

## CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE QUELQUES RACES PRIMITIVES TUNISIENNES "LANDRACE" DE FÈVES-FÉVEROLE (*VICIA FABA* L)

DAKHALOUI Abir<sup>1</sup>, KHAMASSI Khalil<sup>2\*</sup>, BABAY Elyes<sup>3</sup>, ROUISSI Mustapha<sup>4</sup> et CHAAR Hatem<sup>5</sup>

1. University of Carthage, National Agronomic Institute of Tunisia (INAT), 43 Avenue Charles Nicolle, Tunis 1082, Tunisia
2. University of Carthage, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Field Crop Laboratory (LR16INRAT02), Rue Hédi Karray, PC 1004, Menzah 1, Tunis, Tunisia.
3. National Gene Bank of Tunisia, Street Yesser Arafet, 1080, Tunis, Tunisia
4. University of Carthage, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Agricultural Applied Biotechnology Laboratory, Rue Hédi Karray, PC 1004, Menzah 1, Tunis, Tunisia.
5. University of Carthage, National Agronomic Institute of Tunisia (INAT), Field Crop Laboratory (LR16INRAT02), 43 Avenue Charles Nicolle, Tunis 1082, Tunisia

Reçu le 18/05/2019, Révisé le 16/06/2019, Accepté le 19/06/2019

### Résumé

**Description du sujet :** Le germoplasme local est souvent exposé à l'érosion génétique. La perte de la biodiversité pourrait être accélérée par l'introduction de variétés améliorées, l'échange de semences non contrôlées entre les agriculteurs ou par le progrès agricole impliquant l'intensification et la perte progressive du savoir local par l'utilisation des variétés améliorées. D'où l'intérêt de mener des recherches visant l'inventaire, la caractérisation et la conservation du germoplasme ou races primitives "Landraces" locales de fève et féverole.

**Objectifs :** La présente étude a pour but la caractérisation moléculaire d'une collection de 18 accessions de fève-féverole Tunisienne moyennant les marqueurs moléculaires microsatellites "SSR" afin d'étudier s'il existe une diversité génétique au sein de ce germoplasme local.

**Méthodes :** L'évaluation de la diversité génétique a été faite moyennant 12 paires d'amorces SSR appliquée sur l'ADN génomique extrait de 18 individus.

**Résultats :** Le dendrogramme de similarité a permis de regrouper les génotypes selon leurs degrés de similitude et de différence en cinq groupes distincts. Le premier groupe (Gr1) : est formé par trois sous-groupes SGr : Le premier sous-groupe (SGr1) est formé par l'accession « Memdouh ». Le deuxième sous-groupe (SGr2) renferme deux fèves «02-04», «03-01» et quatre féveroles «Chourouk», «79-5'», «202-lot 2», «202-lot 3» et «Najeh». A partir d'un pourcentage de similarité de 88%, l'accession «79-5'» (féverole) et l'accession «02-04» (fève) sont génétiquement très proches. Le troisième sous-groupe (SGr3) comporte quatre féveroles «FAB-6434», «FAB-6641», «205-Bulk» et «01-02» une févette «FAB 5042». Le deuxième groupe (Gr2) est formé par la variété de fève «02-05». Le troisième groupe (Gr3) est occupé par la variété de féverole «02-06». Le quatrième groupe (Gr4) est formé par l'accession de fève «FAB-7111» et l'accession de féverole «Badii». Le cinquième groupe (Gr5) est occupé par la variété de fève «01-05».

**Conclusion :** Il ressort de tout ce qui précède que ce travail a fourni des données utiles pour le traitement technologique des graines, l'élaboration des stratégies de conservation et de gestion durable du patrimoine génétique, la meilleure utilisation du germoplasme et pour l'amélioration génétique de *Vicia faba*.

**Mots clés :** Germoplasme local, variété primitive "Landraces", diversité génotypique, SSR, microsatellite

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME TUNISIAN PRIMITIVE RACES "LANDRACE" OF BROAD-BEANS

### Abstract

**Subject description:** The local germoplasm is often exposed to genetic erosion. Biodiversity loss can be accelerated by improved variety introduction, uncontrolled seed exchange between farmers or by agricultural progress involving local knowledge intensification and progressive loss through the use of improved varieties. Germoplasm or local early races « landraces » of bean or broad beans inventory, characterisation and conservation research are aimed to be carried out

**Objectives:** This research is aimed to study molecular characterization of a collection of 18 accessions of a tunisian broad bean provided the microsatellite molecular markers « SSR » to study needs if genetics diversity exist within local germoplasm

**Methods:** Genetic diversity evaluation have been done provided 12 primer pairs SSR applied on genomic DNA extracted from 18 individuals

**Results:** The similarity dendrogram allowed to group genotype according to their degrees of similarity and differences in five separates groups. The first group (Gr1) is formed by three subgroups SGr: the first subgroup (SGr1) is composed by «Memdouh» accession. The second subgroup (SGr) contain two beans «02-04», «03-01» and four broad bean «Chourouk», «79-5'», «202-lot 2», «202-lot 3» and «Najeh» from a similarity percentages of 88%, the accession «79-5'» (broad bean) and the accession «02-04» beans are genetically very close. The third subgroup (Gr3) include four broad bean «FAB-6434», «FAB-6641», «205-Bulk» and «01-02» fava beans «FAB 5042». The second subgroup (Gr2) is formed by bean variety «02-05». The third group (Gr 3) is occupied by broad bean variety «02-06». The fourth group (Gr4) is formed by beans accession «FAB-7111» and broad bean accession «Badii». The fifth group (Gr5) is occupied by bean variety «01-05».

**Conclusion :** It stands out From all the above, this work has provided useful data for seeds technological treatment. Strategies development for genetic stock conservation and sustainable management, the best use of germplasm and genetic improvement of *Vicia faba*.

**Key words:** Local germoplasm, early variety «Landraces», genotypic diversity, SSR, microsatellite

\* Auteur correspondant: KHAMASSI khalil, E-mail : khalil.khamassi@iresa.agrinet.tn

## INTRODUCTION

De nos jours, la diversité biologique et en particulier l'agro-biodiversité sont confrontés à diverses contraintes telles que le changement climatique et l'accroissement de la population mondiale menaçant son existence et sa richesse. Ce qui a poussé l'organisation mondiale des Nations Unies à signer la convention cadre universelle en 1992, à Rio de Janeiro, lors du Sommet de la Terre, ratifiée rapidement par plus de 170 pays. Ceci a permis la mise en place du premier traité international relatif à la protection des êtres vivants et de leurs écosystèmes connus sous le nom du 'traité International des ressources Génétiques Végétales pour l'Alimentation et l'Agriculture [1]. Ce traité a considéré la conservation des ressources génétique comme une préoccupation commune de toute l'humanité et a incité les Etats à être responsables de la conservation et la durabilité de leur diversité biologique. La Tunisie a été parmi les premiers pays à avoir ratifié cette Convention, montrant un grand intérêt à protéger son patrimoine génétique et à contribuer à la préservation du patrimoine biologique de l'humanité. En effet, la Tunisie, a adopté toute une politique de gestion durable de l'environnement via la création du ministère de l'environnement et du développement durable. Outre, les agences et offices œuvrant sous la tutelle de ce ministère, on trouve la banque nationale de gènes de Tunisie qui a été créée en 2007 avec un mandat principal de la conservation des ressources génétiques végétales, animales ainsi que la coordination et la promotion des activités des conservation et d'utilisation durable des ressources génétiques [2]. La Tunisie, en particulier et l'Afrique du nord d'une façon globale constituent un centre de diversification primaire et secondaire de plusieurs espèces agricoles et sauvages où on dénombrerait plusieurs cultivars qui portaient souvent le nom de l'agriculteur qui les a sélectionnés ou de la localité où ils étaient cultivés. La Tunisie est un pays caractérisé par des régions très divergentes d'un point de vue pédoclimatique, et géographique. Cela se reflète non seulement dans le grand nombre d'espèces cultivées, mais aussi dans la variabilité génétique des différents individus constituant l'espèce. Ces dernières incluent des variétés anciennes ou traditionnelles du pays (écotypes), qui ont toujours existé ou qui ont été introduites depuis longtemps. Ces génotypes constituent un potentiel génétique intéressant pour les programmes d'amélioration des plantes [2].

