

**Evaluation du polymorphisme des prolamines
comme marqueurs de la diversité interspécifique chez le genre
Avena L. (Poaceae)**

Aissat Assia, Trabsi Smail, Amirouche Rachid, Amirouche Nabila

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Faculté des Sciences Biologique, Laboratoire
de Biologie et Physiologie des Organismes - Equipe *Biosystématique, Génétique et Evolution*. USTHB, BP 32
El-Alia, Bab Ezzouar, 16111, Alger

aissat_assia@hotmail.fr;trabsis@yahoo.fr;ramirouche@hotmail.com;namirouche@hotmail.com

Résumé

Le polymorphisme des protéines de réserve et des avénines, a été testé pour évaluer la diversité de trois espèces spontanées polyploïdes de la flore algérienne : deux annuelles colonisatrices *Avena barbata* et *A. sterilis* et une vivace endémique *A. macrostachya*. Les résultats ont montré une nette différenciation interspécifique corrélée au niveau de ploïdie et aux facteurs de l'environnement. Les affinités entre *A. sterilis* et l'espèce cultivée *A. sativa*, utilisée ici comme référence, soulignent l'importance des espèces spontanées comme ressources phylogénétiques.

Mots clés : *Avena* - prolamines - avénines - diversité - polyploïdie

Summary

The polymorphism of seed storage proteins and avenins has been used to assess the diversity of three spontaneous polyploid species of the Algerian flora: two annual and colonizing species *Avena barbata* and *A. sterilis*, and one endemic and perennial *A. macrostachya*. Results showed a clear interspecific differentiation correlated with ploidy level and environmental factors. The affinities between *A. sterilis* and the cultivated *A. sativa*, used here as a reference, highlight the importance of spontaneous species as resource for plant improvement.

Keywords: *Avena* - prolamines - avenins - diversity - polyploidy

ملخص

تم اختبار تعدد أشكال البروتينات الاحتياطية لتقييم تنوع ثلاثة من النباتات التلقائية الجزائرية: اثنان منها سنوية هي *Avena barbata* و *A. sterilis*، واحدة معمرة و منوطنة هي *A. macrostachya*. أظهرت النتائج وجود تمايز واضح بين الأنواع النباتية مرتبط بمستوى الصبغة الصبغية والعوامل البيئية. إن أوجه الترابط بين *A. sterilis* والأنواع المزروعة *A. sativa* المستخدمة هنا كمرجع، تسلط الضوء على أهمية الأنواع التلقائية كموارد وراثية نباتية.

الكلمات المفتاحية: *Avena* - البروتينات - التنوع - تعدد الصبغ الصبغية

1. INTRODUCTION

Le genre *Avena* L. (Poaceae) comprend plus de 26 taxons dont l'espèce communément cultivée *A. sativa* L., (Badaeva *et al.*, 2005; Loskutov, 2008). Dans la flore algérienne, ce genre est représenté par 12 taxons spontanés annuels ou vivaces, autogames ou allogames, avec trois niveaux de ploïdie $2n = 2x = 14$, $2n = 4x = 28$ et $2n = 6x = 42$.

La diversité spécifique, la polyploïdie et l'amplitude écologique font de ces taxons, une précieuse source de gènes d'intérêt. En effet, leur taux particulièrement élevé en prolamines, leur résistance aux pathogènes et leur tolérance aux conditions extrêmes de température sont des caractéristiques recherchées pour les programmes d'amélioration des avoines cultivées (Leggett *et al.*, 1992). Plus généralement chez de nombreuses Poaceae, l'hétérogénéité des prolamines s'est avérée un outil résolutif dans les études de la variabilité intra et inter spécifique et de ses relations avec les facteurs environnementaux (Amirouche et Misset, 2003 ; Branlard, 2009; Boczkowska *et al.*, 2017).

L'objectif de cette étude est d'évaluer le polymorphisme électrophorétique des avénines, protéines de réserve spécifiques des avoines, comme marqueur de diversité et d'adaptation. L'approche s'appuie sur trois espèces spontanées représentatives du genre *Avena* : *A. barbata* Pott., *A. sterilis* L. et *A. macrostachya* Bal. Les deux premières sont des annuelles respectivement tétraploïde ($2n=4x=28$) et hexaploïde ($2n=6x=42$) ; *A. macrostachya* Bal., est en revanche une avoine vivace tétraploïde ($2n=4x=28$), endémique des monts du Djurdjura et des Aurès.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Trois populations correspondant à *A. barbata*, *A. sterilis* et *A. macrostachya* ont été récoltées dans le nord de l'Algérie respectivement dans un maquis préforestier de l'Atlas Tellien, en bordure d'une formation rudérale littorale et dans les pelouses du Djurdjura (Tableau 1 ; Figure 1).

