

Caractérisations biochimique et physiologique de nouvelles lignées d'orge résistantes au virus de la jaunisse nanisante

R. REKIK¹, F. CHIBANI², R. MZID¹, E. BABAY¹, M. HANANA¹, H. BEN GHANEM³, A. NAJAR^{3*}

¹ Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes (LPMP). Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC). BP 901, Hammam-lif 2050, Tunisie.

² Laboratoire des Plantes Extrémophiles (LPE). Centre de Biotechnologie de Borj Cédria (CBBC). BP 901, Hammam-lif 2050, Tunisie.

³ Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Rue Hédi Karray, 2049 Ariana.

* Auteur correspondant : asmanajara@yahoo.fr

Abstract - Seeking for new varieties with high agronomical potential is a major concern for breeders. Practically, the introduction of a new variety at the farmer level requires germplasm evaluation in order to get the necessary informations about its identification. In this context, the aim of our study is to characterize using biochemical (protein and sugar contents) and physiological (behavior against salinity and drought) bases, describe and finally identify interesting barley lines, in comparison with two control varieties (Manel and Rihane). The analysis of the different studied parameters shows a significant diversity among lines, although they could be somehow very close within some characters. However, when considering the whole descriptive parameters, it appears that L6 line is highly performant at several levels including its soluble sugars (4 µg/mg MS), starch (143 µg/mg de MS), nitrogen and protein contents, but also its behavior with regard to salt and water stresses.

Keywords: Barley, Salt stress, Drought stress, Soluble sugar content, Starch, Germination, Hordein.

Résumé - La recherche de nouvelles variétés à haut potentiel agronomique constitue pour le sélectionneur une préoccupation constante. Dans la pratique, le lancement d'une variété à l'échelle de l'agriculteur nécessite un pré-requis d'évaluation du matériel génétique concerné afin de le doter de toute information qui puisse l'identifier. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude consiste à caractériser sur des bases biochimiques (teneurs en protéines et sucres) et physiologiques (comportement vis-à-vis des stress salin et hydrique) de nouvelles lignées d'orge prometteuses issues d'un programme de sélection pour la résistance au virus de la jaunisse nanisante comparativement aux deux variétés témoins Manel et Rihane. L'analyse des différents paramètres évalués montre une diversité entre les lignées, bien que souvent très proches au niveau de certains caractères. En considérant les paramètres descriptifs dans leur globalité, il en ressort que la lignée L6 apparaît performante sur plusieurs niveaux, notamment les teneurs en sucres solubles (4 µg/mg MS), en amidon (143 µg/mg de MS), en azote et en protéines, mais aussi par son comportement vis-à-vis des stress salin et hydrique.

Mots clés : Orge, Stress salin, Stress hydrique, Sucres solubles, Amidon, Hordéines.

1. Introduction

En Tunisie, l'orge (*Hordeum vulgare* L.) est la deuxième céréale cultivée (600000 ha) après le blé. Elle est réputée pour sa large adaptation à différents environnements tels que les régions arides et semi-arides (Abassi et al. 2012). Malgré l'importance économique de cette culture, plusieurs contraintes limitent son développement et sa productivité. En effet, en plein champ, l'orge est soumis à de nombreuses contraintes aussi bien biotiques (champignons, virus, viroïdes, bactéries et d'autres ravageurs) qu'abiotiques (salinité, sécheresse, températures extrêmes ...) qui affectent évidemment sa