L'espèce *Vicia faba* L. (fèves) est l'une de ces espèces. Depuis son lointaine introduction au pays elle ne cesse de présenter un rôle important sur le plan nutritionnel et écologique. En effet, cette espèce est une source considérable de protéines végétales pour l'alimentation humaine et animale avec (18 à 28% Ms) [3, 4]. Cette légumineuse (Fabacée) est utilisée aussi comme une tête de rotation grâce à ses restitutions azotées très importantes. Sa domestication très ancienne, depuis l'âge néolithique [5, 6], a favorisé sa variabilité génétique [7, 8]. Cependant cette variabilité est intra spécifique vue que cette espèce est isolée génétiquement dans le genre *Vicia* [9,10]. En effet, une large collection de germoplasme de *Vicia faba*, dépassant 2470 accessions, a été collectée par l'ICARDA à travers des prospections dans plusieurs zones de cultures surtout méditerranéennes [11]. La Tunisie, est considérée comme un centre de diversité biologique de *Vicia faba* [12]. Cette espèce est la principale fabacée cultivée depuis longtemps dans des systèmes agronomiques traditionnels au Nord-Ouest [13] et au Sud Tunisien [14, 12]. Elle occupe environ 75% des superficies consacrées aux légumineuses à graines, soit 54455 ha environ durant la campagne agricole 2016-2017 [15]. Le germoplasme local est souvent exposé à l'érosion génétique. La perte de la biodiversité a été accélérée par l'introduction de variétés améliorées, l'échange de semences non contrôlées entre les agriculteurs [16], le progrès agricole impliquant l'intensification et la perte progressive du savoir local. D'où l'intérêt de mener des recherches visant l'inventaire, la caractérisation et la conservation du germoplasme local de fève et féverole.

Plusieurs travaux ont caractérisé la variabilité génétique des collections cultivées dans des régions méditerranéennes en se basant sur des marqueurs morphologiques [17, 18, 19, 20, 21, 12 et 22]. Cette caractérisation phénotypique est très utile pour estimer la valeur agronomique et technologique des accessions, mais elle n'est pas informative concernant les relations phylogénétiques entre les génotypes car elle est influencée par l'environnement. De ce fait, cette méthode doit être épaulée par les techniques de marquage moléculaire. Les marqueurs moléculaires constituent de nos jours, des indicateurs très efficaces de la variabilité génétique. Les microsatellites SSR sont considérés comme des marqueurs utiles pour la caractérisation de routine du germoplasme de *Vicia faba* [23, 24] et pour la cartographie génétique [25],

grâce à leur codominance, leur taux élevé de polymorphisme (PIC) et leur capacité d'analyser la variabilité intra-population [26, 27].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude comprend dix-huit accessions Tunisiennes de *Vicia faba* L. de trois origines différentes : populations locales collectées (Tableau 2), populations anciennes (*Landraces*)

Tunisiennes rapatriées de la banque de gènes allemande et qui ont été collectées dans les années soixante-dix (Tableau 3) et des variétés améliorées témoins (Tableau 4).

### 1.1. Variété primitives locales collectées "Landraces"

Une partie du matériel génétique a été collectée auprès des agriculteurs de différentes localités du Nord-Ouest Tunisien lors d'un travail de prospection. La figure 1 et Tableau 1 indiquent les zones de collecte.

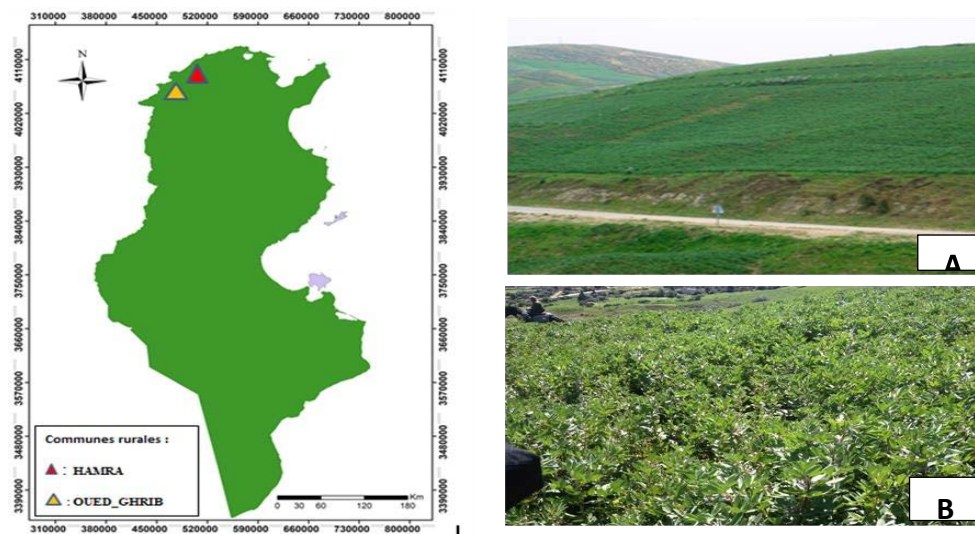


Figure 1: Localisation géographique de différentes régions de collecte des accessions locales de *Vicia faba* L. A : Amdoun ; B : Fernana.

Tableau 1: Données sur les zones de collecte de *Vicia faba*

| Agriculteurs | Localité_région | Gouvernerat | Altitude (m) | Précipitation (mm) |
|--------------|-----------------|-------------|--------------|--------------------|
| AG1          | Amdoun          | Béja        | 379,31       | 600                |
| AG2          | Amdoun          | Béja        | 410,99       | 600                |
| AG3          | Fernana         | Jendouba    | 222,10       | 700                |

La collecte s'est déroulée en Mars 2018 et s'est basée sur le prélèvement d'un échantillon de semences en vrac « mélange » de la récolte de la campagne agricole précédente (2017-2018). Elle a concerné que les agriculteurs qui cultivent les variétés primitives locale "landrace" depuis des générations sans avoir fait de la sélection au sein de leur germoplasme d'après leur témoignage lors de la collecte.

### 1.2. Subdivision des Landraces en échantillons selon la morphologie de la graine

La taille de l'échantillon collecté était suffisamment large (1kg/ landrace/agriculteur) pour représenter la variabilité existante. L'échantillon de semences (en vrac) a été subdivisé en sous-groupes (lots homogènes) distingués selon la morphologie de la graine ou son type (fève ou féverole). La figure 2 indique les sous populations *Vicia faba* collectées à fernana (Jendouba) et à amdoun (Béja).



Figure 2 : Landraces de *Vicia faba* collectées  
 A : à Fernana (gouvernorat Jendouba), B : Amdoun (Gouvernorat Béja)

Le Tableau 2 résume les échantillons qui vont faire l'analyse moléculaire après subdivision de l'échantillon collecté chez l'agriculteur en vrac en sous-groupe selon la morphologie ou le

type de la graine. Une seule graine a été sélectionnée comme un représentant du sous-groupe et qui va faire l'objet de l'étude moléculaire.