Tableau 1. Caractéristiques des espèces étudiées et des stations de récolte

Taxon	Ploïdie	Station	Altitude (en m)	Bioclimat	Formation végétale
<i>A. barbata</i>	$2n=4x=28$	Boghni	400	Sub-humide	Clairière de maquis préforestier
<i>A. macrostachya</i>	$2n=4x=28$	Tikjda	1750	Humide	Pelouse à <i>Festuca</i> , <i>Bromus</i> et <i>Hordeum bulbosum</i>
<i>A. sterilis</i>	$2n=6x=42$	Bab-Ezzouar	10	Sub-humide	Formation rudérale de bord de champ

Une quatrième espèce, *Avena sativa* L. est utilisée comme référence; c'est l'espèce communément cultivée, représentée ici par les variétés *saba* et *hamel* fournies par le Centre National de Contrôle et Certification des semences et plantes (CNCC).



Figure 1. Photographies *in situ* des trois espèces d'avoines spontanées étudiées. (a) : *Avena barbata* ($2n=4x=28$); (b) : *Avena sterilis* ($2n=6x=42$) ; (c) : *Avena macrostachya* ($2n=4x=28$)

2.2. Extraction des protéines de réserve

Les protéines totales et la fraction des avénines ont été extraites selon le protocole préconisé par l'UPOV (1994). Les extractions sont effectuées sur environ 100 mg de farine de caryopse. Les caryopses sont broyées dans un mortier puis triturés dans un tube Eppendorf avec 1500 μ l de solution d'extraction constituée de 28.33 ml de solution tampon de base, 7.91 ml de 2-mercaptoéthanol, 15 ml de DMF (diméthylformamide) et d'eau distillée (QSP 100 ml). Pour les avénines, un volume d'isopropanol équivalent à 50% de la solution d'extraction, a été rajouté. Le tampon de base contient 6,25 ml de tampon Tris-HCl 1M à pH 6.8, 12.05 ml d'eau distillée, 2g de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10 mg de pyronine G et 10 ml de glycérol.

2.3. Electrophorèses

La séparation des prolamines totales et des avénines a été effectuée par SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Les gels de résolution sont respectivement de 15% et 13%; le gel de concentration est à 5% dans les deux cas. La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine 0.5 M, pH 4.5, 0.2% SDS sous 20 mA. Les gels sont fixés pendant 30 mn dans 100 ml d'une solution à 15% TCA (Acide trichloracétique). Après rinçage, le gel est placé dans 150 ml de solution de coloration à température ambiante durant 12 heures environ. La solution de coloration est composée de 25 ml d'une solution A, 55g de TCA, 65 ml d'acide acétique glacial, 180 ml de méthanol et d'eau distillée (QSP 1000 ml). La solution A comporte 0.25 g de bleu de Coomassie G-250, 0.75g de bleu de Coomassie R-250 ajustée à 100 ml d'eau distillée. Les gels sont ensuite décolorés dans l'acide acétique à 10%.

2.4. Traitements statistiques

Après lecture et analyse des électrophorégrammes, des matrices de présence absence de bande ont été constituées. Elles serviront de base aux analyses multivariées : Classifications Ascendantes Hiérarchiques (CAH) et Analyses des Correspondances (AC) réalisées à l'aide du logiciel STATISTICA software package (StatSoft Inc. 1984-1997) version 5.1.

3. RESULTATS

3.1. Diversité des protéines totales

Les électrophorégrammes des protéines totales ont révélé trois zones de migration bien distinctes A, B et C comportant au total 29 électromorphes (Figure 2). C'est la zone intermédiaire B qui est la plus variable avec un nombre élevé d'électromorphes (> 11). Les zones de migration A et C sont constituées d'un faible nombre de bandes (< 6). La combinaison des 29 électromorphes a permis de spécifier 5 phénotypes principaux (P1 à P5), comprenant de 17 à 21 bandes.

