2n=10$) (Catalan *et al.*, 2012). The identification of these two species, in particular the *B. hybridum* which emerged as a new model for the polyploid species, has spawned considerable scientific interest and a lot of investigations using highly variable markers and a broad geographical sampling are under way to understand the patterns of their genetic diversity and the contribution of polyploidy on adaptation. *B. distachyon* complex (*B. distachyon*, *B. stacei* and *B. hybridum*) is native to Mediterranean region. However, the allotetraploid species *B. hybridum* seems to be the most widespread worldwide since it is known as an alien species in diverse worldwide regions such as California, Australia, South America and South Africa (López-Alvarez *et al.* 2012).

Therefore, the specific objectives of this study were: (i) To assess the extent of genetic diversity in *Brachypodium hybridum* accessions in respect to regions and altitude of collection. (ii) To estimate population differentiation and (iii) Detect sites of high allelic diversity for germplasm collection.

Materials and methods

Sampling scheme and cultural conditions

A total of 145 accessions of *B. hybridum* were collected from 9 natural populations spanning almost the entire distribution area of this species and representative of all the bioclimatic stages in Tunisia (Figure 1). The most distant populations were 250 km apart, whereas the two closest populations were at 35 km spaced. At each location, seeds of about 20 mother plants were randomly collected from each population. The neighboring individuals were at least 10 m apart to avoid sampling bias from related accessions. Sampling was undertaken between June and August 2010.

In October 2010, four seeds from each accession were sown in pots filled with 5 kg of filtered soil and watered with distilled water until germination. Seedlings were then irrigated every 2 days and fertilized once a week with a Hewitt nutrient solution (Hewitt, 1966). At thirty-day seedlings, a single plant from each line was chosen to collect fresh leaves for the DNA extraction. The other plants were cultivated in the same conditions until maturity for further analyses. Experiments were conducted in a greenhouse at the Center of Biotechnology of Borj Cedria, Tunisia.

DNA extraction and SSR analysis

The DNA was extracted from fresh leaves as described by Geuna et al. (2003). The DNA was resuspended in 50 μ L of distilled water and then tested for its quality and

concentration.

15 simple sequence repeats (SSR) from the 43 loci developed by Vogel *et al.*, (2009), were selected on the basis of their polymorphism and location in the chromosomes of *Brachypodium distachyon* and used to analyze the genetic diversity. PCR Reactions were carried out in a 20 μL reaction volume containing approximately 20 ng of genomic DNA, 2 μL of $10 \times$ reaction buffer (10 mmol L^{-1} Tris-HCl at pH 8.3 and 50 mmol L^{-1} KCl), 0.5 μL of each dNTP (10 mM), 0.8 μL of MgCl_2 (50 mM), 0.2 μL of 5'-M13-tailed forward primer (10 μM), 0.5 μL of the reverse primer (10 μM), 0.5 μL of the fluorescently labeled M13(-21) forward primer (FAM, NED, VIC, PET; 10 μM), and 0.1 μL of *Taq* DNA polymerase (5 U/ μL ; Invitrogen). PCRs were performed in PTC-100 thermal cycler with a thermal profile consisting of: 2 min at 95°C; 35 cycles of 20s at 95°C, 20s at 54°C, and 1min at 72°C; 30 min at 72°C (Vogel *et al.* 2009). After checking PCR amplification on a 2 % agarose gel, The PCR products were multiplexed into two groups of markers and separated by capillary electrophoresis using an ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Data analysis

The allele peaks were visually inspected and then analyzed using PEAK SCANNER V1.0 software (Applied Biosystems) based on the internal Genescan-500 LIZ size standard. Each peak was considered as an allele at a co-dominant locus and the genotype of each individual at each locus was recorded. On the basis of the resulting matrix, a set of measures reflecting the intra and inter-population genetic diversity levels, including the observed number of alleles per locus (N_a), the effective number of alleles (N_e), Shannon's Information index (I), polymorphism percentage (P), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and fixation index (F_{is}) were calculated using GenAlEx v 6.5 (Peakall and Smouse, 2006).

The differences in the values of genetic parameters among populations were tested using non parametric Kruskal–Wallis test (Kruskal and Wallis, 1952). An estimate of the effective number of migrants per generation (Nm) was calculated using the private allele method (Barton and Slatkin, 1986) via Genepop v 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

The studied populations were split to six bioclimatic (from arid to sub-humid) and three altitudinal classes (class 1: 0–80 m, 147 class 2: 80–400m and class 3: >400 m) (Table 1). In order to examine the distribution of variation and differential connectivity among populations (Φ_{PT}), regions/altitudinal classes (Φ_{RT}), and populations within regions/ altitudinal classes (Φ_{PR}), an hierarchical AMOVA analysis with the populations nested within eco-regions/altitudinal classes was performed in GenAIEX v 6.5. The same program was used to evaluate the genetic differentiation the pairwise Φ_{PT} values (an analogue of F_{st} , i.e., genetic diversity among populations) and Nei's genetic distances (1978) between populations. In all instances, the significance of variance components was tested with 9999 permutations.

To investigate the genetic relationships among populations, an UPGMA dendrogram based on pairwise Nei's genetic distances (1978) and a factorial correspondence analysis (FCA) (Lebart *et al.*, 1984) were performed using MEGA v 5.2 (Tamura *et al.*, 2007) and GENETIX v 4.0 (Belkhir *et al.*, 2000), respectively. For the UPGMA dendrogram, Bootstrapping with 1000 replicates was carried out to assess statistical support for each cluster.

The potential structure of the studied populations was analyzed with more details by a Bayesian-based approach using the software STRUCTURE version 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) (hereafter, STRUCTURE analysis). Analyses were carried out with a burn-in period of 100 000 iterations, further run length of 200 000 Markov Chain Monte Carlo steps, testing population subdivision from $K = 1$ to 11 under the admixture and correlated allele frequencies model, without prior information on sampling locations. Ten independent simulations were

performed for each K to identify the optimal K value based on the methods of the maximum likelihood L(K) (Pritchard et al., 2000) and the ad hoc quantity (ΔK) (Evanno et al., 2005) approaches implemented in the software STRUCTURE HARVESTER version 0.6.7 (Earl and vonHoldt, 2011). This method uses an *ad hoc* statistic ΔK , which takes into account the rate of change in the log probability of data between successive K values. Each of the 145 lines was attributed to a given cluster when the proportion of its genome in the cluster (Q) was higher than an arbitrary threshold value of 75%.

Finally, correlations of the spatial genetic structure with geographical distance and with altitudinal difference were analyzed with simple Mantel tests (Mantel, 1967) and partial Mantel tests (Legendre & Legendre, 1998) were used to check combined effects of distance and altitude.

Results

15 microsatellites loci, embedded in 15 different genomic regions and located on the five chromosomes of *Brachypodium distachyon*, were sequenced from 145 lines from 9 natural populations of *Brachypodium hybridum*. A total of 159 different alleles, ranging in length from 107 to 319 bp, were detected across the 9 studied populations with an average value of 10.6 alleles per locus. 27.67% of the total were considered as rare alleles (low frequency, $f < 1\%$). All the studied microsatellites showed 100 % of polymorphism (the overall expected heterozygosity is high $> 70\%$) whereas, the patterns of variation were quite different among these microsatellite loci. In fact, ALB86, ALB372, ALB40 and ALB 445, (located in chromosomes 1 and 3) were the most variable loci with a $N_a > 13$ and $H_e > 80\%$, while ALB256 was the less polymorphic marker with three alleles and heterozygosity value of 61.7% (Table 2). Likewise, the genetic diversity also differed drastically among populations. The populations originated from Haouria, Raouad and Sjenen were characterized by the higher values of all the genetic diversity parameters, while the Ain Drahem population

was found to be the less variable (Table 2). Meanwhile, the mean inbreeding coefficient estimated as an average across loci and populations was relatively high ($FIS = 0.61$), which indicate a significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium and an excess of homozygotes ($P < 0.001$) (Table 3). The Kruskal–Wallis test showed no significant differences between the populations for all the genetic diversity parameters ($\chi^2 = 15.85$, $FD = 8$, $P = 0.98$).

Analysis of Molecular Variance Analysis (AMOVA) indicated that most of the variation (97%) to differences within populations while only 3% was due the among populations variability. In addition, the AMOVA results showed that there are no significant variation among eco-regions nor among altitudinal subdivisions ($\Phi_{RT} = -0.06$, $P = 0.981$, $\Phi_{RT} = -0.05$, $P = 0.981$, respectively) suggesting the non-effectiveness of among regions and among altitudinal subdivisions components in the genetic variation partitioning. Meanwhile, the pairwise matrix of Φ_{PT} among populations showed that all the populations are very slightly differentiated. Infact, pairwise Φ_{PT} genetic distances ranged between 0 (Jbel Zaghouan and Haouaria) and 0.047 (Fayedh and Ain Drahem) with a mean Φ_{PT} value of 0.023. A similar pattern of differentiation among populations was observed using Nei's distances (Table 3). Moreover, the low genetic variation among populations was accompanied by an overall relatively high gene flow ($Nm = 2.31$) among populations.

To examine genetic relationship of the nine *B. hybridum* populations, hierarchical cluster analysis was performed on the basis pairwise Nei's genetic distances matrices between populations. The resulting UPGMA dendrogram divided the nine populations into three groups. Ain Drahem population was clustered alone as an out-group, Fayedh and Enfidha populations from the second group while the remaining populations were gathered in the third group (Figure 2). A similar tripartite division of populations was pointed out by the three-

dimensional factorial correspondence analysis (FCA) (Figure 3).

The patterns of genetic structure of the studied populations were further analyzed by STRUCTURE analysis. The results of this analysis, coupled with the computation of the Evanno ΔK statistics (Evanno *et al.*, 2005), suggested that the 145 *B. hybridum* lines were most likely genetically partitioned into three main clusters ($K = 3$) (Figure 4), which is congruent to the genetic structure provided by UPGMA dendrogram and FCA. The estimated genetic structure of the 145 studied lines revealed by STRUCTURE analysis was shown in figure 4. Out of the 145 studied lines, a total of 117 (81 %) lines displayed a clear membership to one of the three cluster ($Q > 75\%$). The remaining lines (19 %) showed conflicting assignment and tend to have mixed ancestry. The number of individuals per cluster varied from 22 in cluster 2 to 51 in cluster 1. The first and the third clusters enclosed individuals originated 8 of the 9 studied populations with a clear predominance of the populations Raoud, Haouaria and Douar El Hej Wniss in cluster 1 and the populations of Aindrahem, Sjnén and E Kef in cluster 2 ($> 50\%$ of membership) while the cluster 2 was essentially formed by individuals originated from Fayedh, Enfidha. In addition, the alpha parameter obtained in the STRUCTURE analysis at $K = 3$ was close to zero ($\alpha = 0.06$) which suggest the close relationship between the 145 accessions and confirm the low genetic differentiation among the populations. Moreover, the Mantel test identified that the spatial genetic structure was not correlated to the geographic distances ($r = 0.046$, $P = 0.366$) neither to the altitudinal differences ($r = -0.29$, $P = 0.055$) nor to the combined factors ($r = 0.055$, $P = 0.35$).

Discussion

Polyploidy is considered an important mode of evolution in higher plants (Robertson *et al.*, 2011; Sampson & Byrne, 2011). Over the years, this phenomenon has been the focus of substantial and diverse research. In fact, it has played a crucial role in the domestication of crops, such as wheat, maize and cotton (Dubcovsky & Dvorak, 2007). Recently, in addition to the aspects that have been studied in polyploidy, one of the more intriguing have been the questions of how the genetic diversity within and between populations of wild polyploid plant species is partitioned and what are the factors determining their genetic structure. In the present study, a set of 15 microsatellite markers was used to describe the genetic structure of 145 accessions belonging to 9 Tunisian populations of the wild allotetraploid *Poaceae*, *Brachypodium hybridum*. These microsatellites were found to be highly informative and approved to be a powerful tool for the genetic characterization of a close species, *Brachypodium distachyon* (Vogel *et al.*, 2009).

Genetic diversity estimated based on allelic richness as a total number of detected alleles per locus and gene diversity, showed the existence of high variation ($P = 100\%$, $He > 0.7$). Accordingly, Xinchun *et al.*, (2013) and Baba *et al.*, (2012) revealed a high genetic diversity in two perennial *Brachypodium* species, *B. sylvaticum* ($P = 97\%$, $He = 0.488$) and *B. pinnatum* ($P = 79\%$, $He = 0.70$) by using SSR and AFLP markers, respectively. However, the level of genetic diversity reported in our study was found to be slightly higher than that detected by Vogel *et al.*, (2009), Filiz *et al.* (2009) and in a large Turkish collection of *B. distachyon* by using SSR and SRAP markers but strongly higher than that revealed by Hammami *et al.*, (2012) in a relatively small Spanish collection of the complex of species *B. distachyon*, *B. stacei* and *B. hybridum* (7, 4 and 12 accessions, respectively)) by using allozyme, and by Jaroszowicz *et al.*, (2012) in a collection of 18 Eurasian *B. distachyon* accessions by using RAPD markers. The high genetic diversity observed in our study agrees

with the expectations for polyploid taxa since it has been demonstrated that the polyploid species typically display a great genetic diversity (Palop-Esteban *et al.*, 2011).

At the population level, our results showed that all the studied populations, despite their large geographic distribution and diverse bioclimatic stages, exhibited a high genetic diversity but no significant inter-populations differentiation. This could be explained by the high fitness of *B. hybridum* and its capability to colonize diverse altitudes and diverse ecological regions (Manzaneda *et al.*, 2012; Catalan *et al.*, 2012; López-Alvarez *et al.*, 2012).

In contrast to the high genetic diversity levels, our results revealed a fairly genetic differentiation among populations ($\Phi_{PT} = 0.023$) accompanied with high gene flow of two migrants per generation. According to Wright (1931), no random differentiation among populations could be expected if the average number of migrants (gene flow) per generation, (Nm) exceeds 1; where N is the effective population size and m is the fraction of immigration. In addition, an AMOVA was conducted for populations with the assumption of existence of high variation between populations as compared to within populations. But in contrast the result showed high variation within populations (97% vs 3%). The result obtained from analysis of phenotypic data for the same populations showed also the same trend with no significant difference between populations while statistically significant difference observed within populations (Neji *et al.*, 2014). Similarly, fairly low contribution of populations to total variation as compared to within population was reported for *B. pinnatum* (79%) (Baba *et al.*, 2012). Conversely, a relatively high genetic differentiation has been detected and Jaroszowicz *et al.*, (2012) in *B. distachyon* and by Rosenthal *et al.*, (2008) and Xinchun *et al.*, (2013) in *B. sylvaticum*.

Inferring the number of genetic clusters within a dataset can be problematic when population structure is weak (Pritchard *et al.* 2000; Evanno *et al.* 2005). However, the results

of our STRUCTURE analysis corroborates with those provided by UPGMA method and FCA and revealed strong support for the presence of three distinct genetic clusters ($K = 3$) without a clear spatial genetic structure, which confirm the low genetic differentiation between populations and the high genetic diversity within populations. In addition, results showed that genetic differentiation was not correlated to the geographic distances ($r = 0.046$; $p = 0.78$, Mantel test) nor to the altitudinal differences ($r = -0.29$; $p = 0.75$) indicating that neither physical (mountains and valleys) nor environmental barriers (climatic factors) constraint the genetic exchangeability between populations. The weak population structure and the non-implication of geographic distances in the genetic differentiation detected in our study is in contradiction with that found by Bakker et al. (2009) which revealed a strong population structure and a significant isolation by distance in Californian and Eurasian accessions of *B. hybridum*.

Yao and his collaborators (2007) suggested that low genetic differentiation and high gene flow between populations may stem from long-distance gene dispersal either by pollen or by seeds. In the diploid model species *B. distachyon*, Vogel et al, (2009) suggested that the predominantly inbreeding system and the small hairy seeds, easily dispersed by animals and humans, of this species are the most important factors that shape the long seed-mediated gene flow between its natural populations and therefore their important role on its genetic structure. The significant role of long seed dispersal in the genetic structure of *Brachypodium* species was further supported in many studies (Bakker *et al.*, 2009; Rosenthal *et al.*, 2008; Filiz *et al.*, 2009; Manzaneda *et al.*, 2012; Baba *et al.*, 2012). Here, we proved that the high genetic diversity and the weak genetic structure of the studied populations is the result of homogenizing effects of a multidirectional gene flow via long-distance seed dispersal. This conclusion was also pointed out in our previous study analyzing the phenotypic variation of the same populations by a large set of morpho-phenological traits, where the results have

showed a high level of intra-population variation (coefficient of morphological differentiation, $Q_{st} = 0.4$) and a lack of correlation between genetic differentiation and geographic distribution (Neji et, 2014).

Under the assumption of unbiased results, the comparison between the patterns of population genetic differentiation of the natural populations of *B. hybridum* at quantitative traits (Q_{st}) and molecular markers (Φ_{PT}) revealed similar population differentiation pattern across all the analyzed traits ($Q_{st} > \Phi_{PT}$ for all the traits) with a relatively high difference between the mean values of Q_{st} and Φ_{PT} ($Q_{st} - \Phi_{PT} = 0.37$). In addition, our SSR data revealed non significant variation neither among populations nor among the altitudinal classes. In fact, results obtained from clustering of accessions into distinct group showed no consistent pattern and accessions did not follow their geographic origin, which consistent with that provided by the morphological data. Overall, the results revealed by SSR data corroborates with those of the morphological data and confirm that the population subdivision of the Tunisian of *B. hybridum* is influenced by both, gene flow and natural selection.

Moreover, the patterns of variation described here can be a basis for studies with a higher number of markers. The conservation of such locally common variation is important, since it may represent genotypes adapted to specific environments.

In conclusion, our analyses point towards great usefulness of SSR markers to provide deep insights on the genetic background of the Tunisian *B. hybridum*. Considerable genetic diversity has been detected in all the studied populations. However, our results revealed low genetic differentiation and high rate of gene flow between populations. Therefore, we assume that the gene flow via long seed dispersal is the most important evolutionary process reflecting the genetic structure in *B. hybridum*, which is in agreement with previous investigations in other species from the same genus.

Nevertheless, the result that up to 97 % of microsatellite variation is partitioned at the

intra-population level is instructive for adopting a plan of surveys involving more individuals within populations.

References

Bąba W., Kurowska M., Kompała-Bąba A., Wilczek A., Długosz J., Szarejko I. (2012). Genetic diversity of the expansive grass *Brachypodium pinnatum* in a changing landscape: effect of habitat age. *Flora* 207: 346-353.

Bąba W., Kurowska M., Kompała-Bąba A., Wilczek A., Długosz J., Szarejko I. (2012). Genetic diversity of populations of *Brachypodium pinnatum* (L.) P. Beauv.: expansive grass in a fragmented landscape. *Polish Journal of Ecology* 60: 31-40.

Bakker, E.G., Montgomery, B., Nguyen, T., Eide, K., Chang, J., Mockler, T.C., et al. (2009). Strong population structure characterizes weediness gene evolution in the invasive grass species *Brachypodium distachyon*. *Mol. Ecol.* 18(12): 2588 - 2601

Barton, N. H. & Slatkin, M., (1986). A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* 56: 409-415.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2000). GENETIX 4.0, logiciel sous Windows pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier: France.

Campbell, C. S. (1985). The subfamilies and tribes of Gramineae (*Poaceae*) in the Southeastern United-States. *J. Arnold Arboretum* 66, 123–199

Catalan P, Boulos Chalhoub B, Chochois V, Garvin D, Hasterok R, Manzaneda A, Mur L, Pecchioni N, Rasmussen S, Vogel J, and Voxeur A (2014). Update on the genomics and basic biology of *Brachypodium* International *Brachypodium Initiative* (IBI). *Trends Plant Sci* 19: 414-418

Catalán P, Jochen Müller J, Robert Hasterok R, Glyn Jenkins G, A. J. Mur L, Langdon T,

Betekhtin A, Siwinska D, Pimentel M and López-Alvarez D (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany* 109, 385–405

Catalán, P. and R.G. Olmstead. 2000. Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplast *ndhF* gene and nuclear ITS. *Pl. Syst. Evol.* 200:1–19

Clayton WD, Renvoize SA (1986). *Genera Graminum*. Her Majesty's Stationery Office, London
Daniel Falush, Matthew Stephens and Jonathan K. Pritchard (2013): Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies." *Genetics* 164(4): 1567-1587.

Dubcovsky J, Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862–1866

E. Bonnet, Y. Van de Peer Zt: A Software tool for Simple and Partial Mantel Tests *Journal of Statistical Software*, Vol. 7, No. 10. (2002), pp. 1-12 Key: citeulike:2748922

Earl, D.A. & von Holdt B.M.. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7

Filiz, E., Ozdemir, B.S., Budak, F., Vogel, J.P., Tuna, M. & Budak, H. (2009). Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome* 52, 876–890.

Filiz, E., Ozdemir, B.S., Tuna, M., and Budak, H. (2009). Diploid *Brachypodium distachyon* of Turkey: molecular and morphologic analysis. *In The Proceedings of the 5th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf. Edited by T. Yamada and G. Spangenberg. Springer. pp. 83–89.*

Geuna, F., M. Toschi, and D. Bassi. (2003). The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breed.* 122:526–531. doi:10.1111/j.1439-0523.2003.00897.x

Hammami, R., Jouve, N., Cuadrado, A., Soler, C. And Gonzalez J.M. (2011). Prolamin storage proteins and allopolyploidy in wild populations of the small grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Plant Systematics and Evolution* 297, 99–111.

Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. (1995). Gene flow among plants populations: evidence from genetic markers. In: Hoch PC, Stephenson AG, eds. Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden, 215–232.

Hewitt, E.J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Tech. Commun.* 22. Rev. 2nd ed. Commonw. Bur. Hortic. Plant. Crops, East Malling, UK.

<http://genepop.curtin.edu.au/>

Isobel Tomlinson (2011). Doubling food production to feed the 9 billion: A critical perspective on a key discourse of food security in the UK. *Journal of rural studies* xxx: 1-10.

Jaroszewicz, A.M., Kosina, R. and Stankiewicz, P.R. (2012). RAPD, karyology and selected morphological variation in a model grass, *Brachypodium distachyon*. *Weed Research* 52, 204–216.

Kellogg, E. A., R. Appels, and R. J. Mason-Gamer. (1996). When genes tell different stories: the diploid genera of Triticeae (*Gramineae*). *Systematic Botany* 21: 321- 347.

Kruskal W.H. & Wallis W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*; 47:583-621.

Lebart, L., Morineau, A., Warwick, K.M. (1984). *Multivariate Descriptive Statistical*

Analysis: Correspondence Analysis and Related Techniques for Large Matrices, Wiley.

Legendre P. & Legendre L. (1998) Numerical ecology: developments in environmental modeling 20. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 853p.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.

Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Bastida, J.M., Weiss-Lehman, T., Raskin, E. and Mitchell-Olds, T. (2012). Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytologist* 193: 797-805

Merilä J and Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *J Evol Biol* 14:892–903

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590.

Neji M ,Taamalli W, Smida M, Abdelly C, and Gandour M (2013). Phenotypic and Molecular Genetic Variation in Tunisian Natural Populations of *Sulla carnos*. *Agronomy Journal* 4 : 1094-1100

Neji M., Geuna F., Taamalli W., Ibrahim Y., Smida M. Abdelly C and Gandour M. (2014). Morpho-phenological diversity among Tunisian natural populations of *Brachypodium hybridum*. *Journal of Agricultural sciences*. doi:10.1017/S0021859614000689

Newton AC, Akar T, Baresel JP, Bebeli PJ, Bettencourt E, Bladenopoulos KV, Czembor JH, Fasoula DA, Katsiotis A, Koutis K *et al.* 2010. Cereal landraces for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 237–269.

Pacurar, D.I. (2009). Turning a wild plant into a model – A Déjà vu story. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 37, 17-24.

Palop-Esteban M., Segarra-Moragues J. G. and González-Candelas F.. (2011); Polyploid origin, genetic diversity and population structure in the tetraploid sea lavender *Limonium narbonense* Miller (*Plumbaginaceae*) from eastern Spain

Peakall .R & Smouse P.E. GenAlEx 6 (2006). genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes; 6:288–295.

Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959

Robertson KR, Goldberg EE, and Igic B (2011). Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-compatibility in *Solanaceae*. Evolution;65:139-155.

Rosegrant & Cline (2003). Global Food Security: Challenges and Policies. *Science* **302**, 1917

Rosenthal, D. M., Ramakrishnan A. P., and. Cruzan M. B. (2008). Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17(21): 4657–1669.

Sampson J.F. Byrne M. (2012). Genetic diversity and multiple origins of polyploid *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). Biological Journal of the Linnean Society;105:218-230.

Arraouadi S, Badri M, Cheruth A J, Djéballi N, Ilahi H, Huguet T and Aouani M A (2009). Analysis of Genetic Variation in Natural Populations of *Medicago truncatula* of Southern Tunisian Ecological Areas, Using Morphological Traits and SSR Markers. *Tropical Plant Biol.* **2**:122–132

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance

and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

Vogel, J.P., Tuna, M., Budak, H., Huo, N., Gu, Y.Q. & Steinwand, M.A. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* 9, 88.

Watson, L & Dallwitz, MJ. (1992). The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Version: 28th November 2005. <http://delta-intkey.com>.

Xiaohong Yao, Qigang Ye, Ming Kang and Hongwen Huang (2007). Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China; *New Phytologist* 176: 472–480.

Xinchun Mo, Ju Gao, Lizhi Gao (2013). Characterization of Microsatellite Markers and Their Application to Genetic Diversity Analysis of *Brachypodium sylvaticum* var. *breviglume* from Yunnan, China. *American Journal of Plant Sciences* ; 4, 1427-1434.

Web sites

Wright S (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16 (2): 97–159.

Table 1: Characteristics of the origin sites of the studied *Brachypodium hybridum* populations

(Altitudinal classes: class 1: 0–80 m, 147 class 2: 80–400m and class 3: >400 m)

ID	Location	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Altitudinal class	Bioclimatic area (Eco-region)
F	Fayedh	35° 4'4.1"N	9° 40'32.1"E	83	2	Arid
E	Enfidha	36°7'8.04"N	10°27'44.90"E	7	1	Lower semi arid
Z	Jbel Zaghouan	36°22'6.80"N	10° 5'20.00"E	450	3	Upper semi arid
H	Hawaria	37°2'21.00"N	11° 0'53.20"E	23	1	Sub-humid
R	Raouad	36°57'0.00"N	10°14'14.00"E	3	1	Upper semi arid
S	Sejnen	37°4'38.90"N	9° 9'51.10"E	115	2	Humid
A	Ain Drahem	36°48'10.33"N	8°41'29.02"E	134	2	Humid
K	El Kef	36° 6'36.80"N	8°37'39.00"E	482	3	lower semi arid
D	Douar El Hej Wniss	35°40'56.40"N	8°53'49.00"E	880	3	Semi arid

Table 2: Number of different alleles (N_a), Number of effective Alleles (N_e), Shanon Index (I), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e) and fixtation index (F_{is}) for each locus.

	N_a		N_e		I		H_o		H_e		F_{is}	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
ALB372	14,667	1,691	9,424	1,075	2,391	0,125	0,661	0,030	0,882	0,015	0,251	0,029
ALB08	7,444	1,591	5,552	1,056	1,669	0,210	0,289	0,072	0,760	0,040	0,640	0,082
ALB30	5,000	0,000	4,379	0,163	1,534	0,022	0,566	0,097	0,769	0,009	0,262	0,125
ALB86	13,556	1,386	9,528	1,039	2,374	0,107	0,603	0,082	0,885	0,012	0,324	0,088
ALB256	3,778	0,278	2,866	0,245	1,123	0,103	0,280	0,017	0,617	0,052	0,494	0,084
ALB139	8,556	0,729	5,815	0,519	1,900	0,094	0,140	0,025	0,815	0,019	0,823	0,034
ALB230	4,778	0,278	3,727	0,222	1,399	0,059	0,090	0,020	0,723	0,017	0,878	0,026
ALB445	13,111	1,359	9,736	0,938	2,371	0,108	0,405	0,072	0,889	0,012	0,550	0,076
ALB40	13,889	1,263	9,917	0,745	2,415	0,097	0,727	0,081	0,893	0,010	0,193	0,086
ALB89	9,667	1,041	6,822	0,756	2,015	0,139	0,402	0,078	0,830	0,028	0,537	0,087
ALB158	11,556	1,864	7,768	1,630	2,098	0,175	0,290	0,100	0,831	0,026	0,675	0,106
ALB87	6,222	0,760	4,930	0,520	1,639	0,119	0,017	0,012	0,773	0,031	0,980	0,014
ALB56	7,333	0,373	5,076	0,294	1,766	0,033	0,199	0,036	0,795	0,018	0,749	0,044
ALB100	4,556	0,338	3,541	0,277	1,333	0,106	0,051	0,020	0,689	0,047	0,931	0,026
ALB131	5,444	0,338	3,663	0,359	1,436	0,083	0,006	0,006	0,703	0,031	0,992	0,008

Table 3: Number of different alleles (N_a), Number of effective Alleles (N_e), Shanon Index (I), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e) and fixation index (F_{is}) for each population.

ID	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F_{is}
Fayedh	7 (± 0,68 SE)	5,68 (± 0,61 SE)	1,75 (± 0,10 SE)	0,36 (± 0,09 SE)	0,78 (± 0,027 SE)	0,56 (± 0,108 SE)
Enfidha	8,66 (± 0,94 SE)	5,53 (± 0,57 SE)	1,81 (± 0,11 SE)	0,28 (± 0,07 SE)	0,78 (± 0,023 SE)	0,64 (± 0,08SE)
Zaghouan	8,26 (± 0,91 SE)	5,93 (± 0,60 SE)	1,84 (± 0,11 SE)	0,24 (± 0,06 SE)	0,80 (± 0,01 SE)	0,71 (± 0,07 SE)
Haouria	10,4 (± 1,35 SE)	7,33 (± 0,83 SE)	2,04 (± 0,12 SE)	0,34 (± 0,07 SE)	0,83 (± 0,018 SE)	0,59 (± 0,08 SE)
Raouad	10,6 (± 1,60 SE)	7,57 (± 1,25 SE)	2,00 (± 0,15 SE)	0,39 (± 0,08 SE)	0,81 (± 0,02 SE)	0,54 (± 0,08 SE)
Sejnen	9,93 (± 1,44 SE)	7,10 (± 0,95 SE)	1,96 (± 0,14 SE)	0,36 (± 0,07 SE)	0,81 (± 0,02 SE)	0,58 (± 0,08 SE)
Ain Drahem	4,2 (± 0,39 SE)	3,58 (±0,38 SE)	1,26 (± 0,11 SE)	0,19 (± 0,05 SE)	0,65 (± 0,04 SE)	0,68 (± 0,09 SE)
El Kef	9,4 (± 1,33SE)	6,45 (± 0,96 SE)	1,90 (± 0,13 SE)	0,30 (± 0,07 SE)	0,80 (± 0,023 SE)	0,63 (± 0,08 SE)
Douar El Hej wniss	9,26 (± 1,28 SE)	6,43 (± 0,82 SE)	1,88 (± 0,14 SE)	0,33 (± 0,07 SE)	0,80 (± 0,024 SE)	0,60 (± 0,08 SE)

Table 4: Nei's genetic distances (below diagonal) and Φ_{PT} (above diagonal) between pairwise *B. hybridum* populations.

	Fayedh	Aindrahem	Sejnen	Enfidha	El Kef	Douar El Hej Wniss	Haouria	Raouad	Jbel Zaghouan
Fayedh	0,000	0,047	0,020	0,015	0,029	0,031	0,007	0,037	0,009
Ain Drahem	0,869	0,000	0,057	0,050	0,024	0,056	0,028	0,057	0,024
Sejnen	0,484	0,792	0,000	0,044	0,022	0,008	0,025	0,003	0,001
Enfidha	0,400	0,715	0,492	0,000	0,030	0,052	0,020	0,050	0,025
El Kef	0,496	0,562	0,357	0,406	0,000	0,036	0,016	0,026	0,007
Douar El Hej Wniss	0,498	0,705	0,259	0,504	0,410	0,000	0,023	0,005	0,006
Haouria	0,388	0,564	0,394	0,338	0,334	0,357	0,000	0,023	0,000 (*)
Raouad	0,573	0,732	0,254	0,505	0,367	0,237	0,362	0,000	0,011
Jbel Zaghouan	0,467	0,637	0,284	0,425	0,307	0,293	0,254	0,332	0,000

(*) Negative Φ_{PT} of -0,004 between pops Haouria and Jbel Zaghouan converted to zero.

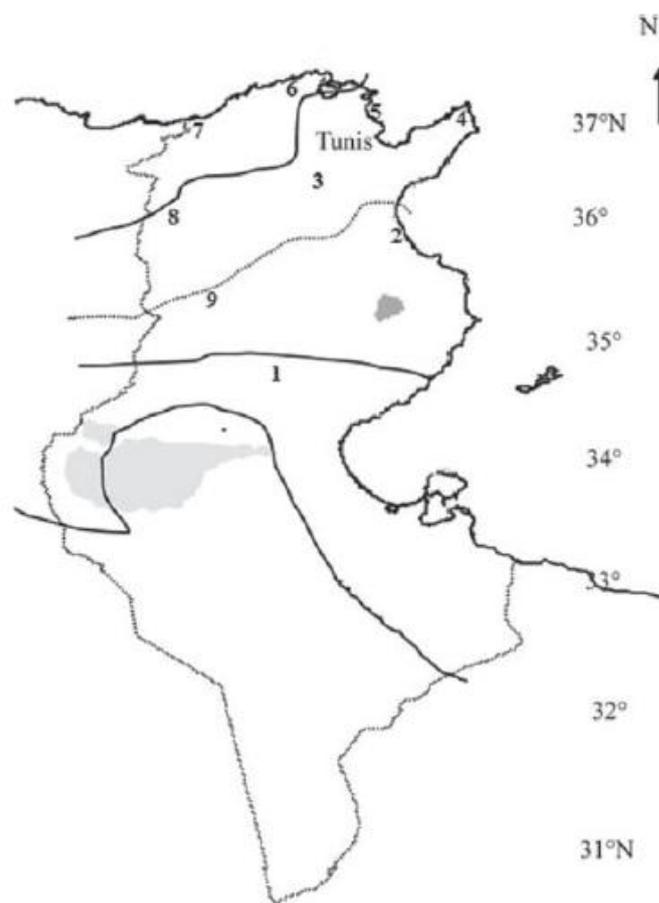


Figure 1: Tunisian populations of *Brachypodium hybridum* and their bioclimatic regions: 1, Fayedh (arid); 2, Enfidha (lower semi-arid); 3, Jbel Zaghouan (upper semi-arid); 4, Hawaria (sub-humid); 5, Raouad (upper semi-arid); 6, Sejnen (humid); 7, Ain Drahem (humid); 8, El Kef (lower semi-arid); 9, Douar El Hej Wniss (semi-arid). Shaded areas indicate saline lagoons (chott) and salt flats (sebkha) in Tunisia.

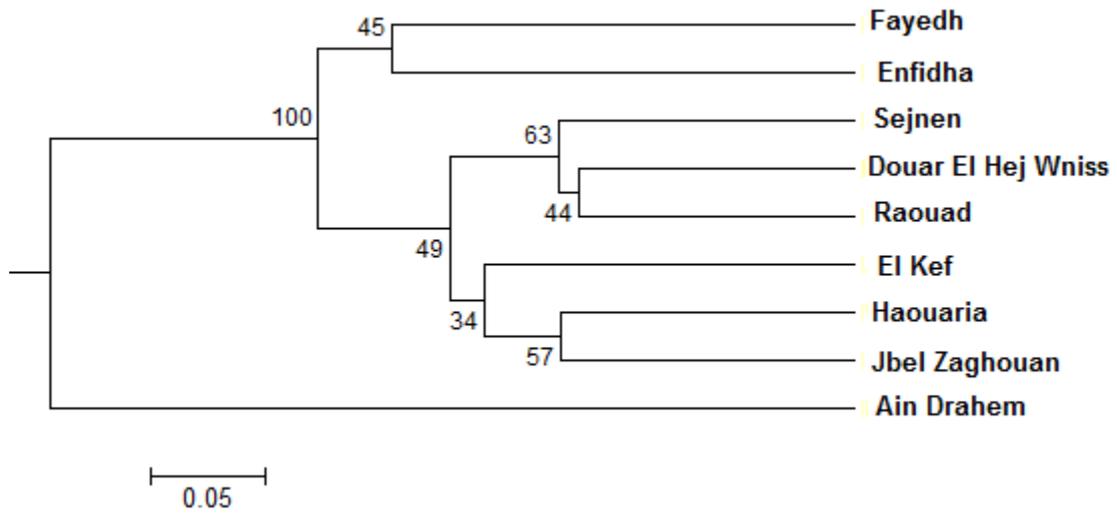


Figure 1: UPGMA dendrogram for nine populations of *B. hybridum* based on Nei's genetic distances.

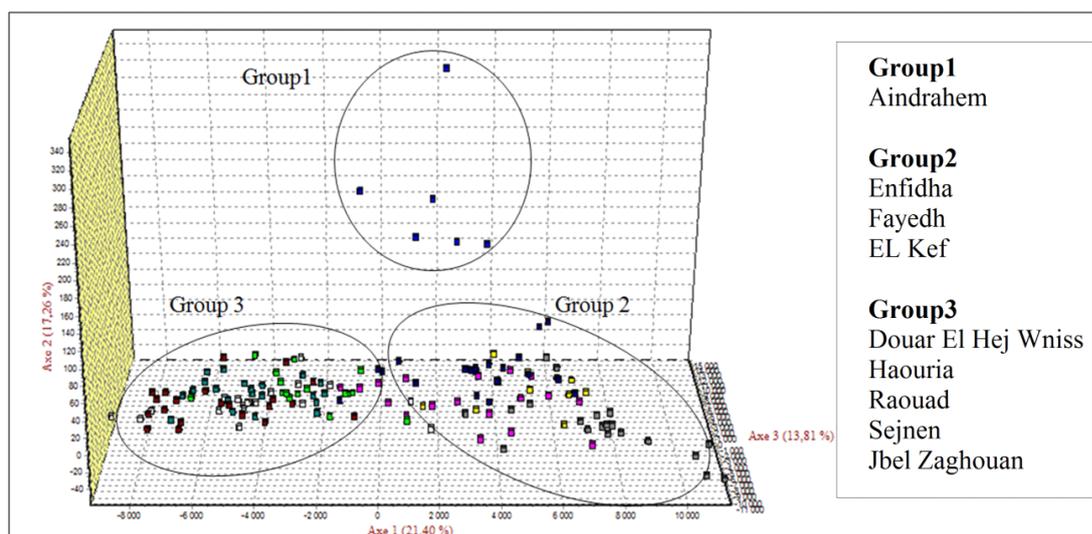


Figure 2: Factorial correspondence analysis of 145 genotypes of *B. hybridum*, with percentage of inertia corresponding to each axis.

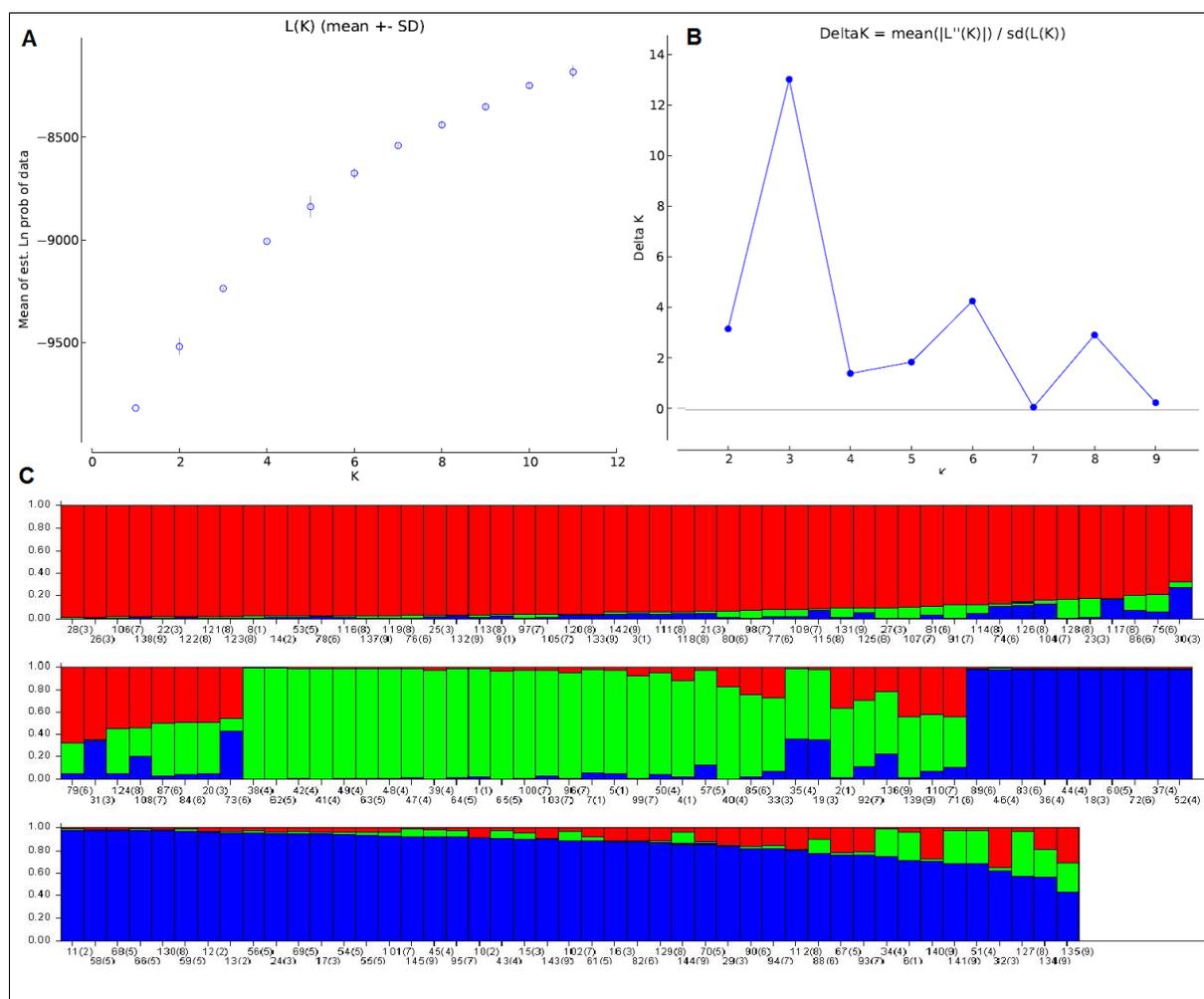


Figure 3: (A) Mean $L(K)$ (\pm SD) over 9 runs for each K value. (B) ΔK calculated as $\Delta K = \frac{\text{mean}(|L''(K)|)}{\text{sd}(L(K))}$. (C) Estimated genetic structure of 145 *B. hybridum* lines assessed by STRUCTURE ($K = 3$). Each individual is represented by a thin vertical bar, partitioned into up to k colored segments.