Tableau 2 : Liste des échantillons de *Vicia faba* L. des landraces collectés au Nord-Ouest Tunisien

| id | CodeINRAT    | Type   | Observations                     |
|----|--------------|--|----------------------------------|
| 1  | 4 79 5'      | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) |                                  |
| 2  | 8 02_04      | Fève ( <i>Vicia faba</i> var. <i>major</i> )     | AG2 : Agriculteur 2 (tableau 1)  |
| 3  | 9 02_05      | Fève ( <i>Vicia faba</i> var. <i>major</i> )     | AG2 : Agriculteur 2 (tableau 1)  |
| 4  | 10 02_06     | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | AG2 : Agriculteur 2 (tableau 1)  |
| 5  | 11 202 lot 2 | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | Sélection population locale      |
| 6  | 12 202 lot 3 | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | Sélection population locale      |
| 7  | 13 205 bulk  | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | Sélection population locale      |
| 8  | 15 01_05     | Fève ( <i>Vicia faba</i> var. <i>major</i> )     | AG3 : Agriculteur3 : (tableau 1) |
| 9  | 17 01_02     | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | AG1 : Agriculteur1 : (tableau 1) |
| 10 | 18 03_01     | Fève ( <i>Vicia faba</i> var. <i>major</i> )     | AG3 : Agriculteur3 : (tableau 1) |

**1.3. Matériel végétal rapatrié de l'Allemagne**

L'autre partie du matériel végétal a été fournie par la banque de gène de L'Institut de Leibniz de génétique végétale et de recherche sur les

plantes cultivées en Allemagne (Tableau 3). Ce matériel correspond à des accessions collectées en Tunisie dans les années 70 et conservées dans la banque de gènes de cet institut

Tableau 3 : Echantillons de *Vicia faba* L. locaux conservés en Allemagne

| 17 id | Code INRAT | Type   |
|-------|------------|--|
| 18 3  | FAB_5042   | Fèvette ( <i>Vicia faba</i> var. <i>equina</i> ) |
| 19 5  | FAB_6434   | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) |
| 20 6  | FAB_7111   | Fève ( <i>Vicia faba</i> var. <i>major</i> )     |
| 21 7  | FAB_6641   | Féverole ( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) |

**1.4. Variétés locales améliorées (témoins)**

En plus de ces populations locales, nous avons pris, comme témoins quatre cultivars Tunisiens de *Vicia faba* L. (Tableau 4).

**2. Extraction d'ADN**

Les graines des vingt-quatre accessions ont été semées dans des pots de végétation remplis avec un mélange de perlite, de sable et de tourbe dans un ratio de 1 : 1 : 2 respectivement. Deux graines par échantillon ont été semées à une profondeur de 2cm de la surface du pot.

Deux à trois jeunes feuilles écailleuses de chaque individu ont été prélevées à partir d'une plante dans chaque pot et placées directement dans l'azote liquide afin d'éviter l'oxydation et la dégradation de l'ADN.

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le Protocole de Tanksley modifié [28]. Les étapes sont indiquées comme suivant : Le matériel végétal collecté a été mis dans des tubes eppendorfs de 2ml de volume. On a ajouté à chaque tube 600 µL de la micro-préparation d'extraction d'ADN (Tableau 5) préalablement chauffée à 65°C.

Elle sert à la lyse membranaire, l'inactivation de l'ADNase et la dénaturation des protéines. Deux billes en céramique en été ajouté à chaque tube, avant de placées les tubes dans un broyeur automatique ou Homogénéiseur (Fast Prep®24, MP Biomedicals, Ohio, USA) pour

la lyse mécanique des feuilles. Après purification et précipitation de l'ADN, la dissolution des pellets d'ADN a été faite dans l'eau ultra pure stérile (Gibco) à rasion de 100 µl par tube.

Tableau 4 : Accessions Témoins de *Vicia faba* L.





| Accession | Code INRAT | Type  | Date d'inscription | Photo  |
|-----------|------------|---|--------------------|--|
| 22        | Memdouh    | Fève<br>( <i>Vicia faba</i> var. <i>major</i> )     | 2009               |   |
| 23        | Chourouk   | Fèverole<br>( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | 2014               |   |
| 24        | Najeh      | Fèverole<br>( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | 2009               |   |
| 25        | Badii      | Fèverole<br>( <i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i> ) | 2003               |  |

Tableau 5 : Composition de la micro-préparation d'extraction d'ADN [28].

| Micro préparation d'extraction d'ADN                   | 100 échantillons |
|--|------------------|
| 2.5x tampon d'extraction d'ADN CTAB 2X (*)             | 25 ml            |
| 2.5x tampon de lyse                                    | 25 ml            |
| 1x 5% Sarkosyl   | 10 ml            |
| Sodium Bisulfite                                       | 0,2g             |
| Solution RNaseDnase-free (Qiagen)                      | 60µl             |
| Total volume à compléter avec l'eau ultrapure à 100 ml | 100 ml           |

(\*) Le tampon d'extraction CTAB 2 X (Céthyl Bromure de Trimethyl Ammonium): est composé de 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB et 0.2% β Mercapto-éthanol.

### 3. Technique microsatellite (Simple Sequence Repeat ou SSR)

L'analyse SSR a été réalisée en utilisant 3µl d'ADN dilué à partir de l'ADN extrait de nos échantillons de *Vicia faba* et onze paires d'amorces ont été utilisées. Les caractéristiques de ces amorces ainsi que le milieu réactionnel sont présentés dans les tableaux suivants respectivement (Tableaux 6

,7). Les PCRs ont été faites en réunissant dans un même tube (0,2 ml) les différentes composantes du milieu réactionnel mentionnées dans le (Tableau 7) pour avoir un volume total de 25 µl/tube. Les conditions d'amplification ainsi que la composition du milieu réactionnel ont été optimisées suite à plusieurs essais (Tableau 7).

Tableau 6 : Liste des amorces SSR utilisés

| Amorces | Séquences   | Motif                   | Taille attendue (pb) | Tm (°C) |
|---------|---|-------------------------|----------------------|---------|
| P27     | F-5'- CGGGTTTATCCATCATTT -3'<br>R -5'- CGTTATTGTTGTCGCTATTT -3'         | (CGA)6                  | 230                  | 58      |
| VFG87   | F-5'- AACTGTTCAACGGTAT -3'<br>R -5'- GGAGTGATTAGAAGGTAG -3'             | (ATGCA)3                | 154                  | 58      |
| VFG34   | F-5'- AGATGGGAGCTGAGAATGAT -3'<br>R -5'- TTAAACCAAACAACAGAGT -3'        | (AAT)5                  | 200                  | 58      |
| GAI67   | F-5'- GATTCAGAGAAAAGGTGGAAAGC -3'<br>R -5'- GTCACATGATGAAGCTAGATGGC -3' | (CT)18                  | 248                  | 58      |
| GAI68   | F-5'- GATGTGAAGCGCAAGTGACTG -3'<br>R -5'- GCAATTTCCGGTCAGTGGC -3'       | (CT)2TT(CT)19           | 285                  | 58      |
| GATA2   | F-5'- GACGCACCCTACTGCATCAC -3'<br>R -5'- GGTGTCCTCCACCAGGTAACCTCG -3'   | (GA)3(GATA)4(GA)4       | 152                  | 56      |
| JF1AG3  | F-5'- GTGGTCGAAAACCTGACAAGA -3'<br>R -5'- GGAGCATCCTGAATCCAAGTACC -3'   | (GAA)5                  | 211                  | 58      |
| JF1AG2  | F-5'- GTGGTCGAAAACCTGACAAGA -3'<br>R -5'- GGAGCATCCTGAATCCAAGTACC -3'   | (GAA)5                  | 211                  | 55      |
| GA6     | F-5'- GAAAGGTTTTCTGATTCCAACAA-3'<br>R -5'- GACAGTGTACGTAGACCCACGC-3'    | (GA)2GT(GA)8T<br>A(GA)6 | 184                  | 58      |
| JF1AAC2 | F-5'- GATCTATGCGACACAACATGTAT-3'<br>R -5'-GCTCACATCCAAAGTTGAATC-3'      | (AG)15                  | 147                  | 55      |
| GA2     | F-5'- GTGTCCTGTGGTGTCCAAATTA-3'<br>R -5'- TGCATACCGGAGAAATTCAAG-3'      | (CAC)5 (CAA)6           | 444                  | 58      |

Tableau 7: Le mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR.