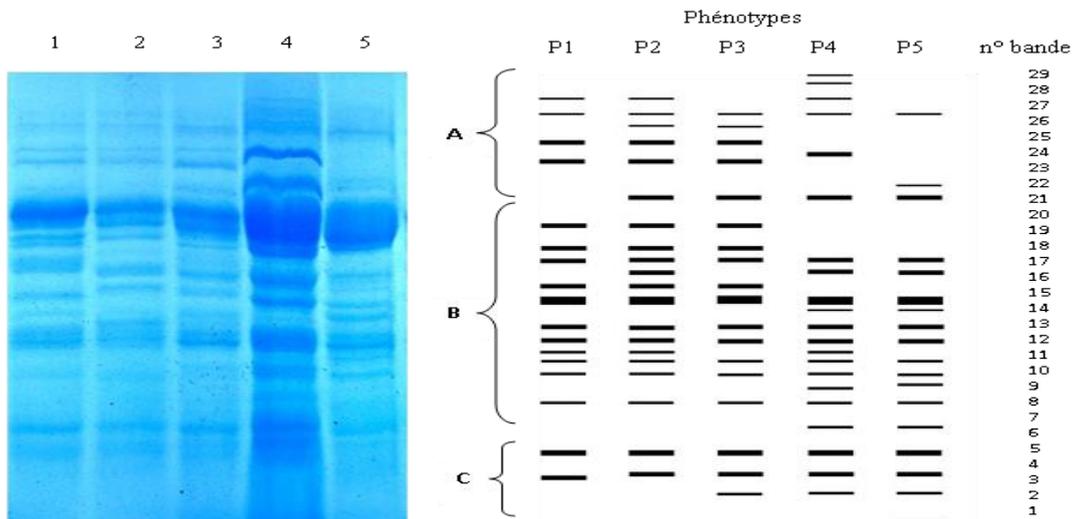


Figure 2. Electrophorégramme et principaux phénotypes des protéines totales chez quatre espèces d'avoines. 1-P1 : *A. sativa* var. *saba*; 2-P2 : *A. sativa* var. *hamel*; 3-P3 : *A. sterilis*; 4-P4 : *A. barbata*; 5-P5 : *A. macrostachya*.

3.2. Diversité des avénines

Les électrophorégrammes d'avénines montrent également 3 zones de migration distinctes avec seulement 10 électromorphes (Figure 3). La zone anodique rapide comporte 3 électromorphes (1, 2 et 3), la zone intermédiaire 4 bandes (4, 5, 6 et 7) et la zone lente cathodique 3 électromorphes (8, 9 et 10). Cinq 5 phénotypes sont établis.

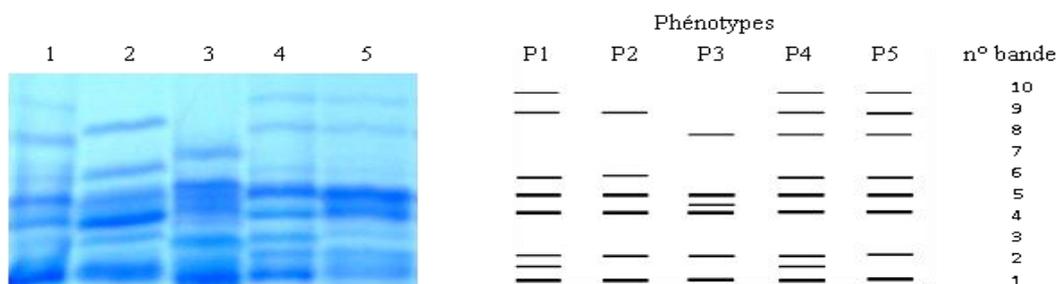


Figure 3. Electrophorégramme et principaux phénotypes d'Avénines chez quatre espèces d'avoines. 1-P1: *Avena sterilis*; 2-P2 : *A. barbata*; 3-P3: *A. macrostachya*; 4-P4: *A. sativa* var. *saba*; 5-P5: *A. sativa* var. *hamel*.

3.3. Relations interspécifiques et polyplœdie

Chaque taxon est caractérisé par des électromorphes et donc par un profil particulier tant pour les protéines totales que pour les avénines.