Chapitre IV

Syntenic *Brachypodium* indels as a new source of markers for *B. hybridum*: Genetic and ecogeographical structure in *Brachypodium hybridum*

I- Introduction

Les nouvelles technologies de séquençage (Next generation sequencing, NGS technologies) sont en train de bouleverser les domaines de l'écologie moléculaire et de la génétique évolutive (Nagarajan et Pop, 2010 ; Tautz et al. 2010). Un des objectifs principaux de ces projets de séquençage réside dans la découverte à très haut débit des variations qui peuvent exister au sein et entre les populations, telle que la variation du nombre de copies d'un gène (CNVs), le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNPs) et les variations de type insertions/délétions (indels). Ces dernières sont devenues rapidement des marqueurs génétiques d'intérêt en écologie et en évolution (Väli et al, 2008; Erixon et Oxelman, 2008). Ce type de variation consiste simplement à une classe de mutation qui comprend à la fois un gain et une perte de nucléotides (William et al, 2002; Gregory, 2007). Leur avantage réside dans le fait que, contrairement aux marqueurs microsatellites, ils peuvent être directement liés à des gènes d'intérêt. De plus, l'automatisation relativement simple de leur génotypage a pour conséquence une baisse substantielle des coûts par marqueur (Vali et al., 2008; Vasemagi et al. 2010). Récemment, de nombreux projets de recherche ont montré la grande fiabilité des InDels dans la caractérisation de la diversité et la structure génétique des populations naturelles et des cultivars de diverses espèces végétales telles que la tomate (*Solanum lycopersicum L.*), le sésame (*Sesamum indicum L.*), *Brassica rapa*, *Arabidopsis*, *Helianthus annuus* et le Citrus (Yang et al, 2014; Wu et al, 2014; Lui et al, 2013; Pacurar et al, 2012; Hou et al, 2010; Heesacker et al, 2008; Garcia-Lor et al, 2012).

Chez l'espèce modèle *Brachypodium distachyon*, l'application des Indels est limitée à quelques études sur le déséquilibre de liaison et l'étude d'expression de quelques gènes impliqués dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Luo et al, 2012 ; Cui et al, 2012). Suite à un séquençage total (Deep sequencing) de 49 lignées naturelles de *B. distachyon*, Gordon et al (2014) ont montré que les variations de type insertions/délétions sont largement répandues dans le génome de *B. distachyon*. Cependant, aucune étude n'a porté sur l'utilisation des polymorphismes des InDels comme marqueurs génétiques pour caractériser la diversité génétique des populations naturelles des espèces *Brachypodium*. Dans ce chapitre, un ensemble de marqueurs de type InDels, fournis par USDA Western Regional Research Center, a été testé pour son utilité dans la caractérisation de la diversité et la

structure génétique des populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum*.

II- Matériels et méthodes

Le criblage de 24 amorces InDels avec 18 lignées nous a permis de retenir 8 amorces amplifiables et polymorphes. Ces amorces ont été par la suite utilisées pour analyser toute la collection tunisienne de *B. hybridum*. Dans un premier temps, les ADN génomiques des 145 lignées ont été amplifiés par PCR. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 3% pendant 2 heures sous une tension de 100 V et visualisés sous UV.

Au sein de chaque population, les paramètres de la diversité génétique (richesse allélique (A_r), les hétérozygoties observées (H_o) et attendues (H_e), le déficit en hétérozygotes F_{is} et l'indice de Shanon (I)) ont été calculés au moyen des logiciels FSTAT et GenAlEx. Le Flux génique entre populations a été estimé en adoptant la méthode des allèles privés. L'analyse de la variance moléculaire AMOVA a été utilisée pour estimer la proportion de la variation génétique attribuable aux différents niveaux hiérarchiques.

La structure génétique des populations a été analysée à l'aide d'une classification hiérarchique par la méthode UPGMA, une Analyse en Coordonnées Principale (ACoP) et une approche bayésienne. Le test de Mantel a été utilisé pour évaluer l'effet des distances géographiques et les différences d'altitude sur la structure génétique des populations.

III- Les principaux résultats

Les résultats obtenus ont montré que tous les marqueurs InDels utilisés étaient fortement polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 90% et une moyenne de 2.5 allèles par locus. Les populations originaires de Haouaria et Raouad se sont avérées 100 % polymorphes tandis que les deux populations Enfidha et Sjenen se sont avérées les moins polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 50%. Toutes les populations ont montré des valeurs d'hétérozygotie observée (H_o) et de diversité génétique de Nei (H_e) comparables, ce qui indique qu'elles ont tendance à l'homogénéité. A l'exception de la population de AinDrahem ($F_{is} = -0.43$), toutes les autres populations ont montré un déficit en hétérozygotie et une nette déviation par rapport à l'équilibre de Hardy_Weinberg.

L'analyse de la variance moléculaire a montré que 80% de la variation génétique sont repartis entre les individus de la même population, tandis que 20% découlent des variations inter-populations dont 5% sont attribués aux différences entre les écorégions ($\Phi_{PT} = 0.2$; $\Phi_{PR} = 0.054$; $\Phi_{RT} = 0.154$). Les différences d'altitude n'ont pas d'effet sur le partitionnement de la variation génétique. Les différentes approches utilisées pour analyser la structure génétique ont montré que les 9 populations peuvent être divisées en trois groupes majeurs sans aucune structuration géographique claire. En accord avec ces résultats, le test de Mantel a révélé une corrélation positive mais non significative entre les distances génétiques et la distances géographiques ($r = 0,023$, $p = 0,39$) et une corrélation négative non significative entre distances génétiques et les différences d'altitude ($r = -0,017$, $p = 0,48$).

En conclusion, malgré le nombre limité des InDels utilisé dans cette étude, ces marqueurs ont montré une grande fiabilité pour les analyses de la variabilité génétique de *B. hybridum* en Tunisie. Dans l'ensemble, les résultats obtenus à l'aide des InDels sont en concordance avec ceux obtenus avec les marqueurs morphologiques et les marqueurs SSR. L'ensemble de ces données ont fait l'objet d'une publication intitulée "**Syntenic *Brachypodium* indels as a new source of markers for *B. hybridum*: Genetic and ecogeographical structure in *Brachypodium hybridum*"**

IV-Article

Syntenic *Brachypodium* indels as a new source of markers for *B. hybridum*: Genetic and ecogeographical structure in *Brachypodium hybridum*

Mohamed Neji¹⁻², Filippo Geuna², Wael Taamalli¹, Yosra Ibrahim¹, Chedly Abdelly¹ and Mhemmed Gandour¹

¹- Laboratory of Extremophile Plants, Center of Biotechnology of Borj-Cédria, BP 901 Hammam Lif 2050 Tunisia.

²- Laboratory of Molecular Genetics, Department of Agricultural and Environmental Sciences (DISAA), University of Milan, Via Celoria 2, 20133 Milan, Italy.

Corresponding author: gandourmed@yahoo.fr

Abstract

The wild annual grass *Brachypodium distachyon* has been widely investigated across the world as a model plant for the temperate cereals and biofuel grasses. This annual plant shows three cytotypes that have been recently recognized as three independent species, the diploids *B. distachyon* ($2n = 10$) and *B. stacei* ($2n = 20$) and their derived allotetraploid *B. hybridum* ($2n = 30$). The last species appear to be the most relevant in Tunisia. In order to analyze the genetic structure and ecogeographical adaptation of this wild species, it is necessary to increase the number of polymorphic markers currently available for the species. In this work, the possibility of using syntenic *Brachypodium* indels as a new source of markers for this purpose has been explored. From the 24 *B. distachyon* indels tested for

transferability and polymorphism in the *B. hybridum*, 11 primer pairs (45%) gave cross-species transferability and 8 primer pairs (33%) showed polymorphism. The latter were used for further analysis in the *B. hybridum* germplasm. The genetic structure and diversity was investigated in a collection of 145 lines representatives of 9 populations. Indels markers showed a total of 20 alleles overall all loci and a high level of genetic diversity over all populations (average of polymorphism rate 84.72%, Allelic richness 1.95, Nei's gene diversity 0.35 and observed heterozygosity 0.31). Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 20 % of the total genetic variability was partitioned among populations ($\Phi_{PT} = 0.196$), a very little part of this variability (5%) was due to the eco-regional effect and no altitudinal effect. These results suggest that there is probably an important gene flow among populations ($N_m = 2.75$). UPGMA cluster analyses, PCoA and Bayesian clustering divided the analysed populations into 3 groups without any geographical or altitudinal grouping. Moreover, Mantel test revealed that genetic distances were not significantly associated neither with geographic distances nor to the altitudinal differences ($r = 0.023$, $p = 0.39$; $r = -0.017$, $p = 0.48$). Overall, the obtained results suggest that the genetic structure of the Tunisian *B. hybridum* populations was mainly governed by a high level of long seed dispersal between populations.

Introduction

In the last few years, the emergence of the Next-generation sequencing (NGS) technologies, the development and improvement of bioinformatics tools and also the increasing availability of the references genome sequences for many plant species have dramatically lowered the costs for generating various promising ultra-high-throughput molecular marker techniques which revolutionized the plant genomic research and plant biotechnology. Among these markers, Insertion/Deletion polymorphisms (InDels) have appeared on the scene as a valuable molecular marker for genomics and molecular breeding.

Indeed, InDels have been widely used in many research applications such as high-resolution genetic mapping, tracking individuals or lines carrying particular genes and even understanding the genetic basis of underlying important agronomic traits (Zou et al, 2014; Wu et al, 2014). In addition, with the advantages of their reproducibility, co-dominance nature, locus specificity, low mutation rates, efficiency in covering the genome (Jiang et al, 2013) and also their amenability for fast and cost-effective genotyping as they can be genotyped with simple procedures based on size separation after targeted PCR and without the necessity of applying special equipment for high-throughput genotyping (agarose-based) (Vali et al., 2008; Vasemagi et al. 2010), InDels have rapidly replaced the molecular markers routinely used in genotyping and they are currently probably the most frequently used for disclosing genetic diversity of plant species (Pacurar et al, 2012).

The genus *Brachypodium* (*Poaceae*) includes several species exhibiting a great economic importance for foraging, bioenergy production, turf and ornamental purposes and noticeable ecological importance for revegetation, soil stabilization and erosion control and characterized by many valuable qualities such as, wide adaptation range, stress tolerance and disease resistance (Hammami et al, 2012; Brkljacic et al., 2011). This genus has gained a lot of interest especially with the publication of the complete genome sequence of *B. distachyon*, a relative of the three of the economically most important cereal crops in the world wheat, barley, and rye, in 2010 (International *Brachypodium* Initiative 2010) and has been adopted as model system to meet perceived gaps in basic and applied research for cereal, bioenergy, and forage grasses. More recently, the appealing peculiarity of *B. hybridum* as an allotetraploid species arising from a spontaneous hybridization between the two diploid species *B. distachyon* ($2n= 10$) and *B. stacei* ($2n= 20$) (Catalan et al, 2012) and the availability of the reference genome sequence of *B. distachyon* have encouraged scientists to use this trio of species as model (Catalan et al, 2012). In recent study, Alvarez-Lopez et al, (2012) showed

that *B. hybridum* exhibited wider geographic distribution and greater ecological adaptation than its two diploid progenitors in the Mediterranean region. Hence, a lot of interest was dedicated to *B. hybridum* in order to decipher the patterns of its genetic variation and also its recurrent origins through time (Alvarez-Lopez, 2012).

In Tunisia, *B. hybridum* is widely distributed and shows a strong evidence of adaptation; it grows on open hillsides, mixed grass steppes, abandoned lands, planes and meadows and covers different ecological environments varying from arid sub-humid (Neji et al, 2014). However, investigation of the genetic variation of its natural germplasm remains scarce; it has lagged behind with only two studies up to date. Our preliminary surveys based on morpho-phenotypic traits and SSR markers demonstrated that the Tunisian *B. hybridum* germplasm is characterized by a substantial phenotypic and molecular variation (Neji et al, 2014; Neji et al, submitted).

In this study, in the attempt to construct a broader picture on the patterns of genetic variation of *B. hybridum* in Tunisia, we analyzed the genetic diversity and structure of natural populations spanning the whole range of distribution of this species by InDels markers.

Material and methods

Plant material and DNA extraction

The basic plant material used in this study consist of 145 *Brachypodium hybridum* lines representative of nine populations spanned along the specie's geographical distribution range in Tunisia. This panel of lines was previously characterized using morpho-phenotypic traits and SSR markers (Neji et al, 2014). Genomic DNA was isolated individually from each of the 145 genotypes, starting from fresh young leaves (about 60 mg) and following Geuna *et al.* (2004) protocol. The relative purity and concentration of the extracted DNA were estimated spectrophotometrically at 260 nm and 280 nm and by 1% agarose gel, and the final

concentration of each DNA sample was adjusted to 20-30 ng/ μ L.

Primer screening and InDels amplification

Out of 287 insertion/deletion-based markers developed on the basis of data from the yet unpublished genome sequencing of 49 worldwide *B. distachyon* accessions provided by Dr Sean Gordon from the Western Regional Center of U.S. Department of Agriculture (USDA, Albany, USA), 24 primers, which evenly distributed on the 5 chromosomes of *B. distachyon*, were screened for amplification efficiency with 2 high quality DNA samples from each population. The process of genotyping InDel polymorphism was optimized by varying the concentration of the template DNA, annealing temperature and the Mg^{2+} concentration. The DNA of the diploid inbred line *Bd21* was included as a positive control in all the screening runs. Optimized PCR reactions were set up in a total volume of 20 μ l containing 30 ng of genomic DNA, 2 μ L of 10 \times reaction buffer (10 mmol L^{-1} Tris-HCl at pH 8.3 and 50 mmol L^{-1} KCl), 0.5 μ L of each dNTP (10 mM), 0.8 μ L of $MgCl_2$ (50 mM), 0.5 μ L forward primer (10 mM), 0.5 μ L reverse primer (10 mM) and 1 U Taq polymerase (EURx). Thermocycling was performed using a PTC 100 Thermal Cycler, with the followed conditions: Denaturation at 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 s, 57 for 30 s, and 72°C for 30 s; and final extension at 72°C for 10 min. According to the amplification efficiencies and reproducibility rates, only 8 primers were chosen as appropriate for the evaluation of all the studied genotypes. The amplification products were resolved electrophoretically in EtBr stained 3 % agarose gels in 1x TBE running buffer (89.15 mM Tris base, 88.95 mM boric acid, and 2.23 mM EDTA) at a constant voltage (100 V) for 3 h and photographed under ultraviolet light. The sizes of the amplified fragments were estimated by comparison to the 100-bp DNA Ladder (Invitrogen) molecular marker. Stutter and background bands were excluded.

Data analysis

InDels bands were scored in the form of single individual genotypes, and arranged in a genotype matrix for analysis of allelic variation. For the nine populations, a set of genetic diversity parameters including, observed number of alleles per locus (N_a), effective number of alleles (N_e), Shannon's Information index (I), polymorphism percentage (P), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and fixation index (F_{is}), all these parameters were quantified using GenAlEx 6.5 software, version 6.2 (Peakall & Smouse, 2006). Since the number individuals analyzed is not uniform among the nine populations, we also calculated the allelic richness (A_r) in each population as a measure of the allelic diversity independent from the sample size by using FSTAT software. The value of N_m , which refers to the number of migrants per generation among populations, was also estimated using Genepop v 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>)

Analysis of the molecular variance (AMOVA), with the populations nested within regions or altitudinal class, of 9999 permutations was performed using GenAlEx 6.2 software to examine the distribution of variation among regions/altitudinal classes (Φ_{RT}), populations within regions/ altitudinal classes (Φ_{PR}), and populations (Φ_{PT}), respectively. Pair-wise populations' Φ_{PT} (an analog of F_{st} , i.e., genetic diversity among populations) were also estimated with the GenAlEx AMOVA analysis (Breinholt et al., 2009).

In order to define the genetic relatedness between populations, a principal co-ordinate analysis (PCoA) and an UPGMA cluster analysis based on the between populations Φ_{PT} matrix were carried out using GenAlEx (version 6.2) (Peakall & Smouse, 2006) and MEGA (Version 4.0.1) (Tamura et al., 2007).

Beyond that, we conducted a Bayesian-based clustering implemented in STRUCTURE program version 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) in order to test whether genetic structure could

be detected under an admixture model, correlated allele frequencies and without the need for a priori geographic data. On the attempt to estimate the number of clusters (K) and to assign each of the 145 analyzed individuals to one or more of these clusters, ten runs were conducted for each possible number of groups (K), ranging from $K=1$, implying no population differentiation, through to $K=9$, which would imply that each of the populations were genetically distinct, using a burn-in period of 10^5 iterations and 20^5 MCMC (Markov chain Monte Carlo) interactions. The most likely number of groups K was evaluated using both the maximal average value of $\text{Ln } P(D)$, a model-choice criterion that estimates the posterior probability of the data and ΔK , an ad hoc statistic based on the second order rate of change of the likelihood function with respect to K (Evanno et al. 2005). We attributed an individual to a given cluster when the proportion of its genome in the cluster (Q) was higher than an arbitrary cutoff value of 80%.

Associations between population structure, geography and altitude were tested using Mantel test for correlation between paired population matrices of geographic distances, and altitudinal differences using the 13th version XLSTAT with 10,000 permutations for significance tests.

Results

Twenty-four InDels primers were screened on 2 selected individuals from each population. By comparing the effects of magnesium concentrations and annealing temperature during amplification, only height primers that produced visible bands were retained for genotyping. The other primers displayed either complex profiles resulting from unspecific multilocus amplifications or an identical unique fragment size with the 36 tested genotypes.

The 8 selected InDels amplified 20 alleles, ranging in size from 250 to 670 bp, with an average of 2.5 putative alleles per locus. The degree of polymorphism among the populations

varied from 50% in Ain Drahem to 100% in Enfidha and El Kef with an average of 84.72% across populations.

Overall, the genetic variability was homogeneously distributed across analyzed populations as suggested by the low standard deviations of all the genetic diversity estimators (Table 1). All the analyzed populations recorded narrow allelic diversity with N_a , N_e and A_r averaging on 2.1, 1.68 and 1.95, respectively. Observed and expected heterozygosities were relatively high and varied slightly among the nine populations. The observed heterozygosities (H_o) ranged from 0.208 to 0.454, with an average of 0.31. The expected heterozygosity (H_e) had slightly higher values than H_o for the majority of populations. The highest expected heterozygosity ($H_e = 0.43$) was recorded in El Kef population whereas the least value was observed in the population originated from Ain Drahem, with an average of 0.35 across populations. However, it is worthy noting that, despite the heterozygosity excess revealed in Ain Drahem population ($F_{is} = -0.43$; $H_o > H_e$), the mean value of fixation indices (F_{is}) was 0.2, which pointed towards an overall deficiency of heterozygosity across populations. Moreover, the estimated number of migrants per generation was significantly higher than 1.0 ($N_m = 2.75$) which is an evidence of a recurrent level of gene flow among populations.

The three-level variance partitioning of the total genetic variation, carried out using AMOVA analysis, revealed that variation maintained within populations was significantly greater than that among populations ($p < 0.0001$, tested using 9999 permutations). When populations were nested within regions, 80% of the genetic variation of was attributed to the differences within populations. The total differentiation among populations was about 20 % ($\Phi_{PT} = 0.2$) of which 15 % was due to the among-population within-regions component ($\Phi_{PR} = 0.15$). By dividing populations into three altitudinal classes, AMOVA yielded similar pattern of within and among populations genetic variation partitioning but without any evidence of differentiation between altitudinal classes. Meanwhile, Population pairwise

relationships revealed that Fayedh and Enfidha were the most genetically close populations ($\Phi_{PT}= 0.04$; $D= 0.031$) whereas Ain Drahem and Jbel Zaghouan were found to be the most divergent populations ($\Phi_{PT}= 0.33$; $D= 0.302$) (Table).

The genetic relationships among populations were examined by UPGMA clustering and three-dimensional plot of PCoA. The UPGMA dendrogram revealed that the nine populations were aggregated into three major groups. The first group included the populations originated Fayedh, El Kef, Ain Drahem and Douar El Hej Wniss, the second group comprised the populations originated from Haouaria and Enfidha while the third group was formed by Sejnén, Raoud and Jbel Zaghouan populations. PCoA analysis showed that the first three principal coordinates explained 87, 76 % of the total variance (52.79 %, 18.98% and 15.99%, respectively). Similar to UPGMA cluster analysis, the 2D scatter plots PC1 vs PC2 and PC1 vs PC3 indicated that the populations might be divided into three major groups with nearly the same pattern of grouping (Figure 2). Cluster analysis (UPGMA) and principal co-ordinate analysis (PCoA) grouped populations from distinct geographic area and altitudinal classes, suggesting that neither geographical distances nor altitudinal differences constrain the relationships among the populations. Consistent with these results, the Mantel test revealed a non significant positive correlation between genetic distances and geographic distance ($r = 0.023$; $P = 0.39$) and a non significant negative correlation genetic distances and altitudinal differences ($r = -0.017$; $P = 0.48$).