| Composantes       | Concentration initiale | Concentration finale | Volume/échantillon(µl) |
|-------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| H <sub>2</sub> O  |                        |                      | 13,2                   |
| Buffer            | 10 x                   | 1 x                  | 2                      |
| MgCl <sub>2</sub> | 50 mM                  | 2 mM                 | 0,8                    |
| dNTPs             | 10 mM                  | 0,2 mM               | 0,4                    |
| AmorceF           | 20 µM                  | 0,2 µM               | 0,2                    |
| Amorce R          | 20 µM                  | 0,2 µM               | 0,2                    |
| Taqpolymerase     | 5 U/µl                 | 1 U/µl               | 0,2                    |
| ADN               | -                      | -                    | 2                      |

Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur selon un programme composé des cycles bien déterminés pour chaque amorce comme suit (Tableau 8):

Tableau 8 : programme de la PCR pour l'amplification des amorces SSR

| Nombre de cycles |                  | Température (°C) | Temps   |
|------------------|------------------|------------------|---------|
| 1                | Pré-dénaturation | 94°C             | 5 (min) |
|                  | Dénaturation     | 94°C             | 25 S    |
|                  | Hybridation      | TA°C             | 25 S    |
| Extension        |                  |                  |         |
| 1                |                  | 72°C             | 1 (min) |
|                  | Post-extension   | 72°C             | 5 (min) |

#### 4. Séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification obtenus, ont été séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose de haute résolution (Promega) à 2 % (concentration). La révélation des bandes a été faite par le trempage dans un bain de BET (bromure

d'éthidium), puis l'observation des profils électrophorétiques a été faite sous rayons UV en utilisant le Gel doc « Vilber Lourmat». L'estimation de la taille des bandes amplifiées a été assurée grâce au marqueur du poids moléculaire 100 pb DNA step Ladder de (GeneON, Allemagne).

L'utilisation du logiciel biofusion V.18 (Vilber Lourmat), nous a permis d'analyser les différents profils électrophorétiques obtenus suite aux différentes amplifications de l'ADN des lignées de *Vicia faba* L. étudiées moyennant les onze marqueurs SSRs utilisés.

### 5. Calcul des fréquences alléliques

La fréquence allélique est calculée comme suit :

$$P_i = \frac{\text{nombre d'allèle pour chaque locus}}{\text{nombre total d'allèle de tous les locus}}$$

### 6. Calcul du Polymorphic information content (PIC)

Le PIC (Polymorphism Information Content) est la somme totale du polymorphisme de tous les marqueurs produits par une amorce particulière, il est déterminé selon Botstein *et al.* [29] et Anderson [30], en utilisant la formule suivante :  $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$ . Où  $P_i$  est la fréquence allélique à un locus.  $P_i$  est sommé à travers toutes les bandes révélées par l'amorce.

### 7. Calcul des distances génétiques

Les distances génétiques sont calculées à partir de la matrice des individus en réponse aux marqueurs, grâce à l'indice de similitude en utilisant le logiciel (NTSYSpc V2.2) [31]. Ce type de distance permet d'évaluer la relation entre les accessions étudiées et le niveau de rapprochement génétique entre elles.

### 8. Dendrogramme phylogénétique

Le dendrogramme est construit sur la base des distances génétiques ou des bandes des profils électrophorétiques en utilisant les onze marqueurs microsatellites. Il est construit pour exprimer la distance génétique entre les dix-huit accessions *Vicia faba* L. Le dendrogramme est reconstitué à partir de la matrice des distances en utilisant la moyenne arithmétique des distances entre les éléments regroupés par la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*). Cette méthode est choisie sur la base des travaux antérieurs ayant montré que la classification UPGMA est mieux adaptée que la classification NJ (*NeighborJoining*). En effet l'UPGMA donne une meilleure structuration des groupes avec des embranchements plus robustes. Le programme NTSYSpc V2.2 [31] est ensuite utilisé pour construire un arbre à partir des distances de Jaccard calculées à partir des données initiales.

## RÉSULTATS & DISCUSSION

### 1. Analyse de la diversité génétique des accessions locales, au niveau moléculaire

La diversité génétique d'une collection de 18 accessions de *Vicia faba* locales a été évaluée moyennant 11 paires d'amorces microsatellites:

Deux marqueurs VFG34, VFG87 [9], 7 marqueurs : JF1AAC2, JF1AG3, JF1AG2, GA 2, GA II8, GAI67, GA II 68, GATA 2, GA6 [32] et un marqueur P27 [33]. Parmi, ces amorces seulement neuf (VFG34, VFG87, JF1AG3, JF1AG2, GA 2, GA II8, GA II67, GA II 68, GATA 2) ont généré des profils polymorphes lisibles. Cependant, Les amorces : P23, GA6, JF1AAC2 ont donné des profils électrophorétiques de mauvaise qualité rendant la lecture illisible. Ceci est probablement dû à certaines variations mineures dans le protocole d'amplification (Température d'hybridation). De ce fait, les résultats de ces couples d'amorces n'ont pas été pris en considération et seulement neuf loci SSR ont fait l'objet de cette étude. Les figures 3, 4, 5, 6 et 7 illustrent un exemple de profils lisibles obtenus : cas du locus GAI67, VFG87, VFG34, JF1AG3, GA2.

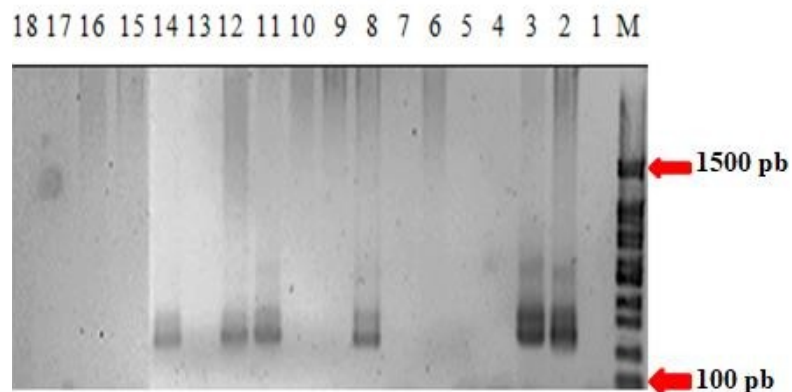


Figure 3 : Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L. obtenus par l'amorce GAI67.

Légende: M: 100pb; 1:Memdouh; 2:Chourouk; 3:79\_5'; 4:FAB\_5042; 5:FAB\_6434; 6:FAB\_7111; 7:FAB\_6641; 8:02\_04 ; 9:02\_05; 10:02\_06 ; 11 :202\_lot2 ; 12:202\_lot3 ; 13:205\_Bulk; 14:Najeh ; 15:01\_5; 16:Badii; 17:01\_02; 18:03\_01.

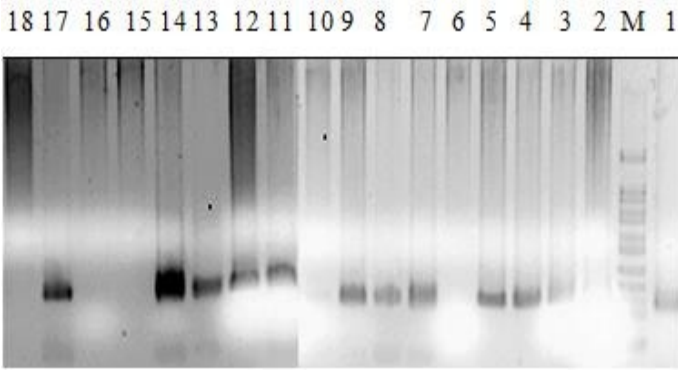


Figure 4: Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L. obtenus par l’amorce VFG87.