production et sa qualité et constituent également un défi national pour atteindre la sécurité alimentaire. D'après l'Office National des Céréales, la Tunisie se voit dans l'obligation d'importer annuellement en moyenne 50000 mille tonnes d'orge fourragère destinées à l'alimentation animale (référence). Parmi les stress biotiques auxquels fait face cette culture figure le virus de la jaunisse nanisante de l'orge « Barley Yellow Dwarf Virus » (BYDV) qui est une maladie virale qui provoque des pertes de rendement considérables (Najar 2009). Le lancement de nouvelles variétés à haut potentiel agronomique constitue pour le sélectionneur une préoccupation constante et nécessite au préalable une caractérisation et une évaluation du matériel génétique. Dans ce contexte, les caractères morphologiques et physiologiques traditionnels pour la distinction génotypiques ne sont pas toujours suffisants. En effet, ils sont limités à certains stades de croissance de la plante et pourraient être affectés par l'environnement. Les marqueurs biochimiques tels que les isoenzymes, et les protéines (hordéines) pourraient être utilisés comme moyen efficace d'identification et de caractérisation variétale de l'orge. Ces techniques ont été utilisées également pour distinguer de nombreux génotypes d'orge canadiens, européens et marocains (Dakir et al. 2002, Dimova et al. 2010) mais aussi pour l'analyse de la diversité génétique et de l'étude de la phylogénie (Pomortsev et al. 2002). Les hordéines, protéines de réserve de l'orge, présentent la fraction azotée majeure de l'endosperme soit 35 à 55% de l'azote du grain mature en fonction du niveau de fertilisation azotée (Shewry et Mifflin 1982). Elles sont particulièrement riches en proline et glutamine (Piston et al. 2005). Ces protéines sont primordiales pour déterminer la qualité nutritionnelle et fourragère de l'orge (Liu et al. 1996, Molina-Cano et al. 2002). L'objectif du présent travail est l'évaluation physiologique et la caractérisation biochimique de nouvelles lignées d'orge résistantes au BYDV et d'étudier leur comportement vis-à-vis des stress salin et hydrique comparativement aux variétés Manel et Rihane sensibles à ce virus.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Au cours de cet essai, le choix a été fixé sur cinq lignées d'orge résistant au BYDV (L1, L2, L3, L6, L7) et deux variétés communément cultivées Manel et Rihane utilisées comme témoins et connues pour leur sensibilité à ce virus (Najar 2009).

2.2. Extraction des sucres solubles et de l'amidon

Le dosage des sucres solubles est effectué selon la méthode de Dubois (1956). Les teneurs en sucres solubles sont déterminées en se référant à une courbe standard. Après cinq lavages du culot, l'acide perchlorique dilué (35 %) est utilisé pour la dispersion et l'hydrolyse de l'amidon en une seule étape et ce dernier est par la suite dosé par colorimétrie en présence d'anthrone sulfurique.

2.3. Dosage de l'azote et des protéines totales par la méthode de Kjeldahl

Le principe consiste à transformer la matière végétale en poudre fine homogénéisée après séchage, ensuite elle sera attaquée par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur. La solution obtenue est alors distillée avec un excès de soude. Le distillat recueilli est titré avec une solution d'acide sulfurique N/100 (Kjeldahl 1883). La détermination de la teneur en azote total permet le calcul de la teneur en protéines, celle-ci est estimée en multipliant le résultat obtenu pour l'azote total par un facteur (5,7) (Williams et al. 1998).

2.4. Extraction des protéines de réserve

L'extraction des hordéines se fait suivant le protocole de Doll et Anderson (1980) en utilisant 100 mg de farine de graine d'orge décortiquée (3 graines d'un même épi). Le dosage des protéines extraites est fait selon la méthode de Bradford (1976).

2.5. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) pour séparer les protéines extraites selon la méthode de Laemmli (1970) modifiée.

2.6. Analyse des résultats et estimation du polymorphisme des hordéines

Les gels sont scannés par le système ChemiDoc™ MP (Biorad) (Bio-Rad versa DOC3000 gel imaging system) et seules les bandes nettement visibles sont comptabilisées. Les profils sont transformés en matrice binaire (présence (1) ou absence (0) de bandes) destinée à être analysée par le programme NTSYS 2.0 (Rohlf 1998), selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means).

2.7. Traitements salin (NaCl) et hydrique (PEG)

Après désinfection, les grains sont mis à germer dans des boîtes de Pétri sur deux papiers filtre stériles à raison de 10 grains par boîte. Les boîtes sont placées dans un incubateur où la température est de 25 °C, l'humidité relative de 80 % et sous obscurité. Diverses concentrations de sel (0, 100 et 200 mM NaCl) sont appliquées sur ces grains pour assurer le stress salin. Quant au déficit hydrique, il a été induit par l'application de différents traitements de PEG 6000 préparés selon l'équation suivante :

$$\Psi = -(1,18 \cdot 10^{-2}) C - (1,18 \cdot 10^{-4}) C^2 + (2,67 \cdot 10^{-4}) CT + (8,39 \cdot 10^{-7}) C^2T$$

2.8. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse de variance. Les valeurs moyennes sont comparées entre elles à l'aide du test Duncan (au seuil de probabilité $\alpha = 5\%$) en utilisant le logiciel GenStat, Release 7.2 - Discovery Edition 3 (Buysse et al. 2007).