To get detailed knowledge on the genetic relatedness among analyzed genotypes, the data of 8 polymorphic InDel markers was subjected to a Bayesian-based clustering without any prior information about sampling origins. The STRUCTURE analysis, coupled with the computation of the Evanno ΔK statistics, suggested that the 145 *B. hybridum* individuals were most likely genetically partitioned into three main clusters ($K=3$). As shown in Figure 3 and according to the inferred ancestry value of each genotype (Q), the whole set of analyzed

genotypes were distributed across three easily distinguished clusters (S1, S2, and S3) although there were a few admixed genotypes. In fact, A total of 124 genotypes (85.5%) displayed a Q value $> 75\%$ and showed a clear membership to one of the three cluster ($Q > 75\%$) while only 21 genotypes (20.5%) were categorized as admixtures. It was noteworthy that, strict clustering based on geographical origin was not detected with the Bayesian-based clustering; almost all populations contained genotypes with varied memberships to the three clusters. However, some tendencies of population's assignment could be observed: cluster S1 encompassed genotypes from all the populations with a clear predominance of Ain Drahem, El Kef and Fayedh populations, cluster S2 was principally formed by Haouria and Enfidha genotypes with some samples from Douar El Hej wniss, Jbel Zaghouan and Raouad whereas cluster S3 was mainly dominated by Raoud, Sjenen, Daouar El Hej Wniss and Jbel Zaghouan genotypes. Such pattern of clustering is consistent with that revealed by UPGMA cluster analysis and PCoA.

Discussion

When using genetic markers to investigate the patterns of genetic variation in natural plant populations, scientists face major dilemma concerning the choice of molecular marker to use. Generally, choosing the most appropriate marker depends on the purpose of the research, reproduction mode of the species and its genetic structure as well as their ability to estimate heterozygosity (Wellington et al, 2013). Due to their locus specificity, co-dominant nature, efficiency in covering the genome and specially their simple detection (agarose-based), Insertion/deletion polymorphisms (InDels) have recently become the markers of choice for wide spectrum of genetics studies (Garcia-Lor et al, 2012). So far, InDels have been successfully used and found to be highly efficient in investigating genetic relationships among cultivars and natural populations of various biologically and economically important plants

species, including *Solanum lycopersicum* L., *Sesamum indicum* L. *Brassica rapa*, *Arabidopsis*, *Helianthus annuus* and *Citrus* (Yang et al, 2014; Wu et al, 2014; Lui et al, 2013; Pacurar et al, 2012; Hou et al, 2010; Heesacker et al, 2008; Garcia-Lor et al, 2012).

The model grass *B. distachyon*, one of the two putative progenitors of species *B. hybridum*, is a diploid species with genome completely sequenced and published and, therefore, raise much less difficulties in developing InDels markers than polyploid species. In this study, a set of InDels markers derived from *B. distachyon* were screened for their reliability to assess the genetic variation of a large collection of *B. hybridum* lines collected from the specie's geographical distribution range in Tunisia. Out of 24 tested primers pair, eight primers pair were found to be highly polymorphic and revealed a great reliability to discern the genetic diversity in *B. hybridum*. The polymorphism rate revealed by these set of InDels was relatively high and comparable to that detected in the same panel of *B. hybridum* lines (84.72% vs 100%) using SSR markers (Neji et al, submitted) and also in other *Brachypodium* species using various molecular markers (Baba et al, 2012; Xinchun et al, 2013; Jaroszowicz et al, 2012).

The overall Nei's genetic diversity H_e revealed by the set of InDels markers used in this study was 0.35. This value was quite similar to that observed in *B. sylvaticum* using SSR markers (0.4) (Xinchun et al, 2013), higher than that reported by Jaroszowicz et al, (2012) in *B. distachyon* using RAPD markers ($H_e= 0.22$). However, despite it was around two times lower than that revealed in our previous SSR data in *B. hybridum* (Neji et al, submitted), the level of genetic diversity detected by InDels markers remains relatively high and supports the substantial phenotypic variation the Tunisian *B. hybridum* germplasm (Neji et al, 2014).

Partitioning of the revealed genetic diversity by analysis of molecular variances (AMOVA) revealed that most of the molecular variation in the *B. hybridum* germplasm was

allocated within populations (80%) with a lower but significantly different from zero proportion of variation among populations (20%) (Mean $\Phi_{PT} = 0.2$). Owing to the fact that the nine populations studied are geographically distant from each other, the most plausible explanation for the higher intra-population variation patterns revealed in this study is that *B. hybridum* populations are highly inter-connected via a high level of seed exchange resulting from important long seed dispersal irrespective to geographical distances. This is translated into correspondingly high level of gene flow (Nm), with 2.75 migrants exchanged each generation.

Such results were further demonstrated by the distance-based clustering method (PCoA and UPGMA analysis) and the Bayesian inference implemented in STRUCTURE. PCoA and UPGMA dendrogram showed that the population structure in the Tunisian *B. hybridum* did not reflect isolation by distance, i.e. closer populations were not genetically more similar than populations farther apart whereas the Bayesian clustering revealed that individuals from geographically distant populations were in some cases assigned to the same genetic cluster. This agrees with the weak correlation between geographic and genetic distances revealed by Mantel test ($r = 0.023$; $P = 0.39$).

Taken together, these results suggest that the effects of gene flow among dominate those of genetic drift in the maintain of the genetic structure of the studied populations, possibly due to the combination of high selfing rates and great seed dispersal ability in *Brachypodium hybridum*, which is in accordance with our morpho-phenotypic and SSR analyzes. Similarly, many previous reports have evidenced the important role played by the long seed dispersal in the maintain of genetic structure of *Brachypodium* populations (Baba et al., 2012; Bakker et al., 2009; Filiz et al., 2009; Vogel et al. 2009).

In Tunisia, natural habitats of *B. hybridum* differ from one another in a large number of

variables such as macro and micro-climate, topography, soil type, etc (Neji et al, 2014). Such local ecogeographic differentiation may enhance plant populations to evolve local ecological adaptations that provide an advantage under the prevailing conditions. In the current study, the genetic variation of *B. hybridum* detected by InDels markers was homogenously distributed across populations and not affected by the eco-regionality and the altitudinal differences (AMOVA analysis and Mantel test). These results confirm the wide range adaptation of *B. hybridum* and its high capability to occur under different environmental conditions (Alvarez-Lopez et al, 2013).

In conclusion, the present study revealed that InDels markers are fully adequate for characterizing genetic variation for *B. hybridum* genetic studies. The results obtained confirm the high genetic variation of the Tunisian *B. hybridum* and the role played by the long seed dispersal in its population genetic structure which is perfect agreement with our previous works using morpho-phenotypic and SSR markers.

References

- Bąba W., Kurowska M., Kompała-Bąba A., Wilczek A., Długosz J., Szarejko I. (2012). Genetic diversity of the expansive grass *Brachypodium pinnatum* in a changing landscape: effect of habitat age. *Flora* 207: 346-353.
- Bąba W., Kurowska M., Kompała-Bąba A., Wilczek A., Długosz J., Szarejko I. (2012). Genetic diversity of populations of *Brachypodium pinnatum* (L.) P. Beauv.: expansive grass in a fragmented landscape. *Polish Journal of Ecology* 60: 31-40.
- Brkljacic, J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, D.F., Vain, P., Brutnell, T., Sibout, R., Bevan, M., Budak, H., Caicedo, A.L., Gao, C., Gu, Y., Hazen, S.P., Holt, B.F., Hong, S.Y., Jordan, M., Manzaneda, A.J., Mitchell-Olds, T., Mochida, K., Mur, L.A., Park, C.M., Sedbrook, J., Watt, M., Zheng, S.J. & Vogel, J.P. (2011). *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol.* 157, 3-13.
- Catalán, P., Müller, J., Hasterok, R., Jenkins, G., Mur, L.A., Langdon, T., Betekhtin, A., Siwinska, D., Pimentel, M. & López-Alvarez, D. (2012) Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon* *Ann. Bot.* 109,385-405.
- Earl, D.A. and B.M. von Holdt. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Filiz, E., Ozdemir, B.S., Budak, F., Vogel, J.P., Tuna, M. & Budak, H. (2009). Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome* 52, 876–890.
- Filiz, E., Ozdemir, B.S., Tuna, M., and Budak, H. (2009). Diploid *Brachypodium distachyon* of Turkey: molecular and morphologic analysis. *In The Proceedings of the 5th*

International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf. *Edited by* T. Yamada and G. Spangenberg. Springer. pp. 83–89.

García-Lor A., F. Luro, Navarro L., and Ollitrault P. (2012). Comparative use of indel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity; a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 77–94.

Geuna, F., M. Toschi, and D. Bassi. (2003). The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breed.* 122:526–531. doi:10.1111/j.1439-0523.2003.00897.x

Hammami, R., Jouve, N., Cuadrado, A., Soler, C. & Gonzalez J.M. (2011). Prolamin storage proteins and allopolyploidy in wild populations of the small grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Plant Systematics and Evolution* 297, 99–111.

Heesacker A, Kishore VK, Gao WX, Tang SX, Kolkman JM, Gingle A, Matvienko M, Kozik A, Michelmore RM, Lai Z, Rieseberg LH., Knapp SJ. (2008) SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. *Theor Appl Genet*, 117(7):1021–1029.

Hou XH, Li LC, Peng ZY, Wei BY, Tang SJ, Ding MY, Liu JJ, Zhang FX, Zhao YD, Gu HY, Qu LJ. (2010) A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant*, 63(5):880–888.

Jaroszewicz, A.M., Kosina, R. and Stankiewicz, P.R. (2012). RAPD, karyology and selected morphological variation in a model grass, *Brachypodium distachyon*. *Weed Research* 52, 204–216.

Jingjing Yang, Yuanyuan Wang, Huolin Shen and Wencai Yang (2014): *In Silico* Identification and Experimental Validation of Insertion–Deletion Polymorphisms in Tomato Genome. *DNA research*, 1-14.

Kun Wu, Minmin Yang, Hongyan Liu, Ye Tao, Ju Mei, Yingzhong Zhao (2014). Genetic analysis and molecular characterization of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars using Insertion-Deletion (InDel) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *BMC Genetics*, 15-35.

Liu B, Wang Y, Zhai W, Deng J, Wang H, Cui Y, Cheng F, Wang XW, Wu J. (2013) Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. *Theor Appl Genet*, 126(1):231–239.

Lopez-Alvarez D., Lopez-Herranz ML., Betekhtin A., & Catalan P. (2012). A DNA barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (*Poaceae*). *PLoS one* 7(12): 10.1371.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.

Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Bastida, J.M., Weiss-Lehman, T., Raskin, E. and Mitchell-Olds, T. (2012). Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (*Poaceae*). *New Phytologist* 193: 797-805

Nei M: Genetic distance between populations. *Am Nat* 1972, 283:292.

Ollitrault F, Terol J, Martin AA, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P. (2012). Development of InDel Markers from Citrus Clementina (*Rutaceae*) Bac-End Sequences and Interspecific Transferability in Citrus. *Am J Bot*, 99(7):E268–E273.

Pacurar D.I., Pacurar M.L., Street N., John Desmond Bussell, Tiberia Ioana Pop, Laurent Gutierrez, and Catherine Bellini (2012). A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. *J. Exp. Bot.*, 63:2491-501.

Pacurar, D.I. (2009). Turning a wild plant into a model – A Déjà vu story. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 37, 17-24.

Peakall R, Smouse P.E. GenAlEx 6 (2006). genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*; 6:288–295.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2):945–959.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

Väli Ü, Brandström M, Johansson M, Ellegren H: Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics* 2008, **9**:8.

Vasemagi A, Gross R, Palm D, Paaver T, Primmer CR: Discovery and application of insertion-deletion (INDEL) polymorphisms for QTL mapping of early life-history traits in Atlantic salmon. *BMC Genomics* 2010, 11:156.

Vogel, J.P., Tuna, M., Budak, H., Huo, N., Gu, Y.Q. & Steinwand, M.A. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* 9, 88.

Wellington F. Nascimento, Jucelene F. Rodrigues, Samantha Koehler, Paul Gepts and Elizabeth A. Veasey (2013). Spatially structured genetic diversity of the Amerindian yam

(*Dioscorea trifida* L.) assessed by SSR and ISSR markers in Southern Brazil. Genet Resour
Crop Evol

Xinchun Mo, Ju Gao, Lizhi Gao (2013). Characterization of Microsatellite Markers and Their
Application to Genetic Diversity Analysis of *Brachypodium sylvaticum* var. *breviglume* from
Yunnan, China. American Journal of Plant Sciences ; 4, 1427-1434.

<http://genepop.curtin.edu.au/>

Table 1: Number of different alleles (N_a), Number of effective Alleles (N_e), Shanon Index (I), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e), fixation index (F_{is}) and allelic richness (A_r) for each population

ID	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F_{is}	A_r
Fayedh	2,25 (± 0,31 SE)	1,8(± 0,23 SE)	0,61 (± 0,13 SE)	0,4 (± 0,16 SE)	0,38 (± 0,07 SE)	0,11 (± 0,28 SE)	2,134
Enfidha	2,375 (± 0,18 SE)	1,668 (± 0,2 SE)	0,562 (± 0,10 SE)	0,247 (± 0,128 SE)	0,343 (± 0,07 SE)	0,415 (± 0,22 SE)	1,625
Zaghouan	2,125(± 0,22 SE)	1,731(± 0,13 SE)	0,579 (± 0,09 SE)	0,228 (± 0,12 SE)	0,390 (± 0,06 SE)	0,457 (± 0,24 SE)	1,877
Haouria	2,250 (± 0,25 SE)	1,572 (± 0,12 SE)	0,512 (± 0,09 SE)	0,314 (± 0,11 SE)	0,329 (± 0,06 SE)	0,187 (± 0,23 SE)	2,155
Raouad	2,125 (± 0,22 SE)	1,697 (± 0,13 SE)	0,564 (± 0,09 SE)	0,315 (± 0,1 SE)	0,378 (± 0,06 SE)	0,137 (± 0,21 SE)	2,042
Sejnen	2,000 (± 0,18 SE)	1,633 (± 0,16 SE)	0,515 (± 0,1 SE)	0,295 (±0,12 SE)	0,339 (± 0,07 SE)	0,085 (± 0,25 SE)	1,867
Ain Drahem	1,625 (± 0,26 SE)	1,481 (±0,2 SE)	0,354 (± 0,14 SE)	0,375 (± 0,18 SE)	0,238 (± 0,09 SE)	-0,431 (± 0,34 SE)	1,885
El Kef	2,250 (± 0,16 SE)	1,856 (± 0,16 SE)	0,664 (± 0,07 SE)	0,366 (± 0,16 SE)	0,432 (± 0,04 SE)	0,319 (± 0,28 SE)	1,927
Douar El Hej wniss	2,000 (± 0,26 SE)	1,673 (± 0,21 SE)	0,505 (± 0,13 SE)	0,266 (± 0,12 SE)	0,327 (± 0,08 SE)	0,247 (± 0,25 SE)	1,946
Mean	2,111 (±0,078 SE)	1,683 (± 0,05 SE)	0,541 (± 0,03 SE)	0,312 (± 0,04 SE)	0,351 (± 0,02 SE)	0,205 (± 0,08 SE)	1 ,93

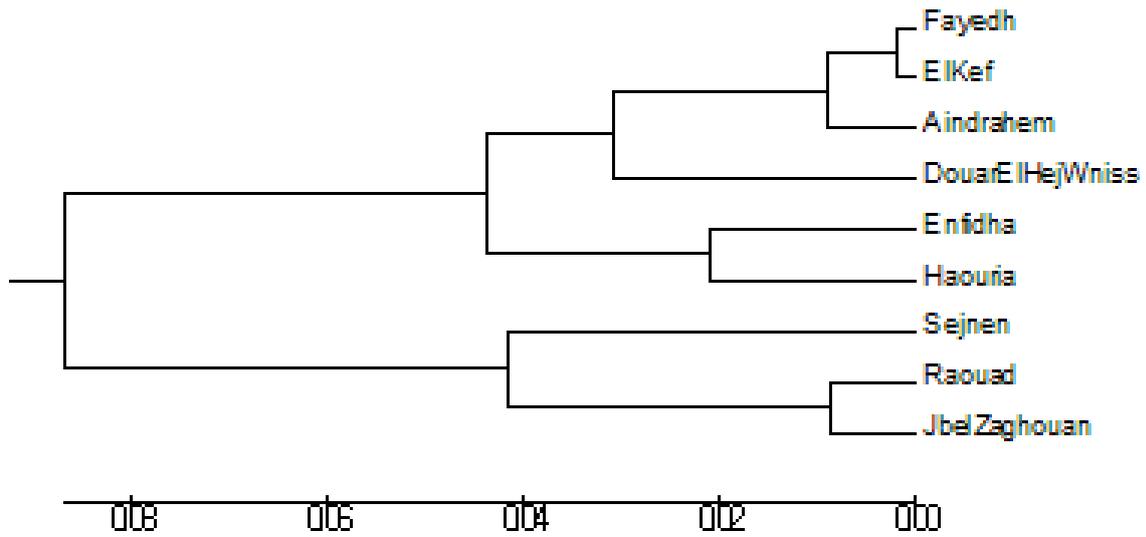


Figure 1: UPGMA dendrogram for nine populations of *B. hybridum* based on Nei's genetic distances.

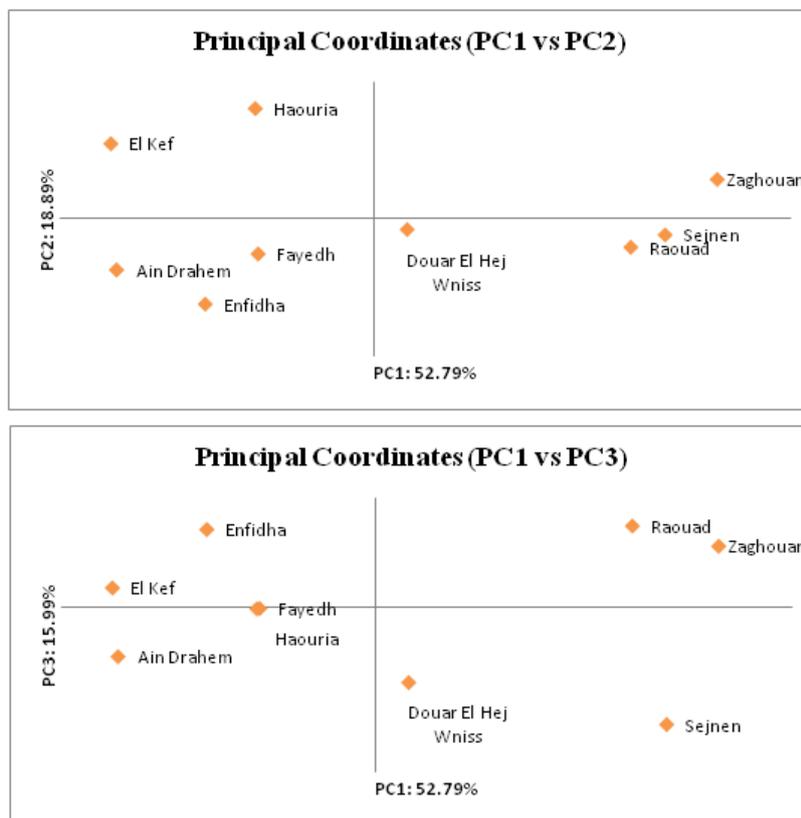


Figure 2: Principal Coordinates analysis of the studied *Brachypodium hybridum* populations (A: axis 1 and 2; B: axis 1 and 3).