Légende: M: 100pb; 1:Memdouh; 2:Chourouk; 3:79\_5’; 4:FAB\_5042; 5:FAB\_6434; 6:FAB\_7111; 7:FAB\_6641; 8:02\_04 ; 9:02\_05; 10:02\_06 ; 11:202\_lot2 ; 12:202\_lot3 ; 13:205\_Bulk; 14:Najeh ; 15:01\_5; 16:Badii; 17:01\_02; 18:03\_01.

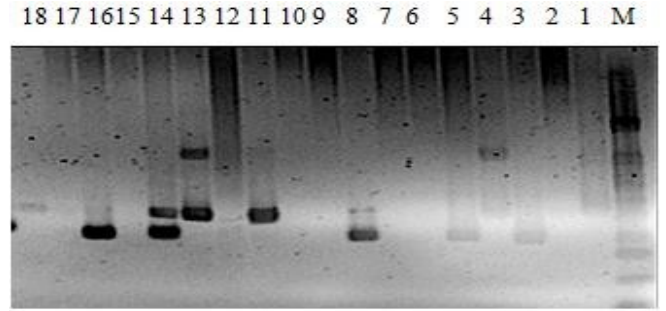


Figure 7 : Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L. obtenus par l’amorce GA2.

Légende: M: 100pb; 1:Memdouh; 2:Chourouk; 3:79\_5’; 4:FAB\_5042; 5:FAB\_6434; 6:FAB\_7111; 7:FAB\_6641; 8:02\_04 ; 9:02\_05; 10:02\_06 ; 11:202\_lot2 ; 12:202\_lot3 ; 13:205\_Bulk; 14:Najeh ; 15:01\_5; 16:Badii; 17:01\_02; 18:03\_01.

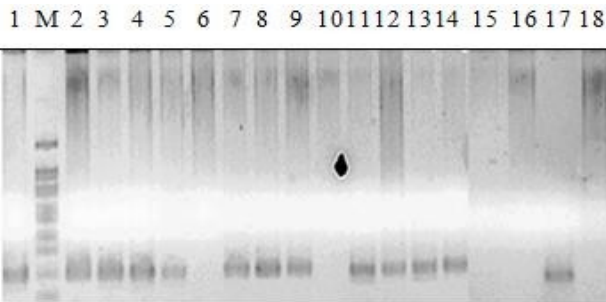


Figure 5 : Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L. obtenus par l’amorce VFG34.

Légende: M: 100pb; 1:Memdouh; 2:Chourouk; 3:79\_5’; 4:FAB\_5042; 5:FAB\_6434; 6:FAB\_7111; 7:FAB\_6641; 8:02\_04 ; 9:02\_05; 10:02\_06 ; 11:202\_lot2 ; 12:202\_lot3 ; 13:205\_Bulk; 14:Najeh ; 15:01\_5; 16:Badii; 17:01\_02; 18:03\_01.

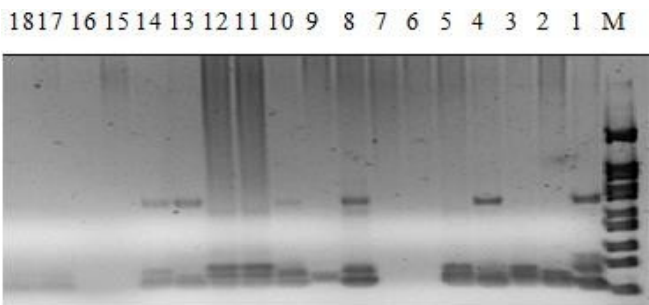


Figure 6 : Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L. obtenus par l’amorce JF1AG3.

Légende: M: 100pb; 1:Memdouh; 2:Chourouk; 3:79\_5’; 4:FAB\_5042; 5:FAB\_6434; 6:FAB\_7111; 7:FAB\_6641; 8:02\_04 ; 9:02\_05; 10:02\_06 ; 11:202\_lot2 ; 12:202\_lot3 ; 13:205\_Bulk; 14:Najeh ; 15:01\_5; 16:Badii; 17:01\_02; 18:03\_01.

Cent soixante-deux bandes ont été amplifiées avec une moyenne de 18 bandes / amorce et 9 bandes/génotype. Le nombre de bandes polymorphes est égal à 162. Ceci montre que toutes les amorces utilisées génèrent un pourcentage de polymorphisme très élevé de 100%. Ce pourcentage concorde avec le travail de Yahia *et al.* [12], qui ont évalué la diversité génétique contenue dans 13 accessions de *Vicia faba* collectées au Sud Tunisien en utilisant six amorces développés par Zeid *et al.* [9].

Aussi, ce pourcentage de polymorphisme a été aussi estimé par Hejjaoui [33], pour quatre amorces de type VFG ayant servi pour la caractérisation génétique des populations *Vicia faba* marocaines.

De même ce pourcentage a été annoncé par Akash *et al.* [34], pour les amorces GAI68, GATA2, GATA3, GATA11 et GA4. Ce taux de polymorphisme est suffisant pour estimer la variabilité génétique du germoplasme étudié. Selon Kaur *et al.*[23], ce polymorphisme élevé des accessions est dû à des mécanismes induisant des variations alléliques.

**2. Fréquences alléliques**

Les fréquences alléliques des génotypes testés pour chaque allèle et pour chaque amorce sont regroupées dans le tableau 10.

Le nombre d’allèles oscille entre un allèle pour les amorces VFG87 et VFG34 à cinq allèles pour les amorces GAI67 et GAI8 (Tableau 8). La fréquence la plus élevée (1) est enregistrée pour l’allèle A chez les populations locales de *Vicia faba* dont l’ADN est amplifié par l’amorce VFG34 et VFG87. La fréquence la plus faible (0,03) est enregistrée pour les allèles A, B chez les génotypes dont l’ADN est amplifié par l’amorce JF1AG3.



Tableau 8: Fréquences alléliques pour chaque locus SSR

| Locus    | Allèle | Fréquence allélique |
|----------|--------|---------------------|
| VFG34    | A      | 1                   |
| VFG87    | A      | 1                   |
| JF1AG3   | A      | 0,03                |
|          | B      | 0,03                |
|          | C      | 0,27                |
|          | D      | 0,34                |
|          | E      | 0,31                |
| JF1AG2   | A      | 0,04                |
|          | B      | 0,13                |
|          | C      | 0,38                |
|          | D      | 0,46                |
| GA 2     | A      | 0,15                |
|          | B      | 0,46                |
|          | C      | 0,38                |
| GA II8   | A      | 0,12                |
|          | B      | 0,08                |
|          | C      | 0,20                |
|          | D      | 0,08                |
|          | E      | 0,52                |
| GA II67  | A      | 0,28                |
|          | B      | 0,28                |
|          | C      | 0,28                |
| GA II 68 | A      | 0,04                |
|          | B      | 0,33                |
| GATA 2   | A      | 0,13                |
|          | B      | 0,50                |

**3. Contenu de l'information polymorphique (PIC)**

Le taux de polymorphisme (PIC) détecté pour chacun des loci SSR se situe entre 0,85 et 0,92 avec une moyenne de 0,89 (Fig. 8, Tableau 10). Sundaram [35], affirment que les marqueurs ayant des valeurs de PIC= 0,5 ou plus sont très utiles pour les études génétiques.

Ceci montre que les couple d'amorces utilisés lors de cette étude sont informatifs et permettent une bonne analyse de la variabilité génétique des accessions étudiées.

Le PIC moyen obtenu est très élevé par rapport à celui de Yahia [12], qui estiment un taux de polymorphisme moyen pour toutes les amorces de 0,370 et celui de Hejjaoui [33], qui annonce un PIC moyen de 0,475.