La classification ascendante hiérarchique réalisée sur la base des protéines totales (Figure 4a) montre 2 clusters bien individualisés. Le cluster I associe à une distance $d < 1.25$, les espèces hexaploïdes ($2n=42$), *A. sterilis* et les 2 variétés d'*A. sativa*. Le cluster II regroupe à $d < 1.75$, les tétraploïdes ($2n=28$) *A. barbata* et *A. macrostachya*.

Cette différenciation entre espèces polyplœides 6x et 4x, est mise en exergue par l'analyse des correspondances (Figure 4b). *A. barbata* et *A. macrostachya* sont en effet positionnées dans la partie positive de l'axe 1 se distinguant l'une de l'autre par trois (23, 28 et 29) et deux électromorphes (1 et 21) mais partageant trois bandes (5, 7 et 13). Dans la partie négative de l'axe 1, l'espèce spontanée *A. sterilis* montre de fortes affinités avec *A. sativa*; chez ces deux espèces hexaploïdes, le nombre de bandes est compris entre 17 à 20 dont plusieurs sont partagées.

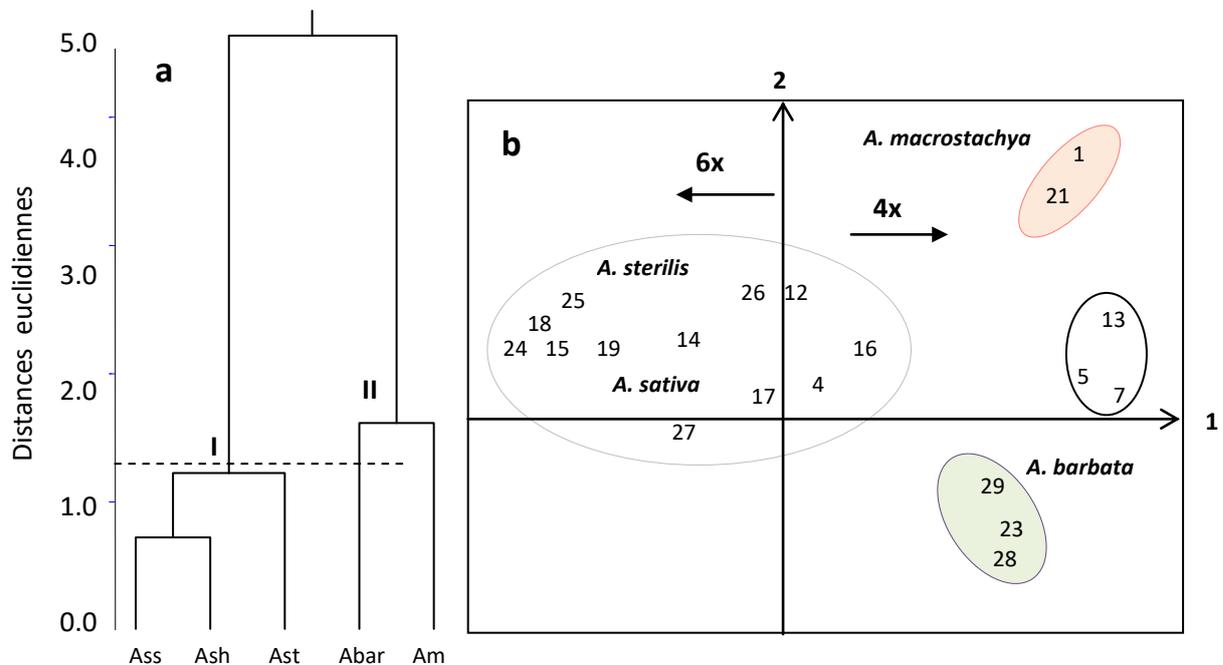


Figure 4. Classification hiérarchique (a) et Analyse des correspondances (b) de quatre espèces d'avoine, basées sur le polymorphisme des protéines totales.

Am: *Avena macrostachya*; Ast: *A. sterilis*; Abar: *A. barbata*; Ash: *A. sativa* var. *hamel*; Ass: *A. sativa* var. *saba*.

L'analyse des phénotypes d'avénines montre un nombre de 6 électromorphes chez les tétraploïdes *A. barbata* et *A. macrostachya* tandis que ce nombre est de 8 et 9 électromorphes respectivement chez les hexaploïdes *A. sterilis* et *A. sativa*.