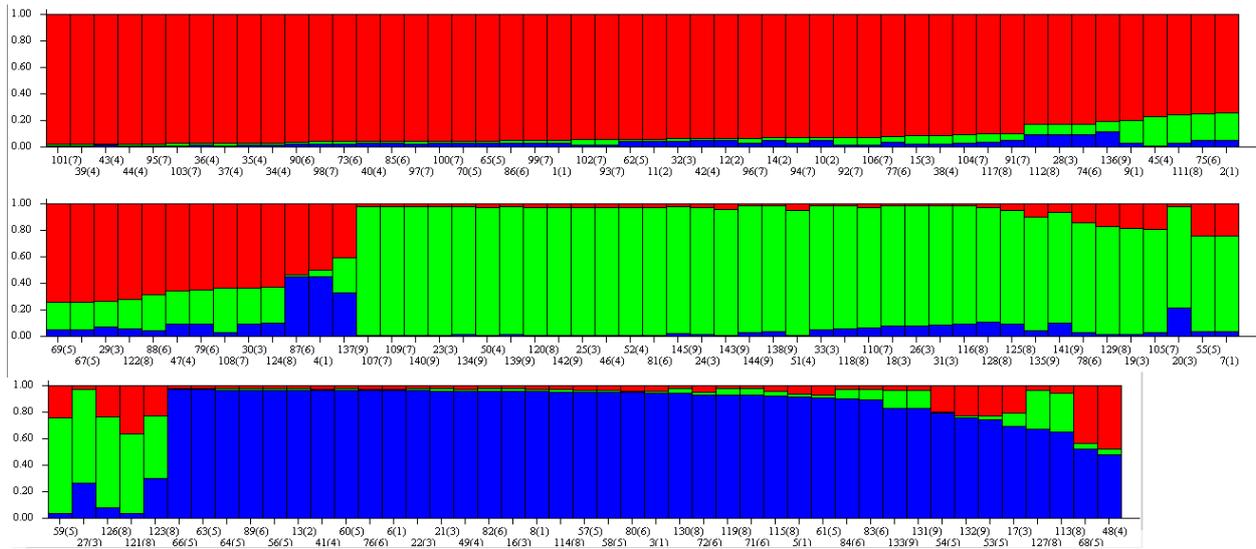


Figure 3: Estimated population structure in 145 *B. hybridum* lines assessed by STRUCTURE. Each individual is represented by a thin vertical bar, partitioned into up to k colored segments

DISCUSSION GENERALE

1- Problématique de la thèse

La Tunisie recèle un immense patrimoine de ressources phylogénétiques fourragères et pastorales qui peuvent atténuer le déséquilibre entre les besoins alimentaires du cheptel et les offres des ressources fourragères et pastorales. Néanmoins, ces ressources sont très peu exploitées ou encore mal connues. En effet, les données publiées à ce sujet ne permettent pas d'apprécier l'étendue de l'offre fourragère tant qualitativement que quantitativement, ni d'en déterminer les apports ou les déficits éventuels. De ce fait, plusieurs projets nationaux et de coopérations internationales ont mobilisé de nombreuses disciplines scientifiques et approches ayant pour finalité la valorisation et la conservation des ressources génétiques fourragères et pastorales locales.

Dans le cadre d'un programme de valorisation des halophytes et des xérophytes comme espèces fourragères pour les milieux difficiles, le Laboratoire des Plantes Extrémophiles au Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC) a opté pour une meilleure connaissance de la diversité génétique de certaines espèces à potentialités fourragères et/ou pastorales. L'objectif de notre travail est d'explorer les ressources phylogénétiques natives des biotopes salins et/ou arides pour trier des espèces prometteuses pour la production de fourrage et/ou l'amélioration de la valeur pastorale des parcours dans les zones marginales et/ou la valorisation des ressources hydriques de qualité médiocre. Ce travail vise également la conservation des ressources génétiques des plantes sauvages à intérêts agronomiques, économiques, alimentaires et écologiques.

Brachypodium est un genre typiquement méditerranéen qui appartient à la famille des *Poacées*. Il est largement répandu en Tunisie sous forme de peuplements spontanés. Il constitue une ressource phylogénétique préférentielle pour la production de fourrage et pour la valorisation des parcours dégradés (Hammami *et al.*, 2011). De plus, en raison de sa grande production de biomasse, des perspectives ont été ouvertes pour l'exploitation de ce genre dans des enjeux économiques comme l'alimentation humaine et la production des biocarburants (Garvin *et al.* 2008; Opanowicz *et al.* 2008; Mur *et al.* 2011). Le présent travail a porté sur la quantification de la diversité génétique de populations naturelles de *Brachypodium* (*B.*

distachyon, *B. stacei* et *B. hybridum*) provenant de différentes régions de la Tunisie, l'identification des facteurs qui façonnent leur structuration génétique spatiale, au moyen de marqueurs moléculaires et des caractères morpho-phenologiques.

1- Le complexe des espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* en Tunisie : Variabilité morphologique et génétique

L'identification et l'analyse de la diversité phénotypique et moléculaire des trois espèces repose sur deux résultats clés qui ont permis d'orienter les travaux de la thèse. Le premier résultat est l'abondance relative de l'espèce tétraploïde *B. hybridum* par rapport aux deux espèces parentales diploïdes *B. distachyon* et *B. stacei*. La couverture réalisée par notre programme de prospection et de collecte ont été effectués sur la quasi-totalité du territoire tunisien suggère que *B. hybridum* est la plus répandue en Tunisie et que sa répartition n'est pas tributaire des conditions pédologiques et climatiques. Ceci est en accord avec les travaux de Catalan et al. (2012) et Alvarez-Lopez et al. (2013) qui ont montré que, parmi ce complexe de espèces, *B. hybridum* est l'espèce la plus répandue dans toute la région méditerranéenne. L'abondance relative de *B. hybridum* peut être liée à leur nature polyploïde. En effet, plusieurs travaux réalisés sur de nombreuses Poacées fourragères telles que le complexe *H. murinum*, *Aegilops*, *Dactylis* et *Bromus*, ont montré que les taxons polyploïdes sont toujours plus fréquents que ceux diploïdes dans le bassin méditerranéen (Amirouche, 1993, 2007, 2009 ; Bel Kadhi, 2003).

D'autre part, l'ensemble des analyses effectuées par les marqueurs morpho-phenologiques et les marqueurs microsatellites ont mis en évidence une variabilité intra spécifique importante et une très faible variabilité interspécifique. Cependant, l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* s'avère plus variable morphologiquement et génétiquement que ces deux espèces parentales. Cette grande variabilité génétique pourrait être attribuée à sa large distribution géographique, son caractère polyploïde et ses grandes capacités à se développer dans diverses conditions environnementales. A l'échelle interspécifique, nous n'avons pas ressorti de différences morphologiques et génétiques nettes entre les trois espèces. Ces résultats soulignent les difficultés rencontrées dans la distinction entre les 3 espèces de *Brachypodium* (Catalan et al, 2012 ; Giraldo et al, 2012 ; Paszko, 2008) et suggèrent que la distinction entre les espèces de ce complexe serait plus facile avec les marqueurs moléculaires qui sont au contraire en mesure de mettre en évidence trois entités génétiques bien distinctes. Ces constatations rejoignent aussi les études de Amirouche (1995, 2009) sur les complexes de *Bromus* et de *Dactylis* (Poaceae), de Widmer et Baltisberger

(1999) sur des complexes d'espèces de draves (Brassicaceae) et celles de Shaw et Small (2005) sur les pruniers (Rosaceae). Néanmoins, le nombre relativement restreint des lignées diploïdes reste certainement insuffisant pour tirer des conclusions définitives et soulever des remarques sur l'étendue de la diversité morphologique et génétique de *B. distachyon* et *B. stacei* en Tunisie. Quoiqu'il en soit, la grande diversité morphologique et génétique révélée au sein de ce complexe d'espèces est sans doute révélatrice d'un potentiel génétique important pour une meilleure exploitation agronomique, en particulier la valorisation des jachères, la protection des sols dégradées et la production fourragère. Il est donc indispensable d'établir une base de données biologiques, génétiques et écologiques afin d'élaborer une stratégie de conservation et de valorisation de la diversité existante.

Ces résultats nous ont incités à accorder une attention particulière à l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* car, d'après les programmes des prospections effectuées, cette espèce est la plus répandue en Tunisie.

2- Variabilité morpho-génétique de *B. hybridum* en Tunisie

La conciliation des approches moléculaires, écologiques et morphologiques est nécessaire pour appréhender la biodiversité des espèces végétales (Stace, 2005 ; Rubinoff, 2006). Avec le développement des outils moléculaires, plusieurs auteurs ont suggéré la nécessité de combiner des informations morphologiques et phylogénétiques afin de comprendre l'organisation et le niveau de diversité morpho-génétique ainsi que ses causes au sein et entre les populations naturelles (Dayrat, 2005; Padial et al. 2010). Bien que les caractères morpho-phénologiques soient souvent polygéniques et milieu-dépendants, leur utilisation permet une bonne appréciation des potentialités adaptatives de l'espèce et fournirait aux sélectionneurs un outil simple de caractérisation de la variabilité phénotypique (Khiari et Boussaid, 2000 ; Carvajal-Rodriguez *et al.* 2005). Par offention, tandis que l'utilisation des marqueurs moléculaire permet d'estimer la variabilité purement génétique indépendamment des fluctuations de l'environnement.

Dans notre travail nous avons combiné 18 traits morpho-phénologiques, 15 marqueurs microsatellites et 8 marqueurs InDels pour analyser la variabilité phénotypique et génétique des populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum*. Compte tenu de l'absence des marqueurs spécifiques à *B. hybridum* nous avons choisi d'utiliser un ensemble de marqueurs SSR et de marqueurs InDels développés chez l'espèce parente *B. distachyon*. On a choisi ces

deux types de marqueurs en raison de leur nature co-dominante, leur grand polymorphisme (faible taux de mutation), leur disponibilité en grand nombre, leur utilisation facile malgré une mise au point longue et coûteuse et surtout parce qu'ils sont des marqueurs neutres. D'une autre part, les marqueurs SSR ont la possibilité d'estimer à la fois les flux de gènes intra et inter populations, ce qui permettrait de mettre en évidence les formes et les zones "hybrides" entre espèces proches (Duminil et Di Michele 2009). Les 15 microsattellites utilisés dans notre étude ont été sélectionnés à partir de ceux utilisés pour analyser la diversité naturelle de l'espèce modèle *B. distachyon* en Turquie, tandis que les InDels que nous avons retenus, sont utilisés pour la première fois dans des analyses de diversité ou de structuration génétique des espèces de *Brachypodium*. En outre, ceci devrait faciliter le positionnement des populations tunisiennes de *B. hybridum* par rapport à la diversité mondiale de *Brachypodium spp.*

Les résultats obtenus par les approches morphologiques et moléculaires montrent une grande hétérogénéité phénotypique et une importante variabilité génétique des populations tunisiennes de *B. hybridum*. Ces résultats sont en accord avec plusieurs données acquises aux termes d'études réalisées sur l'espèce modèle *B. distachyon* (Draper et al, 2001 ; Filiz et al, 2009; Vogel et al, 2009; Schwartz et al, 2010; Jaroszewicz et al, 2012 ; Hammami et al, 2011) ainsi que d'autres espèces du même genre comme *B. pinnatum* (Paszko, 2008 ; Baba et al, 2012) et *B. sylvaticum* (Baba et al, 2012 ; Xinchun et al, 2013). Par ailleurs, nous avons mis en évidence la dominance de la composante intra-population par rapport à celle inter-populations dans la variation génétique et le faible ou quasiment absence du patron isolement par distance ou par altitude dans la structure génétique des populations.

Plusieurs études ont montré que le niveau et la répartition de la diversité génétique sont déterminés par une série de caractéristiques génétiques, écologiques et par l'histoire évolutive de l'espèce (Hamrick et al. 1992, Loveless 1992). Chez les populations tunisiennes de *B. hybridum*, l'étendue de l'aire de répartition, le système de reproduction autogame et la polyploïdie combinés à une maturation des grains assez synchronisée et indépendante des facteurs environnementaux (un faible coefficient de variation et un niveau d'héritabilité très élevé pour le caractère date d'épiaison (Chapitre II)) peut favoriser l'échange de gènes au sein et entre populations et constitue de ce fait des conditions favorables au maintien d'un niveau élevé de la diversité génétique chez toutes les populations. Ce résultat est parfaitement en accord avec le fait que les populations tunisiennes de *B. hybridum* sont interconnectées par des échanges géniques très importants par le biais d'une dispersion à longues distances des

grains. En effet, plusieurs études antérieures ont montré que la structure génétique des populations naturelles des espèces de *Brachypodium* est gouvernée par un flux génique inter populationnel très important par le biais d'une dispersion à longues distances des grains (Vogel *et al.*, 2009; Bakker *et al.*, 2009; Rosenthal *et al.*, 2009; Filiz *et al.*, 2009; Manzaneda *et al.*, 2012; Baba *et al.*, 2012). Certes, cette modalité de dispersion des grains joue un rôle majeur dans l'homogénéisation de la variation génétique spatiale et entraînent une réduction de la différenciation génétique entre les populations tunisiennes de *B. hybridum*. Ceci est bien confirmé par le taux de flux génétique élevé révélé par les deux approches moléculaires SSR et InDels, $Nm = 2.31$ et $Nm = 2.75$, respectivement.

En outre, la large répartition de *B. hybridum* en Tunisie pourrait aussi expliquer le niveau relativement faible de la différenciation entre les populations. En général, les espèces qui ont une aire de répartition étendue présentent une faible différenciation génétique entre populations (Hamrick *et al.* 1992). D'autre part, pour de nombreuses plantes fourragères telles que *Dactylis*, *Festuca*, *Medicago*, *hordeum*, *Bromus* dont plusieurs niveaux de ploïdie coexistent dans des complexes d'espèces, les barrières de fertilité sont rarement étanches (complexes *Festulolium* ou *Medicago sativa-falcata*), renforçant ainsi la fréquence des échanges possibles. Ce phénomène nécessite pose une interrogation quant au rôle de la ploïdie dans les échanges de gènes entre individus de *B. hybridum*.

3- Comparaison entre la caractérisation moléculaire par microsatellites (SSR) et la caractérisation par InDels

Globalement, les analyses effectuées par les 15 microsatellites et les 8 InDels ont fourni des résultats similaires. Les faibles différences observées pourraient être expliquées par le fait que les SSR sont des marqueurs multi-alléliques tandis que les InDels sont bi-alléliques ou aussi attribuées au différence de nombre des marqueurs utilisés (15 SSR vs 8 InDels).

En ce qui concerne la diversité génétique intra population, les deux analyses ont montré qu'il y avait une grande variabilité génétique intra population, bien que pour tous les paramètres de la diversité génétique calculés, les valeurs les plus élevées ont été décelées par les marqueurs microsatellites. Les populations originaires de Raouad, Haouria et Sejnén se sont avérées les plus variables génétiquement, tandis que celles originaires de Ain Drahem a montré le plus faible niveau de variabilité. Les deux analyses ont révélé aussi que la variabilité génétique intra populations domine celle entre les populations avec des effets non significatifs des facteurs environnementaux et des différences d'altitudes sur le

partitionnement de la variabilité génétique. Le niveau de différenciation génétique entre les populations révélé par les marqueurs SSR était 10 fois moins important que celui observé par les marqueurs InDels (2% v 20% ; $\Phi_{PT} = 0.023$ et ($\Phi_{PT} = 0.196$, respectivement). Dans les deux cas, la faible différenciation génétique entre les populations a été expliquée par la forte connectivité entre les populations résultant d'un flux de gènes relativement important par le biais de dispersion des grains à longues distances. En effet le nombre de migrants par génération était largement supérieur à 1 dans les deux analyses ($N_m = 2.31$ et $N_m = 2.75$, respectivement). Outre, les analyses multivariées basées sur les matrices des distances génétiques de Nei entre les populations fournis par les données de génotypage des SSR et InDels (ACoP et classification hiérarchique) ont montré que les 9 populations étudiées pourraient être classées en 3 groupes majeurs. Cette structure génétique est supportée par un modèle de regroupement bayésien réalisé par le programme STRUTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Dans les deux analyses, (SSR et InDels) ce modèle a montré que les 145 génotypes de *B. hybridum* peuvent être classés en 3 groupes ($K = 3$) très peu différenciés ($\alpha = 0.05$). Par ailleurs, des effets non significatifs des distances géographiques et des différences d'altitude sur la structure génétique spatiale des populations ont été révélés dans les études réalisées par les SSR et les InDels.

L'ensemble des résultats obtenus par les deux analyses a bien confirmé le rôle des flux des gènes par le biais d'une dispersion des graines à longues distances sur la structure génétique des populations. Le tableau 10 montre une brève comparaison entre les résultats des marqueurs SSR et les marqueurs InDels.

La grande concordance entre les résultats obtenus par les deux analyses est confirmée par la forte corrélation positive entre la matrice de distances génétiques entre des populations révélées par les marqueurs SSR et celle révélée par les marqueurs InDels ($r = 0,73$; $p 0.0001$). En accord avec ce résultat, Barcaccia *et al.*, (2002) en utilisant deux types de marqueurs moléculaires : SSR et ISSR et 10 populations de maïs (*Zea mays* var. *indurata*), ont trouvé qu'il y a une corrélation hautement significative entre SSR et ISSR ($r = 0,91$). De même et en travaillant sur le blé, Corbellini *et al.*, (2002) ont montré une forte corrélation entre les marqueurs RFLP et AFLP.

Tableau 10: Comparaison entre les résultats obtenus par les 15 SSR et les 8 InDels.

	Microsatellites	InDels
Nombre des marqueurs utilisés	15	8
Pourcentage de polymorphisme	100%	84.7%
Hétérozygotie observée	0.31	0.35
Hétérozygotie attendue	0.79	0.35
Indice de Shannon	1.83	0.54
Indice de Fixation (Fis)	0.61	0.29
Flux des gènes	2.31	2.75
Φ_{PT}	0.02	0.2
Analyse bayésienne	K = 3	K = 3

4- Corrélation entre la caractérisation phénotypique et la caractérisation moléculaire

Les relations entre les deux niveaux de variabilité, celui des marqueurs moléculaires et celui des caractères morphologiques, sont mal connues. Ces niveaux de variation dépendent des outils utilisés. Afin d'évaluer la relation entre les deux types d'analyses, nous avons testé la corrélation entre la matrice des coefficients de différenciation morphologique par paires de populations (Q_{st}) inférés des données phénotypiques et la matrice des distances génétiques de Nei par paires de populations inférée des données moléculaires. Ce test n'a révélé qu'une faible correspondance entre les marqueurs moléculaires utilisés et les caractères agromorphologiques étudiés. En effet, le Test de Mantel a révélé que les marqueurs phénotypiques ont une corrélation positive mais non significative avec les marqueurs SSR ($r=0.16$; $p = 0.23$) et une corrélation négative et non significative avec les marqueurs InDels ($r = -0.1$; $p = 0.147$). Dans la même voie une absence de corrélation entre les marqueurs moléculaires

(RAPD et AFLP) et les marqueurs morphologiques (distances biométriques) a été rapportée par Helms *et al.*, (1997) et Schut *et al.*, (1997) sur le soja et l'orge.

Il est bien connu que les marqueurs morphologiques ne sont pas neutres et leur variation est toujours conditionnée par les facteurs environnementaux. Dans nos analyses phénotypiques nous avons démontré que la structure de variabilité morphologique des populations naturelles de *B. hybridum* est déterminée par une sélection naturelle probablement induite par une pression sélective de l'environnement en faveur de génotypes (phénotypes) adaptés aux conditions climatiques locales et la dispersion des grains à longues distances. Cette hypothèse a été également émise pour d'autres espèces végétales présentant une grande amplitude écologique (Abbad et al, 2004). D'autre part, nous avons bien mis en évidence le rôle du flux de gènes dans la structure génétique spatiale des populations étudiées.

Une autre approche possible dans le cadre d'une étude de la relation entre variabilité génétique et caractéristiques phénotypiques, consiste à comparer la diversité génétique à celle phénotypique inférée à partir des traits quantitatifs. En effet, l'étude des Q_{st} , l'équivalent des Φ_{PT} (équivalent de F_{st}) pour les caractères quantitatifs (Merila et Crnokrak 2001), permet de mesurer la différenciation phénotypique entre les populations. Les Φ_{PT} sont estimés à partir de marqueurs neutres et donc soumis uniquement *à priori* à la dérive alors que le Q_{st} est généré à la fois par la dérive génétique et la sélection naturelle. La comparaison des deux indices permet de mettre en évidence la contribution relative des effets de sélection et de dérive sur la divergence phénotypique entre deux populations (Gandour et al. 2008). Un Q_{st} inférieur au Φ_{PT} révèle un effet stabilisateur de la sélection sur la divergence phénotypique occasionnée par la dérive. A l'inverse, un Q_{st} supérieur au Φ_{PT} indique que la sélection accroît la divergence relativement aux effets de la dérive. Enfin lorsque Q_{st} et Φ_{PT} sont égaux, les forces de sélection sont compensées par les effets de dérive (Gandour et al. 2012).

Nos résultats ont montré que le coefficient de la différenciation morphologique entre les populations est largement supérieur ($Q_{st}= 0.4$) à celui de la différenciation moléculaire obtenu par les microsatellites ($\Phi_{PT} = 0.02$) et aussi par les InDels ($\Phi_{PT} = 0.2$), ce qui montre que la sélection naturelle joue un rôle incontestable dans la structure génétique des populations naturelles de *B. hybridum*.

5- Conclusions

L'exploration des ressources phytogénétiques natives des biotopes salins et/ou arides permet d'identifier des espèces prometteuses pour la production de fourrage et l'amélioration de la valeur pastorale des parcours des zones marginales et la valorisation des ressources hydriques de qualité médiocre. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'étude de la diversité génétique de quelques populations naturelles tunisiennes de *Brachypodium* en utilisant des marqueurs morphologiques et moléculaires.

Pour ce faire, nous avons étudié une collection de 180 lignées de complexe d'espèces *B. distachyon*, *B. stacei* et *B. hybridum* collectées de 9 populations naturelles appartenant à 6 zones bioclimatiques et 3 classes d'altitudes.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche moléculaire pour identifier les espèces de notre collection. Les analyses ont montré que l'espèce allotétraploïde *B. hybridum* ($2n = 30$) est la plus répandue en Tunisie avec 145 lignées trouvées. Les deux espèces *B. distachyon* et *B. stacei* étaient moins fréquentes, 18 et 17 lignées, respectivement.