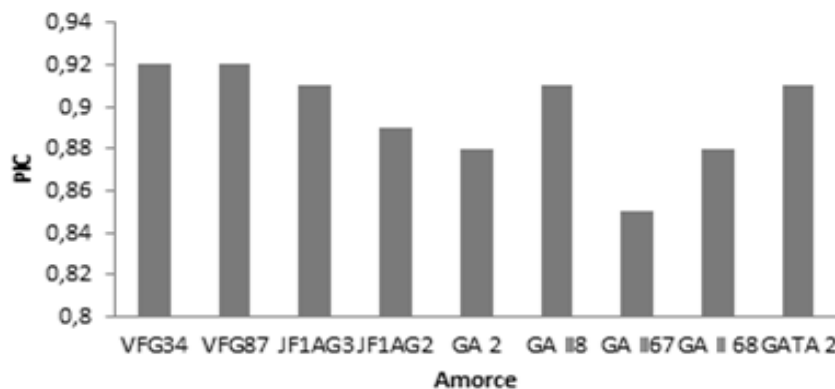


Figure 8 : Taux de polymorphisme détectés pour chacun des loci SSR

**4. Diversité génétique (H)**

L'indice de diversité génétique se situe entre 0,91 et 0,97 (Fig. 9, Tableau 10). Le plus élevé a été enregistré chez les accessions de *Vicia faba* dont l'ADN a été amplifié par VFG34,

VFG87 et JF1AG3. L'indice de diversité moyen pour les 9 amorces est de 0,95. Il est supérieur à celui de Yahia [12] et Hejjaoui [33], qui ont affirmé un indice de diversité H chez *Vicia faba* de 0,63 et 0,53 respectivement.

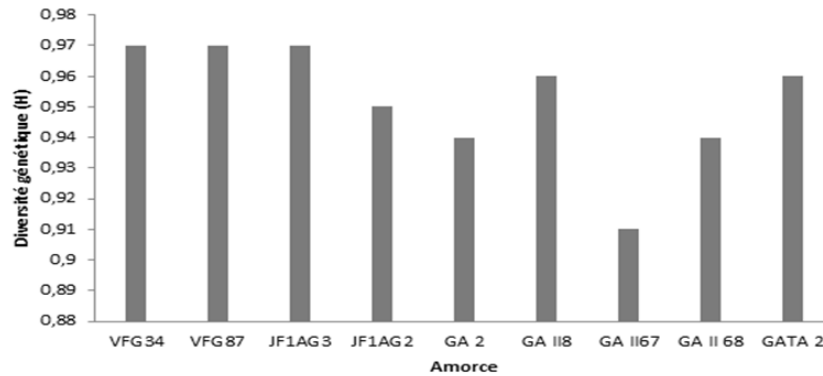


Figure 9 : Indice de diversité génétique de chaque amorce SSR utilisée

Tableau 10: Nombre d'allèle (N), diversité génétique (H) et PIC de chaque amorce

| Locus    | Nombre d'allèles | Diversité génétique | PIC  |
|----------|------------------|---------------------|------|
| VFG34    | 1                | 0,97                | 0,92 |
| VFG87    | 1                | 0,97                | 0,92 |
| JF1AG3   | 5                | 0,97                | 0,91 |
| JF1AG2   | 4                | 0,95                | 0,89 |
| GA II    | 3                | 0,94                | 0,88 |
| GA II8   | 5                | 0,96                | 0,91 |
| GA II67  | 3                | 0,91                | 0,85 |
| GA II 68 | 2                | 0,94                | 0,88 |
| GATA II  | 2                | 0,96                | 0,91 |

**5. Arbre phylogénétique**

L'étude des distances génétiques entre les sous populations est très utile pour la discrimination génétique entre les accessions et l'analyse du degré de ressemblance génétique entre elles. Selon Gonzales-Candelas & Palacios [36], la distance génétique augmente entre les sous populations en fonction du temps et de leur divergence à partir de la population d'origine. Les distances génétiques sont utilisées pour la conception d'un dendrogramme (Fig. 11) à partir de la matrice de similarité (Tableau 11) basée sur le coefficient de DICE et la méthode de regroupement UPGMA (*Unweighted Pair-Group Methode Arithmetic Averaging Algorithm*). Ce groupement met en évidence les relations génétiques entre les différents génotypes en fonction de la distribution allélique. Ce dendrogramme (Fig. 11) rassemble les individus les plus proches en cinq classes avec un pourcentage de similarité de 48%. Au fur et à mesure que le pourcentage de similarité augmente, des sous- groupes des accessions de *Vicia faba*, les plus proches génétiquement, sont définis.

Le premier groupe (Gr1) : est formé par trois sous-groupes SGr : Le premier sous-groupe (SGr1) est formé par l'accession « Memdouh ». Le deuxième sous-groupe (SG2) renferme deux fèves «02-04», «03-01» et quatre fêveroles « Chourouk », «79-5'», «202-lot 2», «202-lot 3» et «Najeh». A partir d'un pourcentage de similarité de 88%, l'accession «79-5'» (fêverole) et l'accession « 02-04 »

(fève) sont génétiquement très proches. Le troisième sous-groupe (SG3) comporte quatre fêveroles «FAB-6434», «FAB-6641», «205-Bulk» et « 01-02 » une févrette « FAB 5042 ».

Le deuxième groupe (Gr2) est formé par la variété de fève «02-05».

Le troisième groupe (Gr3) est occupé par la variété de fêverole «02-06».

Le quatrième groupe (Gr4) est formé par l'accession de fève «FAB-7111»et l'accession de fêverole «Badii».

Le cinquième groupe (Gr5) est occupé par la variété de fève «01-05».

D'après tous ces résultats, on peut conclure que l'appartenance à une même sous population n'implique pas forcément une similitude génétique.

Il est aussi bien clair que les neuf amorces SSR utilisées sont informatives mais demeure insuffisantes pour regrouper d'une manière plus spécifique les génotypes étudiés. Il est donc nécessaire d'augmenter le nombre de marqueurs pour permettre une différenciation plus poussée entre les accessions et pouvoir conclure quant aux distances génétiques qui les séparent. Cependant, Le groupement des accessions '202-lot 2' et '202-lot 3' dans le même sous-groupe avec l'accession 79-5' est un indicateur solide de la robustesse de ces résultats étant donnée qu'il s'agit de différents échantillons (accession 202 : récoltée à Béja 2018 ; 79- 5' récoltée à Tunis sous cage insecte proof) de la même lignée de fêverole 'lignée79'.

Tableau 11 : Matrice binaire de similarité (SSR).