Tant en classification hiérarchique qu'en analyse des correspondances (Figures 5a et 5b), la diversité des avénines accentue la différenciation des espèces. L'espèce vivace endémique *A. macrostachya* d'une part et l'espèce annuelle *A. barbata* d'autre part se distinguent nettement des deux autres espèces hexaploïdes *A. sterilis* et *A. sativa*.

La différenciation entre tétraploïdes est due à un électromorphe (5) propre à *A. macrostachya* et deux électromorphes (7 et 9) propres à *A. barbata*. Les similitudes entre les hexaploïdes *A. sterilis* et *A. sativa* sont dues aux électromorphes 2 et 10.

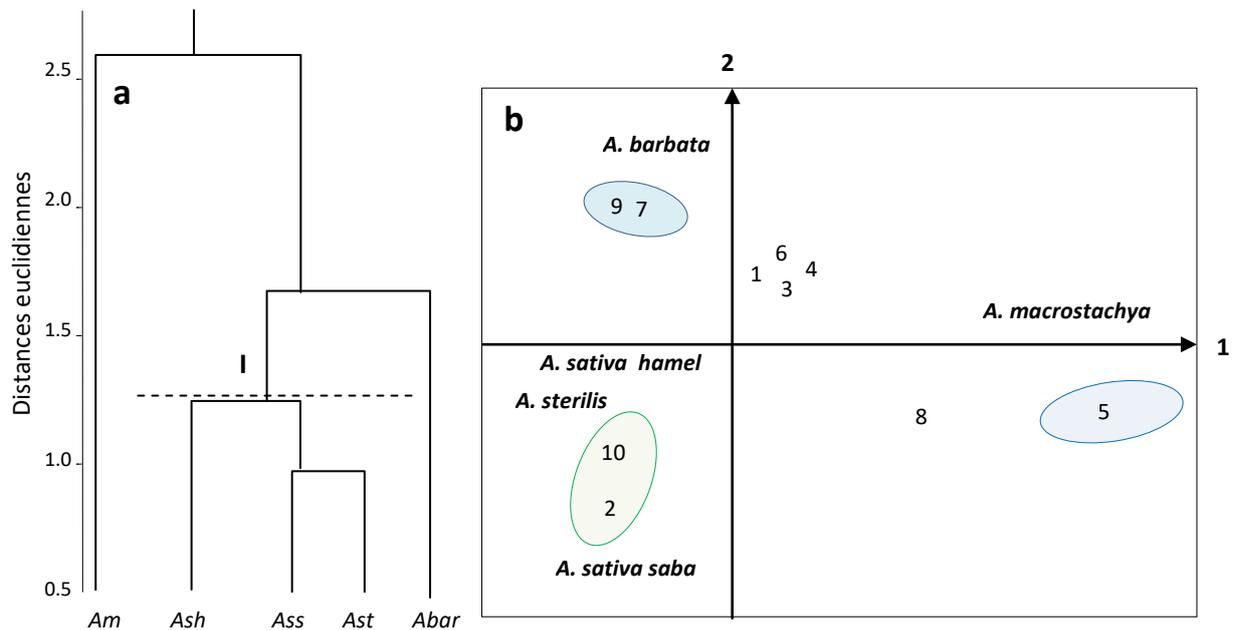


Figure 5. Classification hiérarchique (a) et Analyse des correspondances (b) de quatre espèces d'avoine, basées sur le polymorphisme des avénines. Am: *Avena macrostachya*; Ast: *A. sterilis*; Abar: *A. barbata*; Ash: *A. sativa* var. *hamel*; Ass: *A. sativa* var. *saba*.

4. DISCUSSION

La diversité des protéines de réserve et des avénines a été détectée chez un grand nombre de Poaceae de différents groupes taxonomiques et, en particulier, chez les plantes cultivées et leurs apparentées spontanées (Daussant *et al.*, 1983 ; Gepts, 1990 ; Alvarez *et al.*, 2006).

Chez des espèces spontanées du genre *Hordeum* (Nevo, 2001 ; Amirouche et Missset, 2003) et du genre *Aegilops* (Bandou *et al.*, 2009), le polymorphisme des prolamines est relié également à la polyploïdie et aux facteurs écologiques.