Une analyse préliminaire de la diversité morfo-génétique de ce complexe d'espèces par 18 traits morfo-phénologiques et 15 SSR a montré que l'espèce la plus répandue *B. hybridum* est la plus diversifiée morphologiquement et génétiquement.

Le nombre limité des lignées représentatives des deux espèces *B. distachyon* et *B. stacei* nous a orienté vers une étude plus fine de la diversité et la structure génétique des populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum*. 18 descripteurs quantitatifs ont été utilisés, dont 11 étaient liés à l'appareil végétatif et 9 à l'appareil reproducteur et 15 marqueurs SSR et 8 marqueurs InDels.

L'analyse de la variabilité morphologique a montré que les populations tunisiennes de *B. hybridum* sont très hétérogènes morphologiquement. Les résultats ont montré que les traits liés à l'appareil reproducteur sont plus variables tandis que ceux liés à l'appareil végétatif sont les moins héréditaires ce qui montre que ces derniers sont les plus touchés par les facteurs environnementaux. Les résultats ont montré que la variation intra-population domine celle inter-populations et que la différenciation morphologique entre les populations n'est pas liée aux distances géographiques. De ce fait, il semble que la sélection naturelle et la dispersion des graines sur des longues distances sont les facteurs les plus déterminants dans la structuration

de la variation morphologique existante entre les populations naturelles de *B. hybridum*.

L'étude de la diversité génétique basée sur les marqueurs moléculaires microsatellites et InDels a permis d'approfondir nos connaissances sur le statut génétique des populations naturelles de *B. hybridum*.

A partir des analyses effectuées par les 15 microsatellites, les résultats suivants ont été tirés :

- une variabilité génétique très importante au sein des populations (100% de polymorphisme, $H_e = 0.79$).
- une large déviation de l'équilibre de Hardy Weinberg ($F_{is} = 0.51$). Le flux génique et le régime de reproduction autogame de l'espèce sont parmi les causes de cet écart.
- une faible différenciation génétique entre les populations ($\Phi_{PT} = 0.02$), ce qui suppose l'homogénéité de leur structure génétique et leur distribution aléatoire.
- un flux génique relativement élevé entre les populations ($N_m = 2.31$)
- une absence des effets du facteur écorégion et des différences d'altitudes sur la structure génétique spatiale des populations tunisiennes de *B. hybridum*.
- une faible implication des distances géographiques dans la différenciation génétique entre les populations (corrélation positive mais non significative entre les distances génétiques et les distances géographiques).

Les Analyses avec les 8 InDels ont montré des résultats comparables à ceux trouvés avec les 15 microsatellites. Les principaux résultats sont les suivants :

- les valeurs obtenues sur l'étude de la diversité génétique indiquent que cette dernière semble importante dans la zone de distribution de l'espèce (84.75 % de polymorphisme, $H_e = 0.35$)
- la diversité génétique intra-population largement supérieure à celles entre les populations (80 % vs 20 % ; $\Phi_{PT} = 0.2$)
- une faible proportion de la variance moléculaire liée à l'effet écorégion (5%) avec absence d'effet des différences d'altitude sur le partitionnement de la variabilité génétique.
- un flux génique important entre les populations ($N_m = 2.75$)
- une déviation considérable de l'équilibre de Hardy Weinberg ($F_{is} = 0.21$)
- une non-implication des distances géographiques et des différences d'altitude. dans la

structure génétique spatiale des populations

L'ensemble des résultats obtenus par les analyses moléculaires concorde avec les analyses morphologiques et montre que le flux génique par le biais d'une dispersion des grains à longues distances joue un rôle important dans la structuration génétique des populations naturelles tunisiennes de *B. hybridum*.

Toutefois, l'indice de la différenciation morphologique entre les populations (Q_{st}) était largement supérieure à celle révélée par les marqueurs moléculaires (Φ_{PT}), ce qui suggère que la structure génétique des populations tunisiennes de *B. hybridum* semblent être influencées par la combinaison de la sélection naturelle et le flux génique par le biais d'une dispersion des graines à longues distances.

Bien que la convergence des résultats morphologiques et moléculaires sur les différents points énoncés ci-dessus soit relativement faible, l'information apportée par les trois types de marqueurs (morphologiques, SSR et InDels) n'est pas redondante et permettent une meilleure connaissance sur la diversité existante.

6- Perspectives

Les travaux effectués et les résultats obtenus dans ce travail nous ont permis d'avancer quelques hypothèses sur la triple relation entre la variabilité phénotypique, le polymorphisme génétique et l'amplitude écologique de *B. hybridum* en Tunisie. Cependant, des questions sont soulevées à différents niveaux.

Au-delà des actions de conservation, l'ensemble des marqueurs SSR et InDels utilisés dans cette étude, qui ont permis la caractérisation de la collection existante, seront disponibles pour les analyses futures d'autres lignées qui seront rajoutées à la collection. En effet, les approches morphologique et moléculaire ont montré que le niveau de variabilité génétique intra-population chez *B. hybridum* était largement supérieur à celui entre les populations. Ce résultat sera instructif pour l'adoption d'un plan d'échantillonnage impliquant le maximum de lignées au sein des populations.

Considérant le caractère neutre des marqueurs SSR et InDels utilisés et le grand polymorphisme de ces marqueurs, lié à leur nature, l'existence d'une diversité moléculaire résiduelle n'est pas surprenante. Un nombre plus élevé de marqueurs et de lignées permettrait de réaliser d'autres applications comme la recherche de gènes candidats liés à la résistance

aux contraintes abiotiques, comme la sécheresse et la salinité. Il serait aussi intéressant de conduire une étude de sélection assistée par marqueurs en prenant en considération les marqueurs liés à des caractères phénotypiques d'importance spécialement ceux qui sont liés à la production de biomasse.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'espèce allotetraploïde *B. hybridum* puisqu'elle est la plus répandue en Tunisie. Il convient donc de s'intéresser à chacune de ces espèces à part, mais aussi les trois ensembles, afin de comprendre les facteurs influençant leur structure génétique spatiale. En l'absence de références historiques concernant la présence ou l'absence d'une espèce donnée dans une zone particulière, il n'est pas toujours aisé de discriminer des processus de dispersion récents de processus historiques. La mise en œuvre des approches évoquées ci-dessus, telle que les suivis de terrain, étude phylogéographique réalisée avec plusieurs types de marqueurs moléculaires, expérimentation et simulations statistiques, devraient permettre de répondre à un grand nombre de questions restées en suspens concernant l'évolution de l'aire de distribution géographique, la diversité et la structure génétique des deux espèces diploïdes *B. distachyon* et *B. stacei*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarrestad, P.A. (2000). Plant communities in broad-leaved deciduous forests in Hordaland county, Western Norway. *Nordic Journal of Botany* 20, 449–466.

Abdelaziz Abbad, Mohamed Cherkaoui, Nadia Wahid, Abdelbasset El Hadrami, Abderazzak Benchaabane (2004). Variabilités phénotypique et génétique de trois populations naturelles d’*Atriplex halimus* C. R. Biologies 371–380

Abdelguerfi, A., Laouar, M. (1999). Les espèces fourragères et pastorales. Leur utilisation au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie). FAO, Regional Office NEAR EAST, Le Caire, Egypte. 110 p.

Adams K. L. et Wendel J. F. (2005a). «Novel patterns of gene expression in polyploid plants». *Trends in Genetics*, vol. 21, no 10, p. 539-543.

Adams K. L. et Wendel, J. F. (2005). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 135-141

Adams K. L., Cronn, R., Percifield, R et Wendel J. F. (2003). «Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organspecific reciprocal silencing». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no 8, p. 4649-4654.

Aimrouche ML, Misset MT, Huon A (1995). Genetic diversity in Mediterranean diploid and tetraploid *Bromus L.* (section *Bromus Sm.*) populations. *Genome* 38:879–888.

Akkaya, M. S. ; Bhagwat, A. A. And Cregan, P. B. (1992). "Length Polymorphisms Of Simple Sequence Repeat DNA In Soybean." *Genetics* 132(4): 1131-1139.

Albertini, E. ; Porceddu, A. ; Marconi, G. ; Barcaccia, G. ; Pallottini, L. And Falcinelli, M. (2003). "Microsatellite-AFLP For Genetic Mapping Of Complex Polyploids." *Genome* 46(5): 824-832.

Angiolillo, A. ; Mencuccini, M. et Baldoni, L. (1999). "Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms." *TAG Theoretical And Applied Genetics* 98(3): 411-421.

- Arnold, M. L. 2006. Evolution through genetic exchange. Oxford University Press.
- Audigeos D, Buonamici A, Belkadi L, *et al.* (2010) Aquaporins in the wild: Natural genetic diversity and selective pressure in the PIP gene family in five Neotropical tree species. *BMC Evolutionary Biology* **10**.
- Avise J.C. (2004). Molecular Markers, Natural History, and Evolution (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.
- Baack E.J., Whitney K.D. et Rieseberg L.H. (2005) Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. *New Phytologist* 167, 623-630.
- Babik, W., Szymura, J.M. et Rafinski, J. (2003). Nuclear markers, mitochondrial DNA and male secondary sexual traits variation in a newt hybrid zone (*Triturus vulgaris* x *T.montandoni*). *Molecular Ecology* 12, 1913–1930.
- Bakker, E.G., Montgomery, B., Nguyen, T., Eide, K., Chang, J., Mockler, T.C., et al. (2009). Strong population structure characterizes weediness gene evolution in the invasive grass species *Brachypodium distachyon*. *Molecular Ecology*. **18**: 2588 - 2601
- Barcaccia, G., L. Molinari, O. Porfiri and F. Veronesi, (2002). Molecular characterization of emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) Italian landraces. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 49: 417-428.
- Beauvois, A. M. F. J. Palisot de (1812). Essai d'une nouvelle agrostographie; ou nouveaux genres des Graminees, avec figures representant les caracteres de tous les genres. Fain, Paris.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2000). GENETIX 4.0, logiciel sous Windows pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier: France.
- Bevan M.W., Garvin D.F., Vogel J.P.(2010). *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 211–217.
- Blanc G. et K.H. Wolfe (2004). Widespread Paleopolyploidy in Model Plant Species Inferred from Age Distributions of Duplicate Genes. *Plant Cell*, 7, 1678- 1678
- Bostein, D., White R.L., Skolnick, M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.

- Bouchra BELKADI, Nourredine ASSALI, Ouafae BENLHABIB (2003). Variation of specific morphological traits and ploidy level of five *Aegilops* L. species in Morocco. *Acta Botanica Malacitana* 28: 47 – 58
- Bowers JE, Abbey C, Anderson S, Chang C, Draye X, Hoppe AH, Jessup R, Lemke C, Lenington J, Li Z, Yann-rong LinSin-chieh LiuLijun Luo Barry S. Marler Reiguang MingSharon E. Mitchell, Dou Qiang, Kim Reischmann, Stefan R, Schulze,D, Neil S, kinner Y, Wang Stephen K, et Andrew H. Paterson (2003) A high-density genetic recombination map of sequence-tagged sites for sorghum, as a framework for comparative structural and evolutionary genomics of tropical grains and grasses. *Genetics* 165: 367–386
- Bretagnolle, F., et J. D. Thompson. (1995). «Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants». *New Phytologist*, vol. 129, no 1, p. 1-22.
- Buerkle, C. A., R. J. Morris, M. A. Asmussen, and L. H. Rieseberg. (2000). The likelihood of homoploid hybrid speciation. *Heredity* 84:441–451.
- Caetano-Anollés G, BG Bassam et PM Gresshoff. (1992). Primer template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides, *Molecular Genetics*. 23 5 :157-165.
- Carvajal-Rodríguez, A., J. Guerra-Varela, B. Fernández, E. Rolán and E. Rolán-Álvarez. 2006. An example of the application of geometric morphometric tools to the morphological diagnosis of two sibling species in *Nassarius* (Mollusca, Prosobranchia). *Iberus* 24:81-88.
- Castiglioni, P., Ajmone-Marsan, P., Van. W.R, and Motto, M. (1999). AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theories of Applied Genetics* 99,425–431.
- Catalan, P., Muller, J., Hasterok, R., Jenkins, G., Mur. L.A, et al. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Ann Bot* 109, 385–405.
- Catalan, P., Olmstead. R.G. (2000). Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae). *from combined sequences of chloroplast ndhF gene and nuclear ITS* *Plant Syst Evol* 220,1–19.
- Catalán, P., Shi, Y., Armstrong, L., Draper, J., Stace. C.A. (1995). Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P. Beauv. based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 177,263–280.

- Chalupska, D., Lee, H.Y., Faris, J.D., Evrard, A., Chalhoub, B., Haselkorn, R., Gornicki, P. (2008). Acc homoeoloci and the evolution of wheat genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 9691–9696
- Chung, M. Y. et Chung, M. G. (2012). "A Review Of The Use Of Genetic Markers In Orchid Systematics With Emphasis On Allozymes." *Biochemical Systematics And Ecology* 41(0): 62-73.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Review of Genetics*, 6(11), 836-846.
- Corbellini M, Perenzin M, Accerbi M, Vaccino P, Borghi B, (2002). Genetic diversity in bread wheat as revealed by coefficient of parentage and molecular markers and its relationships to hybrid performance. *Euphytica* 123: 273–285.
- Cruzan, M. B. (1998). "Genetic Markers In Plant Evolutionary Ecology." *Ecology*, 79(2): 400–412.
- Cuenod, A., Pottier-Alapetite, G. et Labbe ,A. (1954) . Flore analytique et synoptique de la Tunisie : Cryptogames vasculaires, Gymnospermes et Monocotylédones. *Office de l'Exp. et de la Vulg. agricole de Tunisie*, 287 pp., SEFAN, Tunis.
- Dayrat, B. 2005. Advantages of naming species under the PhyloCode: An example of how a new species of *Discodorididae* (*Mollusca*, *Gastropoda*, *Euthyneura*, *Nudibranchia*, *Doridina*) maybe named. *Mar. Biol. Res.* 1:216–232.
- Draper, J., Mur, L., A.J ., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R. & Routledge, A.P.M. (2001). *Brachypodium distachyon*: a new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.* 127, 1539–1555.
- Dufresne, F., et P. D. N. Hebert. (1994). «Hybridization and Origins of Polyploidy». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 258, no 1352, p. 141-146.
- Duminil, J., Di Michele, M., 2009. Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosyst.* 143, 528–542.
- Dumortier, B. C. J. (1824). *Observations sur los Graminees de-la flore belgique*. Tournay. E. Bonnet, Y. Van de Peer (2002). Zt: A Software tool for Simple and Partial Mantel Tests *Journal of Statistical Software* 10, 1-12

- Earl, D.A. et von Holdt B.M. (2011). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources.
- Edelist, C., Lexer, C., Dillmann, C., Sicard, D., Rieseberg, L.H., 2006. Microsatellite signature of ecological selection for salt tolerance in a wild sunflower hybrid species, *Helianthus paradoxus*. *Molecular Ecology* 15, 4623-4634.
- Falconer D.S. (1989). Introduction to quantitative genetics. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 437pp.
- Falconer, D. S., et Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*, Ed 4. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Filiz, E., Ozdemir, B.S., Budak, F., Vogel, J.P., Tuna, M. & Budak, H. (2009). Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome* 52, 876–890.
- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies Suppl* 1:S22-9.
- Frankham, R. (2005). Conservation biology: ecosystem recovery enhanced by genotypic diversity. *Heredity*, 95 (3):183.
- Frankham, R., Briscoe, D.A. and Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, New York, New York, USA.
- Freeland, J.R. (2005). *Molecular Ecology* John Wiley & Sons Chichester.
- Gandour M., Hessini K., Abdelly C. (2012). How selection fashions morphological variation in *Cakile maritima*? A comparative analysis of population structure using random amplified polymorphic DNA and quantitative traits. *Journal of Systematic and Evolution*. 50, 109-118.
- Gandour M., K. Hessini, et C. Abdelly. 2008. Understanding the population genetic structure of coastal species (*Cakile maritima*): Seed dispersal and the role of sea currents in determining population structure. *Genetical Research* 90: 167–178.
- Gao, W., Chen, Z.J., Yu, J.Z., Raska, D., Kohel, R.J., Womack, J.E., Stelly, D.M., (2004). Wide-cross whole-genome radiation hybrid mapping of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetics* 167, 1317-1329.

- Gao, Y.H., Zhu, S.J., Ji, D.F., (2005). Studies on the cytological characters of the interspecific hybrid F1 among the cultivated species in *Gossypium* and their genetic relationship. *Yi Chuan Xue Bao* 32, 744-752 (in Chinese).
- García-Lor A., F. Luro, Navarro L., and Ollitrault P. (2012). Comparative use of indel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity; a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics* 287: 77–94.
- García-Lor, A., Luro,F., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2012). Comparative use of indel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity; a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics* 287, 77–94.
- Garner EC, Campbell CS, Mullins RD (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306:1021-1025
- Garvin, D.F. (2007). *Brachypodium distachyon*: A new model system for structural and functional analysis of grass genomes. 109–123.
- Gaut, B.S., Le Thierry d'Ennequin, M., Peek, A.S., Sawkins, M.C. (2000). Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7008-7015.
- Geuna, F., Toschi, M and Bassi,D. (2003). The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breeding* 122,526–531.
- Giraldo P, Rodríguez-Quijano M, Vázquez JF, Carrillo JM, Benavente E (2012). Validation of microsatellite markers for cytotype discrimination in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Genome*. 55(7), 523-7.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M et al. (2006). Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439, 749-752
- Grime, J. P., Cornelissen, J. H. C., Thompson, K. and Hodgson, J. G. (1996). Evidence of a causal connection between anti-herbivore defence and the decomposition rate of leaves. – *Oikos* 77, 489–494.
- Gross, B.L., Turner, K.G., Rieseberg, L.H., (2007). Selective sweeps in the homoploid hybrid species *Helianthus deserticola*: evolution in concert across populations and across origins. *Molecular Ecology* 16, 5246-5258.

- Gu, Y.Q., Coleman-Derr,D., Kong,X., and O.D. Anderson. (2004). Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiol* 135,459–470.
- Guillon, F., Bouchet, B., Jamme, F., Robert, P., Quéméner, B., Barron, C., Larré, C., Dumas ,P., Saulnier, L. (2011). Brachypodium distachyon grain: characterization of endosperm cell walls. *Journal of Experimental Botany* 62, 1001–1015
- Haanstra, J.P.W., Wye ,C., Verbakel, H., Meijer-Dekens, F., Van ,D.B.P., Odinet, P., van Heusden, A.W., Tanksley, S., Lindhout, P., and Peleman ,J.(1999). An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two Lycopersicon esculentum 3 L. pennellii F2 populations. *Theories of Applied Genetics* 99,254–271.
- Hammami, R., Jouve, N., Cuadrado, A., Soler, C., And Gonzalez J.M. (2011). Prolamin storage proteins and allopolyploidy in wild populations of the small grass *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. *Plant Systematics and Evolution* 297, 99–111.
- Hamrick JL, Godt MJ, Shennan-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For* 6:95-124
- Hamrick JL, Murawski DA, Nason JD (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Plant Ecology* **107-108**, 281-297.
- Hamrick, J. L. And Murawski, D. A. (1990). "The Breeding Structure Of Tropical Tree Populations." *Plant Species Biology* **5**(1): 157-165.
- Hamrick, J.L et Godt, M.J.W .(1997). Allozyme diversity in cultivated crops. *Crops Sciences* 37, 26-30.
- Hamrick, J.L. (1982). Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany*, 1685-93.
- Hamrick, J.L. et Godt, M.J.W et Sherman-Broyles, S.L. (1995). Gene flow among plants populations: evidence from genetic markers. In: Hoch PC, Stephenson AG, eds. *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics*. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden, 215–232.

- Hao, L., Song, G.L., Li, B.L., Wang, K.B., Wang, C.Y., Li, X., (2006). Karyotype analysis of *Gossypium arboreum* x *G. bickii* by genome in situ hybridization. *Yi Chuan Xue Bao* 33, 565-572.
- Harris, H., Hopkinson, D.A., Edwards, Y.H. (1977). Polymorphism and the subunit structure enzymes: A contribution to the neutralist-selection controversy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 698-701.
- Harz, C. O. (1880). Beiträge zur Systematik der Gramineen. *Linnaea* 43,1-30.
- Hassen, H., Zoghalmi, A., 2004. Ressources génétiques des espèces spontanées de légumineuses fourragères et pastorales en Tunisie. In: A. Ferchichi and A. Ferchichi (eds.) Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. CIHEAM Publ., Zaragoza, Spain, pp 375- 377.
- Hasterok, R., Draper, J., and Jenkins, G. (2004). Laying the cytotoxic foundation of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.). *Beauv. Chrom. Res.* 12,397–403.
- Hasterok, R., Marasek, A., Donnison, I.S., Armstead, I., Thomas, A., King, I.P., Wolny, E., Idziak, D., Draper, J. and Jenkins, G. (2006). Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using BAC landing with fluorescent in situ hybridization. *Genetics* 173,349–362.
- Hedrick P.W. and Miller P.S. (1992). Conservation genetics : techniques and fundamentals. *Ecol Appl* 2: 30-46.
- Hedrick PW (2006) Genetic polymorphism in heterogeneous environments: The age of genomics. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, pp. 67-93.
- Hedrick, P., Fredrickson, R. et Ellegren, H. (2001). Evaluation of d₂, a microsatellite measure of inbreeding and outbreeding, in wolves with a known pedigree. *Evolution* 55, 1256-1260.
- Heesacker, A., Kishore, V.K., Gao, W.X., Tang, S.X., Kolkman, J.M., Gingle, A., Matvienko, M., Kozik, A., Michelmore, R.M., Lai, Z., Rieseberg, L.H., Knapp, S.J. (2008) SSRs and INDELs mined from the sunflower EST database: abundance, polymorphisms, and cross-taxa utility. *Theor Appl Genet*, 117(7):1021–1029.
- Helms, T., Orf, J., Vallad, G., McClean, P. (1997), Genetic variance, coefficient of parentage, and genetic distance of six soybean populations. *Theor Appl Genet.*, **94**, 20-26.