|             | Mamdouh | Chourouk | 79-5 | Fab5042 | FAB6434 | FAB7111 | FAB6641 | 02-04 | 02-05 | 02-06 | 202-lot 2 | 202-lot 3 | 205Bulk | Najeh | 01-05 | Badii | 01-02 | 03-01 |  |
|-------------|---------|----------|------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|-----------|-----------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| Mamdouh     | 1       |          |      |         |         |         |         |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| Chourouk    | 0,44    | 1        |      |         |         |         |         |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| 79-5        | 0,52    | 0,67     | 1    |         |         |         |         |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| Fab5042     | 0,32    | 0,47     | 0,55 | 1       |         |         |         |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| FAB6434     | 0,45    | 0,5      | 0,72 | 0,76    | 1       |         |         |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| FAB7111     | 0,14    | 0,17     | 0,35 | 0,31    | 0,5     | 1       |         |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| FAB6641     | 0,53    | 0,62     | 0,56 | 0,57    | 0,59    | 0,22    | 1       |       |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| ACC-0204    | 0,5     | 0,64     | 0,89 | 0,52    | 0,69    | 0,33    | 0,53    | 1     |       |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| ACC-0205    | 0,31    | 0,55     | 0,25 | 0,5     | 0,4     | 0       | 0,5     | 0,24  | 1     |       |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| ACC-0206    | 0,43    | 0,33     | 0,24 | 0,31    | 0,38    | 0       | 0,22    | 0,33  | 0,29  | 1     |           |           |         |       |       |       |       |       |  |
| Acc-202-2   | 0,54    | 0,67     | 0,69 | 0,56    | 0,64    | 0,3     | 0,38    | 0,8   | 0,32  | 0,4   | 1         |           |         |       |       |       |       |       |  |
| AC-202-3    | 0,52    | 0,76     | 0,77 | 0,55    | 0,64    | 0,35    | 0,44    | 0,81  | 0,38  | 0,47  | 0,83      | 1         |         |       |       |       |       |       |  |
| AC-205-Bulk | 0,56    | 0,5      | 0,38 | 0,71    | 0,5     | 0,17    | 0,46    | 0,45  | 0,55  | 0,5   | 0,58      | 0,57      | 1       |       |       |       |       |       |  |
| Najeh       | 0,5     | 0,56     | 0,61 | 0,21    | 0,36    | 0       | 0,27    | 0,67  | 0,31  | 0,29  | 0,62      | 0,61      | 0,44    | 1     |       |       |       |       |  |
| ACC-0105    | 0,18    | 0,22     | 0,14 | 0       | 0,15    | 0,4     | 0,33    | 0,13  | 0     | 0     | 0,12      | 0,14      | 0       | 0     | 1     |       |       |       |  |
| Badii       | 0,13    | 0        | 0,33 | 0,29    | 0,35    | 0,44    | 0       | 0,32  | 0     | 0     | 0,29      | 0,33      | 0,31    | 0,27  | 0     | 1     |       |       |  |
| ACC-102     | 0,53    | 0,59     | 0,55 | 0,67    | 0,67    | 0,46    | 0,57    | 0,61  | 0,5   | 0,46  | 0,64      | 0,82      | 0,71    | 0,32  | 0,2   | 0,4   | 1     |       |  |
| ACC-03-1    | 0,4     | 0,67     | 0,52 | 0,32    | 0,45    | 0,43    | 0,27    | 0,58  | 0,15  | 0,43  | 0,69      | 0,7       | 0,56    | 0,5   | 0,18  | 0,3   | 0,53  | 1     |  |

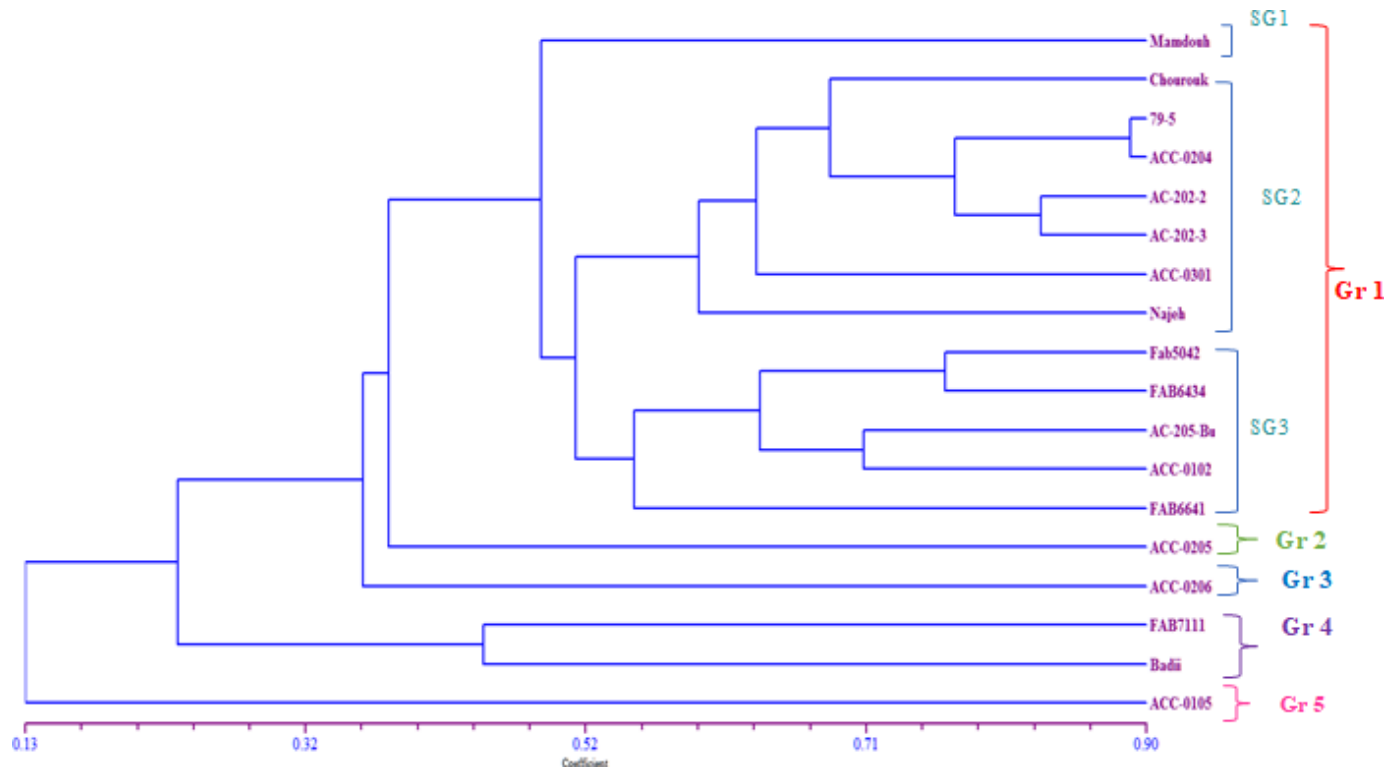


Figure10 : Dendrogramme de Similarité phylogénétique généré par les marqueurs SSRs et basé sur l'UPGMA.

## CONCLUSION

Le test de neuf amorces a généré des niveaux de diversité et de polymorphisme satisfaisants. Le nombre d'allèles détectés pour ces neuf amorces oscille entre un allèle pour les amorces VFG34 et VFG 87 respectivement et à cinq allèles pour les amorces JF1AG3, et GAI18. Toutes les amorces utilisées génèrent un pourcentage de polymorphisme très élevé de 100%. Ce pourcentage concorde avec les travaux de Yahia *et al.* [12], Zeid *et al.* [9], Hejjaoui [33] et Akash *et al.* [34]. Ce taux de polymorphisme est suffisant pour estimer la variabilité génétique du germoplasme étudié. Selon Kaur [23], ce polymorphisme élevé des accessions peut être expliqué par des mécanismes induisant des variations alléliques comme le glissement lors de la réplication. Le taux de polymorphisme PIC moyen pour les neuf amorces utilisées se trouve dans l'intervalle [0,85 à 0,92]. Le taux de polymorphisme moyen pour toutes les amorces est de 0,89. Le PIC moyen obtenu est très élevé par rapport à celui de Yahia *et al.* [12] qui estiment un taux de polymorphisme moyen pour toutes les amorces de 0,370 et celui de Hejjaoui [33] qui annonce un PIC moyen de 0,475. Aussi, Cette étude a permis la répartition des accessions étudiées en 4 groupes selon la similarité dans les locus étudiés.

La caractérisation morphologique des graines de *Vicia faba* doit être complétée par une caractérisation agro-morphologique et phénologique de la collection pour une évaluation efficace des accessions. L'étude des paramètres physiques doit être épaulée par l'étude des paramètres mécaniques des graines pour l'optimisation du traitement technologique de ces graines. Il faut aussi élargir la prospection et la collecte à bien d'autres régions non prospectées pour constituer une collection de base 'core collection' représentative de la variabilité génétique des populations locales de *Vicia faba*. Dans le but d'avoir des résultats plus consistants, il est conseillé d'augmenter le nombre d'amorce pour couvrir le maximum possible de loci dans le génome. Il serait intéressant d'évaluer la variabilité génétique des génotypes de fèves à l'aide d'autres marqueurs tels que les marqueurs SNP (Single Nucléotide Polymorphism). En effet, une étude récente a montré que cette technique permet de détecter un niveau de polymorphisme plus élevé [37, 38].