Les avénines sont utilisées comme marqueurs d'identification de cultivars d'avoine (Peterson et Brinegar, 1986 ; Smith et Smith, 1992). Des études sur différents génotypes notamment de l'avoine cultivée ont montré que la variabilité des avénines est en relation directe avec le niveau de ploïdie et l'origine écogéographique des taxons (Kim *et al.*, 1979; Portyanko *et al.*, 1998 ; Mirza *et al.*, 2007; Dumlupinar *et al.*, 2011; Boczkowska *et al.*, 2017).

5. CONCLUSION

L'analyse du polymorphisme électrophorétique des protéines de réserve et des avénines, a permis de révéler une nette différenciation de 3 espèces spontanées de la flore algérienne : deux annuelles *Avena barbata* et *A. sterilis* et une vivace endémique *A. macrostachya*. Cette différenciation corrélée à la polyploïdie et aux facteurs de l'environnement, se traduit par la présence d'électromorphes propres à chaque taxon.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alvarez J.B., Moral A., Martin L.M. 2006. Polymorphism and genetic diversity for the seed storage proteins in Spanish cultivated einkorn wheat *Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*. *Genet. Resour. Crop Ev.* 53:1061-1067.
- Amirouche R., Misset M.T. 2003. Hordein polymorphism in diploid and tetraploid Mediterranean populations of the *Hordeum murinum* L. complex. *Plant Syst Evol* 242: 83-99.
- Badaeva E.D., Loskutov I.G., Shelukhina O.Yu., Pukhalsky V.A. 2005. Cytogenetic analysis of diploid *Avena* L. species containing the As genome. *Russ J Genet* 41(12): 1428-1433.
- Bandou H., Rodriguez-Quijano M., Carrillo J.M., Branlard G., Zaharieva M. 2009. Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. *Plant Syst Evol* 277: 85-97.
- Branlard G. 2009. Gluten proteins. in Genetic diversity and Ecophysiology of cereals. edition de l'INRA, pp 379.
- Boczkowska M., Zebrowski J., Nowosielski J., Kordulasinska I., Nowosielska D., Podyma W. 2017. Environmentally-related genotypic, phenotypic and metabolic diversity of oat (*Avena sativa* L.) landraces based on 67 Polish accessions. *Genet Resour Crop Evol* 64: 1829-1840
- Daussant J., Mossé J., Vaughan J. 1983. Seed proteins. Academic Press, London and New York. 319p.
- Dumlupinar Z., Dokuyucu T., Akkaya A. 2011. Identification of Turkish oat landraces (*Avena sativa* L.) based on avenin proteins by SDS page technique. *Turkish Journal of Field Crops*, 16(2): 190-196.
- Gepts P. 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: Brown, A.H.D, Clegg, M.T., Kahler, A.L. Weir, B.S. (Eds.): *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA. pp 64-82.
- Kim S.I. Saur L., Mosse J. 1979. Summon Features of the Inheritance of Avenins, the Alcohol Soluble Proteins of Oat. *Theor. Appl. Broom.* 54: 49-54.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leggett J.M., Ladizinsky G., Hagberg P., Obanni M. 1992. The distribution of nine *Avena* species in Spain and Morocco. *Can. J. Bot.* 70: 240-244.
- Loskutov I.G. 2008. On evolutionary pathways of *Avena* species. *Genet Resour Crop Evol* 55: 211-220.
- Mirza B., Shoaib M., Ahmad M., Fu Y.B. 2007. Genetic diversity in Pakistani populations of *Avena fatua* revealed by seed storage protein polymorphism. *Communications in Biometry and Crop Science* 2(1): 41-48.
- Nevo E. 2001. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 98:6233-6240.
- Peterson D.M., Brinegar A.C. 1986. Oat storage proteins, In: Webster, F.H. (Ed.): *Oats: Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA pp.153-203.
- Portyanko V.A., Sharopova N.R., Sozinov A.A. 1998. Characterisation of European oat germplasm: allelic variation at complex Avenin loci detected by acid polyacrylamide gel electrophoresis. *Euphytica* 102: 15-27.
- Smith J.S.C., Smith O. S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 46: 85-128.
- UPOV. 1994. Principes directeurs pour la conduite de l'examen des caractères distinctifs de l'homogénéité et de stabilité de l'orge (*Hordeum vulgare* L. *sensu lato*). 69 p.