Hewitt, E.J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Commun. 22. Rev. 2nd ed. Commonw. Bur. Hortic. Plant. Crops, East Malling, UK.

Hilu, K.W. and Alice L. A. (2001). A phylogeny of Chloridoideae (Poaceae) based on *matK* sequences. *Systematic Botany* 26,386–405.

Holten, J.I. (1980). Distribution and ecology of *Brachypodium sylvaticum*, *Bromus benekeni* and *Festuca altissima* in Central Norway. *Blyttia*, 38, 137–144.

Hou XH, Li LC, Peng ZY, Wei BY, Tang SJ, Ding MY, Liu JJ, Zhang FX, Zhao YD, Gu HY, Qu LJ. (2010) A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant*, 63(5):880–888.

Hou, X.H., Li, L.C., Peng, Z.Y., Wei, B.Y., Tang, S.J., Ding, M.Y., Liu, J.J., Zhang, F.X., Zhao, Y.D., Gu, H.Y., Qu, L.J. (2010) A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant*, 63(5):880–888.

Hsiao, C., Chatterton, N.J., Asay, K.H., Jensen, K.B.(1995). Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 90,389–398.

<http://genepop.curtin.edu.au/>

Huang, J. K. C., Pray, S., Rozelle .(2002). Enhancing the crops to feed the poor. *Nature* 418, 678-684.

Hubbard, C. E. (1966). Gramineae, in Willis, J. C. A dictionary of the flowering plants, 7th ed. by Shaw, H. K. A., pp. 492-496. Cambridge University Press.

Huo, N., Vogel, J.P., Lazo, G.R., You, F.M., Ma, Y., McMahon, S., Dvorak, J., Anderson, O.D., Luo, M.C., Gu, Y.Q. (2009). Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant Molecular Biology* 70,47–61.

International brachypodium initiative. (2010). genome sequencing and analysis of the model grass brachypodium distachyon. *Nature* 463, 763–768.

Jaari, S. ; Li, M.-H. And Merila, J. (2009). "A First-Generation Microsatellite-Based Genetic Linkage Map Of The Siberian Jay (*Perisoreus Infaustus*): Insights Into Avian Genome Evolution." *BMC Genomics* 10(1): 1.

Jaroszewicz, A.M., Kosina, R. et Stankiewicz, P.R. (2012). RAPD, karyology and selected morphological variation in a model grass, *Brachypodium distachyon*. *Weed Research* 52, 204–216.

Jeuken, M., Van, W.R., Peleman, J., and Lindhout, P.(2001). An integrated interspecific AFLP map of lettuce (*Lactuca*) based on two *L. sativa* 3 *L. saligna* F2 populations. *Theories of Applied Genetics* 103,638–647.

Jingjing Yang, Yuanyuan Wang, Huolin Shen and Wencai Yang (2014): *In Silico* Identification and Experimental Validation of Insertion–Deletion Polymorphisms in Tomato Genome. *DNA research*, 1-14.

Jingjing Yang, Yuanyuan Wang, Huolin Shen and Wencai Yang (2014): *In Silico* Identification and Experimental Validation of Insertion–Deletion Polymorphisms in Tomato Genome. *DNA research*, 1-14.

Joshi, A., Do, M. H. and Mueller L. D. (1999). Poisson distribution of male mating success in laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetic Research*. 73, 239–249.

Kashi, Y. et Soller, M. (1999). Functionnal roles of microsatellites and minisatellites. In: *Microsatellites: Evolution and Applications*, 10-23

Kearney, M. (2005). «Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis». *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 20, no 9, p. 495-502.

Kellogg, E.A. (2001). Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125,1198–1205.

Kelly, L.J., Leitch, A.R., Clarkson, J.J., Hunter, R.B., Knapp, S., Chase, M.W., 2009. Intragenic recombination events and evidence for hybrid speciation in *Nicotiana* (Solanaceae). *Molecular Biology and Evolution*, DOI 10.1093/molbev/msp267.

Ketema, S. (1993). Tef (*Eragrostis tef*) breeding, genetic resources, agronomy, utilization and role in Ethiopian agriculture. Institute of Agricultural Research, Addis Ababa, Ethiopia.

Khan, M.A. (1984). Biosystematic studies in *Brachypodium* (Poaceae). Ph.D. thesis, Department of Biology, University of Leicester, United Kingdom.

Khan, M.A. et Stace, C.A. (1999). Breeding relationships in the genus *Brachypodium* (Poaceae: Pooideae). *Nordic Journal of Botany* 19, 257–269.

Khan. (1984). BIOSYSTEMATIC STUDIES IN BRACHYPODIUM (POACEAE). These de doctorat

Khedim A., Khelifi H.E., Dajouchi S, Chafei. S, Laouar M, Abedlguerfi A et M'hamedi-Bouzina M. et al. (2008). Caractérisation de quelques populations spontanées de deux espèces de graminées fourragères : *Dactylis glomerata* L. *Festuca arundinacea* Schreb. Options Méditerranéennes, série A, N° 79. 449-452.

Khiari D., Boussaid M. (2000) Diversité phénotypique de quelques populations de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) en Tunisie. *Tripocultura* : 203-207.

Kijas, J. M. H. ; Fowler, J. C. S. ; Garbett, C. A. And Thomas, M. R. (1994). "Enrichment Of Microsatellites From Citrus Genome Using Biotinylated Oligonucleotide Sequences Bound To Streptavidin-Coated Magnetic Particles." *Biotechniques* 1994 ; 16 : 656-62.

Kim, E. S., Bolsheva, N. L., Samatadze, T. E., Nosov, N. N., Nosova, I. V., Zelenin, A. V., Punina, E. O., Muravenko, O. V. & Rodionov, A. V. (2009). The unique genome of two-chromosome grasses *Zingeria* and *Colpodium*, its origin, and evolution. *Russian J. Genet.* 45, 1329 – 1337.

Kingman JFC (1982) On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability* **19**, 27-43.

Kirby, K.J et Thomas RC. (2000). Changes in the ground flora in Wytham Woods, southern England from 1974 to 1991 — implications for nature conservation. *Journal of Vegetation Science* 11, 871–880.

Kozuharov, S. I. et Nicolova, T. (1975). Cytotaxonomic studies on Bulgarian Gramineae. Bulgarian Academy of Sciences, in honour of Acad. Daki Jordanov, pp. 69-77

Kun Wu, Minmin Yang, Hongyan Liu, Ye Tao, Ju Mei, Yingzhong Zhao (2014). Genetic analysis and molecular characterization of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars using Insertion-Deletion (InDel) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *BMC Genetics*, 15-35.

Kun, Wu., Minmin Yang, Hongyan Liu, Ye Tao, Ju Mei, Yingzhong Zhao (2014). Genetic analysis and molecular characterization of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars using Insertion-Deletion (InDel) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers. *BMC Genetics*, 15-35.

- Kyung Seok Kim, Susan T. Ratcliffe, B. Wade French, Lei Liu and Thomas W. Sappington (2008). Utility of EST-Derived SSRs as Population Genetics Markers in a Beetle. *Journal of Heredity* 112-124.
- Larré, C., Penninck, S., Bouchet, B., Lollier, V., Tranquet, O., Denery Papini, S., Guillon, F., Rogniaux, H.(2010). Brachypodium distachyon grain: identification and subcellular localization of storage proteins. *Journal of Experimental Botany* 61, 1771–1783
- Laura Rodriguez-Murillo et Rany M. Salem, (2013). *Encyclopedia of Behavioral Medicine* p 1076
- Le Floc'H, E. & L. Boulos. (2008). *Flore de Tunisie. Catalogue synonymique commenté*. Montpellier.
- Lebart, L., Morineau, A., Warwick, K.M. (1984). *Multivariate Descriptive Statistical Analysis: Correspondence Analysis and Related Techniques for Large Matrices*, Wiley.
- Lee, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D., et Song, G.G. (2012). Associations between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to vasculitis: A meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone System* 13,196–201.
- Leigh, E.G., Davidar, P., Dick, C.W., et al. (2004). Why do some tropical forests have so many species of trees? *Biotropica* 36, 447-473.
- Lepais, O., Petit, R.J., Guichoux, E. et al. (2009). Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology* 18, 2228-2242.
- Levin, D.A. (2004). The ecological transition in speciation. *New Phytologist* 161, 91-96.
- Liu B, Wang Y, Zhai W, Deng J, Wang H, Cui Y, Cheng F, Wang XW, Wu J. (2013) Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. *Theor Appl Genet*,126(1):231–239.
- Liu, B. and Wendel, J. F. (2002). Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. – *Current Genomics* 3, 1–17.
- Liu, B., Wang, Y., Zhai, W., Deng, J., Wang, H., Cui, Y., Cheng, F., Wang, X.W., Wu, J. (2013). Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. *Theor Appl Genet*,126(1):231–239.

- Long, G.M. (1989). *Morphological and Physiological Variation in Brachypodium sylvaticum*. University of Wales, College of Cardiff, Cardiff, UK.
- Lopez-Alvarez, D., Lopez-Herranz, M.L., Betekhtin, A., et Catalan P. (2012). A DNA barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLoS one* 7(12): 10.1371.
- Loveless MD (1992) Isozyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New For* 6:67-94
- Loveless, M. D. And Hamrick, J. L. (1984). "Ecological Determinants Of Genetic Structure In Plant Populations." *Annual Review Of Ecology And Systematics* 15(Articletype: Research-Article / Full Publication Date: 1984 / Copyright © 1984 Annual Reviews): 65-95.
- Luis A. J. Mur, Joel Allainguillaume, Pilar Catalán, Robert Hasterok, Glyn Jenkins, Karolina Lesniewska, Ianto Thomas et John Vogel Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research. *New Phytologist* 2011;191:334-347.
- Lundmark, M.(2006). «Polyploidization, hybridization and geographical parthenogenesis». *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 21, no 1, p. 9-9.
- Luo et al. (2012) Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu SM, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam TW, Wang J. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience*. 2012;1:18.
- Luo, N., Liu, J., Yu, X., Jiang, Y.(2011). Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiology* 141, 19–29
- Ma, F., Zhao, C., Milne, R., et al. (2010). Enhanced drought-tolerance in the homoploid hybrid species *Pinus densata*: implication for its habitat divergence from two progenitors. *New Phytologist* 185, 204-216.
- Ma, K.-H. ; Kim, N.-S. ; Lee, G.-A. ; Lee, S.-Y. ; Lee, J. ; Yi, J. ; Park, Y.-J. ; Kim, T.-S. ; Gwag, J.-G. And Kwon, S.-J. (2009). "Development Of SSR Markers For Studies Of Diversity In The Genus ;Fagopyrum." *TAG Theoretical And Applied Genetics* 119(7): 1247-1254.
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E., and Colowit, P.M. (1996). Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39, 969–977.

- Madlung, A., Tyagi, A.P., Watson, B., Jiang, H. M., Kagochi, T., Doerge, R. W., Martienssen, R et Comai, L. (2005). "Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids». *Plant Journal*, vol. 41, no 2, p. 221-230.
- Mallet, J. (2008). Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences* 363, 2971-2986.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 229-237.
- Manel, S., Joost, S., Epperson, B., Holderegger, R., Storfer, A., Rosenberg, M.S., Scribner, K.T., Bonin, A., Fortin, M.J. (2010). Perspectives on the use of landscape genetics to detect genetic adaptive variation in the field. *Molecular Ecology* 19, 3760-3772.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.
- Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Bastida, J.M., Weiss-Lehman, T., Raskin, E. and Mitchell-Olds, T. (2012). Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytologist* 193, 797-805
- Maynard Smith J, Haigh J (1974) The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research* 23, 23-35.
- Mcneil, M. ; Hermann, S. ; Jackson, P. And Aitken, K. (2011). "Conversion Of AFLP Markers To High-Throughput Markers In A Complex Polyploid, Sugarcane." *Molecular Breeding* 27(3): 395-407.
- Merilä J. et P. Crnokrak. (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative genetic traits. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 892-903.
- Michael A. Steinwand, Hugh A. Young, Jennifer N. Bragg, Christian M. Tobias, John P Vogel (2013). *Brachypodium sylvaticum*, a Model for Perennial Grasses: Transformation and Inbred Line Development. *Plone one* 0075180
- Millar, M. (2009). "Characterisation Of Microsatellite DNA Markers For The Rare *Acacia Woodmaniorum* (Leguminosae: Mimosaceae)." *Conservation Genetics Resources* 1(1): 441-445.

- Morgan, K.K., Hicks, J., Spitze, K., Latta, L., Pfrender, M.E., Weaver, C., Ottone, M. & Lynch, M. (2001). Patterns of genetic architecture for life-history traits and molecular markers in a subdivided species. *Evolution* 55, 1753–1761.
- Morgante, M. And Olivieri, A. M. (1993). "PCR-Amplified Microsatellites As Markers In Plant Genetics." *The Plant Journal* 3(1): 175-182.
- Nabli, M.A.(1989). Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes: I. Eléments de botanique et de phyto-écologie. Faculté des Sciences de Tunis, p. 247.
- Nagarajan N, Pop M. 2010. Sequencing and genome assembly using next-generation technologies. *Methods Mol Biol* 673:1–17.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89,583–590.
- Nei, M., Fuerst, P.A., Chakraborty, R.(1978). Subunit molecular weight and genetic variability of proteins in natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 3359-3362.
- Nei, M: Genetic distance between populations. *Am Nat* 1972, 283:292.
- Neigel JE (1997) *A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers* Annual Reviews, Palo Alto, CA, United States of America.
- Neji, M., Geuna, F., Taamalli, W., Ibrahim, Y., Smida, M., Abdelly, C and Gandour, M. (2014). Morpho-phenological diversity among Tunisian natural populations of *Brachypodium hybridum*. *Journal of Agricultural sciences*.
- Newman R. A. and Squire T. 2001 Microsatellite variation and finescale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). *Mol. Ecol.* 10, 1087-1100.
- Newton, A.C., Akar, T., Baresel, J.P., Bebeli, P.J., Bettencourt, E., Bladenopoulos, K.V., Czembor, J.H., Fasoula, D.A., Katsiotis, A., Koutis, K *et al.*(2010). Cereal landraces for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 237–269.
- Nielsen R (2005) Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics* 39, 197-218.
- Nordborg M (2004) Coalescent Theory. In: *Handbook of Statistical Genetics*. John Wiley et Sons, Ltd.

- Nosil, P., Funk, D.J. & Ortiz-Barrientos, D. 2009. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Mol. Ecol.* 18: 375–402.
- O'Donnell, K.H., Chen, C.T et Wensink PC .(1994). Insulating DNA Directs Ubiquitous Transcription of the *Drosophila melanogaster* Alpha-l-Tubulin Gene. *Molecular and Cellular Biology* 14, 6398-6408.
- Ohba, H., Amirouche, R.(2003). Observation of the Flora of Tadmait and Tidikelt, Central Sahara, Algeria. *Journal of Japanese Botany* 2003 ; 78 , 104-11.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. New York: Springer-Verlag p.
- Oliveira, E.J., Padua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29, 294-307.
- Ollitrault, F., Terol, J., Martin, A.A., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M., Ollitrault, P. (2012). Development of Indel Markers from Citrus Clementina (Rutaceae) Bac-End Sequences and Interspecific Transferability in Citrus. *Am J Bot*, 99(7):E268–E273.
- Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH. (2008). Brachypodium distachyon: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sciences* .13(4):172-7
- Osborn, I. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S. L., Comai, A., Madlung, R., Doerge, W., Colot, V et Martienssen, R.A. (2003). «Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids». *Trends in Genetics*, vol. 19, no 3, p. 141-147.
- Otto, S. et Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review Genetics* 34, 401–437.
- Otto, S.P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131, 452–462.
- Pacurar D.I., Pacurar M.L., Street N., John Desmond Bussell, Tiberia Ioana Pop, Laurent Gutierrez, and Catherine Bellini (2012). A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven Arabidopsis accessions. *J. Exp. Bot*, 63:2491-501.
- Pacurar, D.I. (2009). Turning a wild plant into a model – A Déjà vu story. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*. 37, 17-24.

Pacurar, D.I., Pacurar, M.L., Street, N., John Desmond Bussell, Tiberia Ioana Pop, Laurent Gutierrez, and Catherine Bellini .(2012). A collection of INDEL markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. *J. Exp. Bot*, 63,2491-501.

Padiál J.M., Miralles A., De la Riva I. & Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7:16.

Page, J. T., M. D. Huynh, Z. S. Liechty, K. Grupp, D. Stelly, A. Hulse, H. Ashrafi, A. van Deynze, J. F. Wendel, and J. A. Udall. 2013. Insights into the evolution of cotton diploids and polyploids from whole-genome re-sequencing. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 3:1809-1818

Palmé AE (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* 11, 1769-1779.

Paszko B. (2008). The variability of natural populations of *Brachypodium pinnatum* and *B. sylvaticum* based on morphological features - *Acta Soc. Bot. Poloniae*, **77**: 255–262.

Paterson, A.H., Bowers, J.E., Chapman, B.A.(2004). Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 101,9903–9908.

Paterson, A.H., Chapman, B. A., Kissinger, J. C., Bowers, J. E., Feltus, F. A., Estill, J. C.(2006). Many gene and domain families have convergent fates following independent whole-genome duplication events in *Arabidopsis*, *Oryza*, *Saccharomyces* and *Tetraodon*. *Trends in Genetics* 22, 597–602.

Peakall ,R et Smouse P.E. GenAlEx 6. (2006). genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6,288–295.

Pemberton, J. M. ; Slate, J. ; Bancroft, D. R. And Barrett, J. A. (1995). "Nonamplifying Alleles At Microsatellite Loci: A Caution For Parentage And Population Studies." *Molecular Ecology* **4**(2): 249-252.

Peraldi, A., Beccari, G., Steed, A., Nicholson, P .(2011). *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. *BMC Plant Biology* 11: 100

Petit, R.J. (2004). Biological invasions at the gene level. *Diversity and Distributions* 10, 159-165.

- Polans N. O. et Allard R. W. (1989). An experimental evaluation of the recovery potential of ryegrass populations from genetic stress resulting from restriction of population size. *Evolution* 43 (6):1320- 1324.
- Pometti, C. ; Bessega, C. ; Vilardi, J. And Saidman, B. (2012). "Landscape Genetic Structure Of Natural Populations Of &Lt ;I&Gt ;Acacia Caven In Argentina." *Tree Genetics & Genomes*: 1-14.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P.(2005). Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6, 847-859.
- POTTIER–ALAPETITE, G. (1979-1981). Flore de la Tunisie : Angiospermes – Dicotylédones. Vol.1 : Apétales et Dialypétales. 651 pp. (1979). Vol.2 : Gamopétales. 529 pp. (1981). *Publ. Scient. Tunisienne*, Tunis
- Powell, W. ; Machray, G. C. And Provan, J. (1996a). "Polymorphism Revealed By Simple Sequence Repeats." *Trends In Plant Science* 1(7): 215-222.
- Powell, W. ; Morgante, M. ; Andre, C. ; Hanafey, M. ; Vogel, J. ; Tingey, S. And Rafalski, A. (1996b). "The Comparison Of RFLP, RAPD, AFLP And SSR (Microsatellite) Markers For Germplasm Analysis." *Molecular Breeding* 2(3): 225-238.
- Prasad, V., Strömberg, C.A.E., Ali mohammadian, H., Sahni, A. (2005). Dinosaur coprolites and the early evolution of grasses and grazers. *Science* 310,1177–1180.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2):945–959.
- Qi, L.L., Friebe, B., Zhang, P., Gill, B.S. (2007). Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement. *Chrom. Res* 15, 3–19.
- Raijmann, L. E. L., N. C. van Leeuwen, R. Kersten, J. G. B. Oostermeijer, J. C. M. den Nijs and S. B. J. Menken. (1994). Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conserv. Biol.* 8: 1014-1026.
- Ramsey, J et Schemske,D.W.(1998). «Pathways, Mechanisms, and Rates of Polyploid Formation in Flowering Plants». *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol. 29, p. 467-501.