Une autre méthode de structuration de la diversité moyennant une démarche bayésienne pourra apporter plus de robustesse à cette analyse.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Anonyme (2004).** *Convention on biological diversity from conception to implementation*, Canada, 42p
- [2]. **Anonyme (2009).** 4<sup>ème</sup> Rapport National Sur La Diversité Biologique. Ministère de l'Environnement et du Développement Durable.
- [3]. **Thalji T. and Shalaldehy G. (2006).** Effect of planting date on faba bean (*Vicia faba* L.) nodulation and performance under semiarid conditions. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(4): 463-479.
- [4]. **Crepon K., Marget P., Peyronnet C., Carrouee B., Arese P. and Duc G. (2010).** Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research*, 115: 329-339.
- [5]. **Metayer N. (2004).** *Vicia faba* L. breeding for sustainable agriculture in Europe- Identification of regional priorities and definition of target genotypes. GIE Fèverole, Paris, France, 17p.
- [6]. **Tanno K. and Willcox G. (2006).** The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L. early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium B.P. *Veget. Hist. Archaeobot*, 15: 197-204.
- [7]. **Duc G., Bao SY., Baum M., Redden B. and Sadiki M. (2010).** Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resource. *Field Crops Research*, 115: 270-278.
- [8]. **Gnanasambandam A., Paull J., Torres A., Kaur S., Leonforte T., Li L., Zong X., Yang T. and Materne M. (2012).** Impact of Molecular Technologies on Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Breeding Strategies Agronomy*, 2: 132-166.
- [9]. **Zeid M., Mitchell S., Link W., Carter M., Nawar A., Fulton T. and Kresovich S. (2009).** Simple sequence repeats (SSRs) in faba bean: New loci from Orobanche-resistant cultivar 'Giza 402'. *Plant Breeding*, 128 :149-155.
- [10]. **Khamassi K. (2014).** Analyse de la diversité génétique et cartographie des marqueurs moléculaires SNP pour le contrôle des vicine et convicine, chez *Vicia faba* L. var minor. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques, Sciences de la Production Végétale, INAT, Tunisie, 233p.
- [11]. **Sadiki M., Duc G. and Furman Bonnie J. (2006).** Genetic resources of faba bean worldwide : Ressources génétiques de la fève-fèverole au niveau mondial. *Grain Legumes*, 48 : 18- 19.
- [12]. **Yahia Y., Hannachi H., Monforte AJ., Cockram J., Loumerem M., Zarouri B. and Ferchichi A. (2014).** Genetic diversity in *Vicia faba* L. populations cultivated in Tunisia revealed by simple sequence repeat analysis. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 1-8.

- [13]. **Kharrat M. and Ouchari H. (2011)**. Faba bean status and prospects in Tunisia. *Grain Legumes*, 56:11-12.
- [14]. **Khalidi S. and Zekri S. (2002)**. Production and Marketing of Legumes in Tunisia. In French. L'étude des légumineuses alimentaires dans les systèmes de production du Nord de la Tunisie. Ministry of Agriculture, Tunis, Tunisia, p. 92.
- [15]. **Anonyme. (2017)**. Statistiques agricoles. Ministère de l'Agriculture et des Ressources hydrauliques.
- [16]. **Khamassi K. (2006)**. Production des semences de légumineuses alimentaires en Tunisie. Projet de fin d'étude, sciences agronomiques, ESAK, Tunisie, 105p.
- [17]. **Zeid M., Schon C. and Link W. (2003)**. Genetic diversity in recent elite faba bean lines using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 1304-1314.
- [18]. **Terzopoulos P.J., Kaltsikes P.J. and Bebeli P.J. (2003)**. Collection, evaluation and classification of Greek populations of faba bean (*Vicia faba* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 373-381.
- [19]. **Terzopoulos P.J. and Bebeli P.J. (2008)**. Genetic diversity of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, 108:39-44.
- [20]. **Ouji A., Rouaissi M., Abdellaoui R. and Gazzah M. (2011)**. The use of reproductive vigor descriptors in studying genetic variability in nine Tunisian faba bean (*Vicia faba* L.) populations. *African Journal of Biotechnology*, 10 : 896-904.
- [21]. **Chalbi I. (2012)**. Caractérisation agro morphologique et évaluation moléculaire et nutritionnelle de lignées pures de fèves. Mémoire de Mastère en Ressources Phytogénétiques et Biotechnologie, Institut National Agronomique de Tunisie, Tunisie, 80p.
- [22]. **Rebaa F., Abid G. and Aouida M. (2017)**. Genetic variability in Tunisian populations of faba bean (*Vicia faba* L. var. *major*) assessed by morphological and SSR markers. *Physiol Mol Biol Plants*, 23(2):397-409.
- [23]. **Kaur S., Pembleton L.W., Cogan N.O., Savin K.W., Leonforte T., Paul J., Materne M. and Forster J.W. (2012)**. Transcriptome sequencing of field pea and faba bean for discovery and validation of SSR genetic markers. *BMC Genomics*, 13:104-115.
- [24]. **Yang T., Bao S., Ford R., Jia T., Guan J., He Y., Sun X., Jiang J., Hao J. and Zhang X. (2012)**. High-throughput novel microsatellite marker of faba bean via next generation sequencing. *BMC Genomics*, 13:602.
- [25]. **Ma Y., Bao S., Yang T., Hu J., Quan J., He Y., Wang X., Wan Y., Sun X., Jiang J., Gong C. and Zong X. (2013)**. Genetic linkage map of Chinese native variety faba bean (*Vicia faba* L.) based on simple sequence repeat markers. *Plant Breeding* 132: 397-400.
- [26]. **Cipriani G., Marazzo M.T., Marconi R. and Cimato A. (2002)**. Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 223-228
- [27]. **Lopes M.S., Mendoca D., Sefc K.M., Sabino G.F. and Machado A. (2004)**. Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *HortScience*, 39: 1562-1565.
- [28]. **Fulton T.M., Chunwongse J. and Tanksley S.D. (1995)**. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Repr*, 13: 207-209.
- [29]. **Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W. (1980)**. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32:314-331.
- [30]. **Anderson J.A., Churchill G.A., Suttrique J.E., Tanksley S.D. and Sorrells M.E. (1996)**. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36:181-186.
- [31]. **Rolph F.J. (2000)**. NTSYS, Numerical taxonomy and multivarietal analysis system (2.1). New York, USA: Exeter Software.
- [32]. **Gong Y.M., Xu S.C., Mao W.H., Hu Q.Z., Zhang G.W., Ding J. and Li Z.Y. (2010)**. Generation and characterization of 11 novel EST derived microsatellites from *Vicia faba* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 97: 69-71
- [33]. **Hejjoui K. (2013)**. Caractérisation génétique des populations locales de *Vicia faba* L. par la technique des SSR. Master Sciences et Techniques, Gestion et Conservation de la Biodiversité, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc 91p.
- [34]. **Akash W., Al-Abdallat A., Saoub H. and Abu-Amer H. (2011)**. Genetic and Phenotypic Variation Among Faba Bean Landraces and Cultivars. *International Journal of Vegetable Science*, 17:45-59.
- [35]. **Sundaram R.M. (2007)**. Fine mapping of rice gall midge resistance genes Gm1 and Gm2 and validation of the linked markers. PhD thesis submitted to University of Hyderabad, Hyderabad, 181 p.
- [36]. **Gonzales-Candelas F. and Palacios C. (1995)**. Analysing molecular data for studies of genetic diversity. In : Caractérisation agromorphologique et moléculaire d'une collection de landraces péruviennes de pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) pour l'analyse de sa diversité. Bautista-Salas, 2009. Thèse de doctorat. Faculté Universitaire Notre Dame de la paix. Namur, Belgique, 224 p.
- [37]. **Rajesh P.N. and Muehlbauer Fred J. (2008)**. Discovery and detection of single nucleotide polymorphism (SNP) in coding and genomic sequences in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, 162: 291-300.
- [38]. **Webb A., Cottage A. and Wood T. (2016)**. A SNP-based consensus genetic map for synteny-based trait targeting in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 14: 177-185.