- Rand, D. M. (1996). "Neutrality Tests Of Molecular Markers And The Connection Between DNA Polymorphism, Demography, And Conservation Biology." *Conservation Biology* **10**(2): 665-671.
- Rhyne, C.L., 1962. Enhancing linkage-block breakup following interspecific hybridization and backcross transference of genes in *Gossypium hirsutum* L. *Genetics* 47, 61-69.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science* 317: 910–914.
- Rieseberg, L. H., O. Raymond, D. M. Rosenthal, Z. Lai, K. Livingstone, T. Nakazato, J. L. Durphy, A. E. Schwarzbach, L. A. Donovan, and C. Lexer. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301:1211–1216.
- Rieseberg, L.H., Willis, J. (2007). Plant speciation. *Science* 317, 910 - 914.
- Rifka Hammami, Nicolás Jouve, Consuelo Soler, Eva Frieiro, Juan Manuel González (2014). Genetic diversity of SSR and ISSR markers in wild populations of *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*: 231-238
- Robertson, K.R., Goldberg, E.E., and Igic, B. (2011). Comparative evidence for the correlated evolution of polyploidy and self-compatibility in *Solanaceae*. *Evolution* 65, 139-155.
- Roda, F.(2011). *The genomic basis of ecological speciation in plants*, University of Queensland.
- Rosegrant & Cline .(2003). Global Food Security: Challenges and Policies. *Science* 302, 1917
- Rosenberg NA et Nordborg M (2002). Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* **3**, 380-390.
- Rosenthal, D. M., Ramakrishnan A. P., and Cruzan M. B. (2008). Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17(21): 4657–1669.
- Rosenthal, D. M., Ramakrishnan A. P., and Cruzan M. B. (2008). Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17(21): 4657–1669.

- Rosenthal, M., Ramakrishnan, P. RAMAKRISHNAN et Cruzan ,B. (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology* 17, 4657–4669
- Rowe G, Beebee TJC (2004) Reconciling genetic and demographic estimators of effective population size in the anuran amphibian *Bufo calamita*. *Conservation Genetics*, 5, 287–298.
- Russell, A.F., Hatchwell, B.J .(2001). Experimental evidence for kin-biased helping in a cooperatively breeding vertebrate. *Proceedings of the Royal Society -Biological Sciences (Series B)* 268, 2169-2174.
- S. Ouled Dhaou, K. Jeddi, M. Chaieb (2010). Les Poaceae en Tunisie : systématique et utilité thérapeutique. *Phytothérapie* 8: 145–152
- Sage, R.F. (2004). The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytologist* 161, 341–370.
- Salmon, A.(2005). «Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina*(Poaceae)». *Molecuar Ecology*, vol. 14, no 4, p. 1163.
- Salse, J., Bolot, S., Throude, M., Jouffe, V., Piegu, B., Quraishi, U.M., Calcagno, T., Cooke ,R., Delseny, M., Feuillet, C.(2008).
- Salvini, D. ; Bruschi, P. ; Fineschi, S. ; Grossoni, P. ; Kjær, E. D. And Vendramin, G. G. (2009). "Natural Hybridisation Between *Quercus Petraea* (Matt.) Liebl. And *Quercus Pubescens* Willd. Within An Italian Stand As Revealed By Microsatellite Fingerprinting." *Plant Biology* 11(5): 758-765.
- Sampson, J.F., Byrne, M. (2012). Genetic diversity and multiple origins of polyploid *Atriplex nummularia* Lindl. (Chenopodiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*105,218-230.
- Santoni, S. ; Faivre-Rampant, P. ; Prado, E. And Prat, D. (2000). "Marqueurs Moléculaires Pour L'analyse Des Ressources Génétiques Et L'amélioration Des Plantes." *Cahiers D'études Et De Recherches Francophones / Agricultures* 4: 311-27.
- Scheid, O. M., Jakovleva,L., Afsar,K., Maluszynska,J ., et J. Paszkowski.(1996). «A change of ploidy can modify epigenetic silencing». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no 14, p. 7114-7119.
- Schippmann, U., Jarvis, C.E., Typification of three Linnean names associated with the genus *Brachypodium* (Poaceae) *Taxon*. 1988;37:158–164.

- Schlötterer, C.(2004). The evolution of molecular markers -just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5, 63-69.
- Schut, J. W., X. Qi and P. Stam, 1997 Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1161–1168.
- Schwartz, C.J., Doyle, M.R., Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Mitchell-Olds, T., & Amasino, R.M. (2010). Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenergy research* 3, 38-46
- Sean P. Gordon, Henry Priest, David L. Des Marais, Wendy Schackwitz, Melania Figueroa, Joel Martin, Jennifer N. Bragg, Ludmila Tyler, Cheng-Ruei Lee, Doug Bryant², Wenqin Wang, Joachim Messing, Antonio J. Manzaneda, Kerrie Barry, David F. Garvin, Hikmet Budak, Metin Tuna, Thomas Mitchell-Olds, William F. Pfender, Thomas E. Juenger, Todd C. Mockler et John P. Vogel (2014). Genome Diversity in *Brachypodium distachyon*: Deep Sequencing of Highly Diverse Inbred Lines. 'Accepted Article', doi: 10.1111/tpj.12569
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 198-207.
- Shan, X., Liu, Z., Dong, Y., Wang, Y., Chen, X., Lin, L., Long, F., Han, Y., Dong et B. Liu. (2005). «Mobilization of the Active MITE Transposons mPing and Pong in Rice by Introgression from Wild Rice (*Zizania latifolia* Griseb.)»>. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 22, no 4, p. 976-990.
- Sharma, R. K. ; Bhardwaj, P. ; Negi, R. ; Mohapatra, T. And Ahuja, P. S. (2009). "Identification, Characterization And Utilization Of Unigene Derived Microsatellite Markers In Tea (*Camellia Sinensis* L.)." *BMC Plant Biol* 9: 53.
- Shaw, J. et R. Small. (2005). Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*, Rosaceae). *American Journal of Botany* 92: 2011-2030.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 393-430.
- Slatkin M (1994) Linkage Disequilibrium in Growing and Stable-Populations. *Genetics* 137, Slatkin, M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*

Slavov, G. T. ; Leonardi, S. ; Burczyk, J. ; Adams, W. T. ; Strauss, S. H. And Difazio, S. P. (2009). "Extensive Pollen Flow In Two Ecologically Contrasting Populations Of *Populus Trichocarpa*." *Molecular Ecology* **18**(2): 357-373.

Soltis, D. E., et Soltis, P. S.. (1995). «The Dynamic Nature of Polyploid Genomes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no 18, p. 8089-8091.

Soltis, D. E., et Soltis, P. S.. (1999). «Polyploidy: recurrent formation and genome evolution». *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 14, no 9, p. 348-352.

Soltis, D.E., Soltis, P.S.(2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60, 561–588.

Soltis, P. S. et Soltis, D. E. (2000). The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *National Acadimy of sciences USA* 97, 7051-7057.

Soltis, P. S., et D. E. Soltis. (2000). «The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no 13, p. 7051-7057.

Spitze, K.(1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135, 367–374.

Stebbins, G. L. et Crampton, B. (1961). A suggested revision of the grass genera of temperate North America. In: *Recent Advances in Botany*, 1, 133-145. University of Toronto Press.

Stockwell, C.A., Hendry, A.P., Kinnison, M.T. (2003). Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends of Ecological Evolution* 18, 94–101.

Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., *et al.* (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24, 3189-3194.

Takahata N, Satta Y, Klein J (1992) Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility complex Loci. *Genetics* **130**, 925-938.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. et Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731–2739.

Tanaka, A. ; Ohtani, M. ; Suyama, Y. ; Inomata, N. ; Tsumura, Y. ; Middleton, B. ; Tachida, H. And Kusumi, J. (2012). "Population Genetic Structure Of A Widespread Coniferous Tree, *Taxodium Distichum* [L.] Rich. (Cupressaceae), In The Mississippi River Alluvial Valley And Florida." *Tree Genetics & Genomes*: 1-13.

Tateoka, T. (1968). Phylogeographical notes on the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Gramineae).

Tautz D, Ellegren H, Weigel D (2010) Next generation molecular ecology. *Molecular Ecology*, 19, 1–3.

Tautz, D. (1989). "Hypervariability Of Simple Sequences As A General Source For Polymorphic DNA Markers." *Nucleic Acids Research* **17**(16): 6463-6471.

Taylor S. H., Franks P. J., Hulme S. P., Spriggs E., Christin P. A., Edwards E. J., Woodward F. I. et C. Osborne P. (2012): Photosynthetic pathway and ecological adaptation explain stomatal trait diversity amongst grasses. *New Phytologist*. 193(2):387-96

Tefera, H., Assefa, K., Hundera, F., Kefyalew, T. & Teferra T. (2003). Heritability and genetic advance in recombinant inbred lines of tef (*Eragrostis tef*). *Euphytica* 131, 91-96.

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). *Nature* 408, 796-815

Thole, V., Worland, B., Wright, J., Bevan, M.W., Vain, P. (2010). Distribution and characterization of more than 1000 T-DNA tags in the genome of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Plant Biotechnology Journal* 8, 734–747.

Trethowan, R.M. & Mujeeb-Kazi, A. (2008). The use of novel germplasm resources to improve the environmental stress tolerance of hexaploid wheat. *Crop. Sci* 48, 1255-1265.

Vafaie-Tabar, M., Chandrashekar, S., (2007). Meiosis in a triploid hybrid of *Gossypium*: high frequency of secondary bipolar spindles at metaphase II. *Journal of genetics* 86, 45-49.

Väli Ü, Brandström M, Johansson M, Ellegren H: Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics* 2008, **9**:8.

Väli, Ü., Brandström, M., Johansson, M., Ellegren, H: Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics* 2008, 9:8.

Vasemagi A, Gross R, Palm D, Paaver T, Primmer CR: Discovery and application of insertion-deletion (INDEL) polymorphisms for QTL mapping of early life-history traits in

Atlantic salmon. *BMC Genomics* 2010, 11:156.

Vasemagi, A., Gross, R., Palm, D., Paaver, T., Primmer, C.R: Discovery and application of insertion-deletion (INDEL) polymorphisms for QTL mapping of early life-history traits in Atlantic salmon. *BMC Genomics* 2010, 11:156.

Vogel, J., Garvin,D.F., Leong,O., and Hayden, D.M. (2006a). *Agrobacterium*- mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 84,199–211.

Vogel, J.P., Gu, Y.Q., Twigg,P., Lazo, G.R., Laudencia-Chingcuanco,D., Hayden, D.M., Donze, T.J., Vivian, L.A., Stamova,B., and Coleman-Derr,D. (2006b). EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theories of Applied Genetics* 113,186–195.

Vogel, J.P., Tuna, M., Budak, H., Huo, N., Gu, Y.Q. & Steinwand, M.A. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* 9, 88

Vos, P. ; Hogers, R. ; Bleeker, M. ; Reijans, M. ; Lee, T. V. ; Hornes, M. ; Friters, A. ; Pot, J. ; Paleman, J. ; Kuiper, M. And Zabeau, M. (1995). "AFLP: A New Technique For DNA Fingerprinting." *Nucleic Acids Research* **23**(21): 4407-4414.

Wang R-L, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley J (1999) The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-239.

Wang, X. ; Mathieu, A. ; Cournède, P. H. ; Allirand, J. M. ; Jullien, A. ; De Reffye, P. And Zhang, B. G. (2011). "Variability And Regulation Of The Number Of Ovules, Seeds And Pods According To Assimilate Availability In Winter Oilseed Rape (*Brassica Napus* L.)." *Field Crops Research* **122**(1): 60-69.

Watson, L & Dallwitz, MJ. (1992). The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Version: 28th November 2005. <http://delta-intkey.com>.

Weising, K. ; Atkinson, R. G. And Gardner, R. C. (1995). "Genomic Fingerprinting By Microsatellite-Primed PCR: A Critical Evaluation." *Genome Research* **4**(5): 249-255.

- Wellington, F. Nascimento., Jucelene, F. Rodrigues., Samantha Koehler, Paul Gepts and Elizabeth A. Veasey (2013). Spatially structured genetic diversity of the Amerindian yam (*Dioscorea trifida* L.) assessed by SSR and ISSR markers in Southern Brazil. *Genet Resour Crop Evol*
- Wellington, F.d.N., Edson, F. d. S. & Elizabeth A.V. (2011). Agro-morphological characterization of upland rice accessions. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 68, 652-660.
- Welsh, J et McClelland, M. (1990). fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 , 7231-7218.
- Wendel, J. F., Doyle, J. J. (2005). Polyploidy and evolution in plants. *Diversity and evolution in plants* 97–117.
- Widén, B. (1993). Demographic and genetic effects on reproduction as related to population size in a rare, perennial herb, *Senecio integrifolius*. *Biological Journal of the Linnean Society* 21, 123-125
- Widmer A. et Baltisberger M. (1999). Extensive intraspecific chloroplast DNA (cpDNA) variation in the alpine *Draba azidoides* L. (Brassicaceae): haplotype relationships and population structure. *Molecular Ecology* 8: 1405-1415.
- Wilks SS. 1932. Certain generalizations in the analysis of variance. *Biometrika* 24: 471–494.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18,6531-6535.
- Wolfe, K.H. (2001). "Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization" *Nature review of genetics* 2 (5): 333–41.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28, 114-138.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugen. (Lond.)* 15, 323-354.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16 (2): 97–159.
- Xiaohong, Yao., Qigang, Ye., Ming Kang and Hongwen Huang. (2007). Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China; *New Phytologist* 176, 472–480.

Xinchun Mo, Ju Gao, Lizhi Gao (2013). Characterization of Microsatellite Markers and Their Application to Genetic Diversity Analysis of *Brachypodium sylvaticum* var. *breviglume* from Yunnan, China. *American Journal of Plant Sciences* ; 4, 1427-1434.

Xinchun, M.o, Ju Gao, Lizhi Gao .(2013). Characterization of Microsatellite Markers and Their Application to Genetic Diversity Analysis of *Brachypodium sylvaticum* var. *breviglume* from Yunnan, China. *American Journal of Plant Sciences* ; 4, 1427-1434.

Yu Cui, Mi Yeon Lee, Naxin Huo, Jennifer Bragg, Lijie Yan, Cheng Yuan, Cui Li, Sara J. Holditch, Jingzhong Xie, Ming-Cheng Luo, Dawei Li, Jialin Yu, Joel Martin, Wendy Schackwitz, Yong Qiang Gu, John P. Vogel, Andrew O. Jackson mail, Zhiyong Liu mail, David F. Garvin (2012). Fine Mapping of the Bsr1 Barley Stripe Mosaic Virus Resistance Gene in the Model Grass *Brachypodium distachyon*. DOI: 10.1371/journal.pone.0038333.

Zhou, M. L. ; Bai, D. Q. ; Tang, Y. ; Zhu, X. M. And Shao, J. R. (2012). "Genetic Diversity Of Four New Species Related To Southwestern Sichuan Buckwheats As Revealed By Karyotype, ISSR And Allozyme Characterization." *Plant Systematics And Evolution* **298**(4): 751-759.

Ziegenhagen, B. And Fladung, M. (2005). "DNA Markers For Identification And Evaluation Of Genetic Resources In Forest Trees: Case Studies In *Abies*, *Picea* And *Populus*. In. *Molecular Marker Systems In Plant Breeding And Crop Improvement.*" *Biotechnology In Agriculture And Forestry* **55**: 478p.

Zribi, M., Paris, anguela, T., Duchemin, B., Lili, Z., Wagner, W., Hasenauer, S. & Chehbouni, A. (2010). Relationship between soil moisture and vegetation in the kairouan plain region of Tunisia using low spatial resolution satellite data. *Water Research Ressources* 46, W06508.

Zuzana Swigonova, Jinsheng Lai, Jianxin Ma, Wusirika Ramakrishna, Victor Llaca, Jeffrey L. Bennetzen and Joachim Messing (2004). *Comparative and Functional Genomics* 5: 281–284.

ANNEXE

Tableau A : La liste des marqueurs microsatellites utilisés.

ID	U.R	N.R	Dérivé de	Amorce R	Queue M13 + Amorce F	Taille (bp)	F	G
ALB008	ctt	13	EST	ATGGGCGAGAAGA CAGAGAA	M13-ACGGGAACTCACCATTTTCAC	112-135	NED	A
ALB030	ttg	9	EST	GTAGTCCAGCCCCA TCTTCC	M13-CGTCCGCAAGCTTGTTTT	151-155	VIC	A
ALB040	ctt	8	EST	AGTCCCTCCTCGC TAAGG	M13-CCCTGCTTCCCTCTCTCTCT	176-190	PET	A
ALB056	gt	10	EST	TCCACAGAGCACCA CAGAAG	M13-TCCTCTGGTTCCTGAGATCG	249-257	FAM	A
ALB086	aag	7	EST	CAACTGATCCCAG CTCTTC	M13-GTCCGGAACCAACGAAAAC	188-196	VIC	A
ALB087	agc	7	EST	GACTTGATGAAGCC CTGCTC	M13-ACAGGCAGCAGCAGGAAC	194-204	FAM	A
ALB089	cag	7	EST	TGAGTCGAATAAGC CGGAAG	M13-CTTCACCCAGCTGCTCATC	202-214	PET	A
ALB100	gca	7	EST	CAGGTACGTCACCA GGTTCA	M13-GCGCTCCTTGAGCTGTATTG	233-265	PET	A
ALB131	ggc	7	EST	GACACATCGTTGGC AATGTC	M13-CAACGGAGTGGTACGTTGTG	293-300	FAM	B
ALB139	aga	7	EST	TGTACCGGAGGAT AAGTCC	M13-GTGCCAAATCCAAGAAGGAA	304-313	PET	B
ALB158	gaa	14	BES	TGTCTTGTCCCCTGC GATA	M13-CGGAGACGACGACAGAGG	248-252	FAM	B
ALB230	atct	6	BES	TAAAGGGGCAAATT GCAAAG	M13-TCGCAATGAAACCCTAGGTC	260-264	PET	B
ALB256	tgca	5	BES	TTCAGTTTCTTCATT TC CTACGG	M13-CCTTCTTCTCAGCGACCTGT	188-191	VIC	B
ALB372	tatc	9	BES	GGTGC GCAATGGAG ATAGAT	M13-TCTAGGCTCCGTTCCGAGTA	176-208	NED	B
ALB445	gaaa	7	BES	CACCAGCGTTTACG TAGCAG	M13-GTTCAGTGGGTCGAGTCAA	205-226	PET	B

U.R : unité répétitive ; N.R : nombre de répétitions ; F : fluorochrome ; G : groupe de multiplexage

Tableau B : La liste des 24 InDels testés (les 8 InDels utilisés pour toute l'analyse en gras)

ID	Position in the genome	Primer F	Primer R
1	Bd1:19396875-19397520	AGACACCCACAACGTCATCA	GTGAGGTCGAAGGCAAAATG
2	Bd1:3929592-3930564	TCAAAGCACAAAAACGTTTCG	TGGATTATGACGTGGATCGT
3	Bd1:53541858-53542539	CACCGGAGAAATCAAGCAAC	GCGATTCCACCTAGGATTGT
4	Bd1:62877167-62877895	TGTACCTAAGGGCTTTCATGG	TCTACGAGTCCTCGGAGGTG
5	Bd2:102918-103619	CTGCTGTGCGCTCTAACAAT	AGAGAATCACCCCTGCCTCAA
6	Bd2:4941937-4942694	GATGACGAAGCAAACACACG	CATCCGTGTTTCATGGCCTA
7	Bd3:15078416-15079063	TGAACGGAGTTACACCCATTT	CATTTGGGCTGAGGAATTTT
8	Bd3:2321443-2322127	AAGGGTGTCTGAAGCTCAT	CCATCAGCTGTTGACTGTGC
9	Bd4:12224341-12225128	ATGCCTACCCACTTCTTCCA	AACGATTGCTGTTCACTGA
10	Bd4:30688612-30689222	AAGCAACAGGCACACCATCT	TGGGCAAAGAAGAAGAAAGTT
11	Bd5:14644134-14644915	GACAGCGGTGGTCTGCTTAT	GCTGATTGTGGAAGAGAGAGG
12	Bd5:1783664-1784369	TATGAGCTATGTGGCGTGGA	TGAGTTCAGATTTTGTGCAGA
13	Bd2:10768901-10769559	GCACGCTGAGAGGAAAATCT	AACAGCTCAACGAGGACACA
14	Bd2:26038441-26039244	GAAGGAAATGGGAACCACAA	TTCGGTGTGTTGTCCAAGAA
15	Bd2:36945805-36946433	AGGAAAGGGCACTCTTGACA	GGCCGATTTATGCTTTTCTG
16	Bd2:50648383-50649047	CATGACACAATCTGCCTCGT	TCTCTTCGCACGAATCTTGA
17	Bd3:22380246-22380872	CGGGGAGGAAGTTAAATGAC	CTTGACGTTGTTCCCTAGC
18	Bd3:38418885-38419613	AGCAGAGAAAAGGATGGGAAG	GGCTGCTGCTGTTGGATATT
19	Bd3:48848974-48849645	CGTGTGTTAAGCCCAAAAGC	AGGAGACATTTGCCCCCTAT
20	Bd4:27580404-27581034	TTGATTAGTTGCCCCAGAG	AACGGCTACCAACAACCAGT
21	Bd4:40734762-40735424	GGCTGCTGAGATCTTTTGCT	TACAGCAGGGACCTTTTTC
22	Bd4:46881522-46882214	CGTCTCGATGCCCTGTAGA	TTTGAGGTTCTGCGGAGATT
23	Bd5:1923297-1923950	TTGGTAGACAACCTAGACATGCCTTAC	TTTTGCAACACACTGCCATC
24	Bd5:19053980-19054773	CACCCCTTATAGCGTGCAACA	TTGGTTTGTGCCAACAACCTG