3. Résultats

3.1. Teneurs en sucres solubles et en amidon

Étant donné l'importance de ces composés glucidiques et leur accumulation au cours de la phase d'embryogenèse dans la graine, nous avons jugé essentiel d'analyser ces paramètres. Les résultats du dosage des sucres solubles montrent que la variété Rihane et la lignée L6 présentent les teneurs les plus élevées (4,36 et 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MS respectivement, sans différence significative) suivies par L2 et L1 alors que L7 présente la teneur la plus faible (2,36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MS) (figure 1B). La lignée L6 présente aussi la teneur la plus élevée en amidon (143 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MS) (bien que sans différence significative avec Rihane et Manel) et L1 présente la teneur la plus faible (107,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MS), ce paramètre ne varie pas significativement entre les autres lignées (figure 1A).

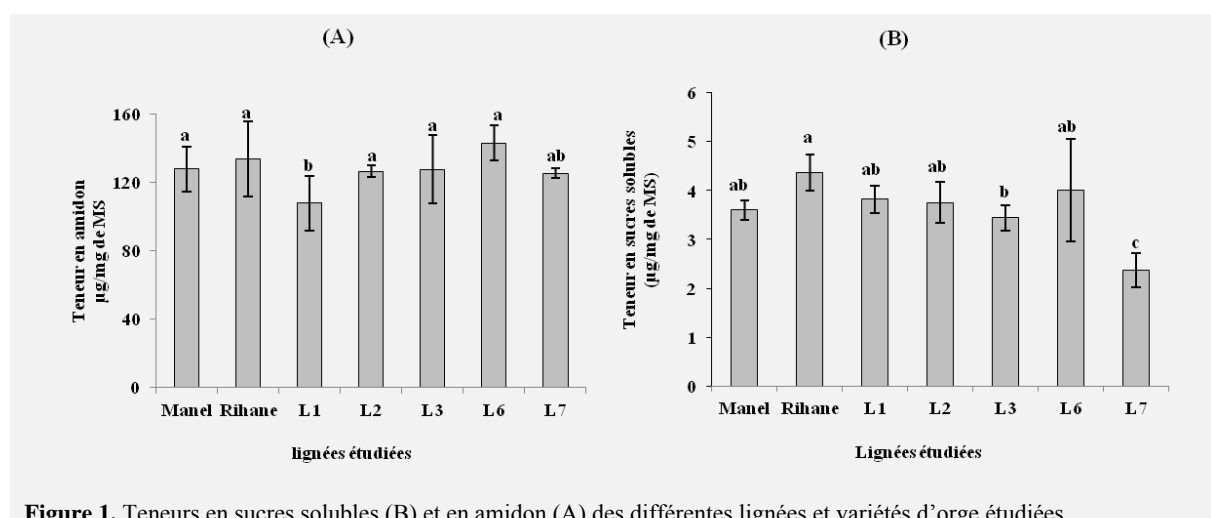


Figure 1. Teneurs en sucres solubles (B) et en amidon (A) des différentes lignées et variétés d'orge étudiées.

3.2. Teneurs en azote total et en protéines

Le dosage en azote total montre une différence significative entre les différentes lignées étudiées (figure 2A). La lignée L1 présente la teneur la plus élevée en azote (1,66 %) et Rihane présente la teneur la plus faible (0,92 %). La teneur en azote des autres lignées est aux alentours de 1,1 et 1,2 %. De même, la lignée L1 affiche la meilleure teneur en protéines (9,49 %), alors que Rihane est la plus pauvre en protéines (5,29 %), les autres lignées restantes aux alentours de 6,5 et 7 %, avec L6 en deuxième position (figure 2B).

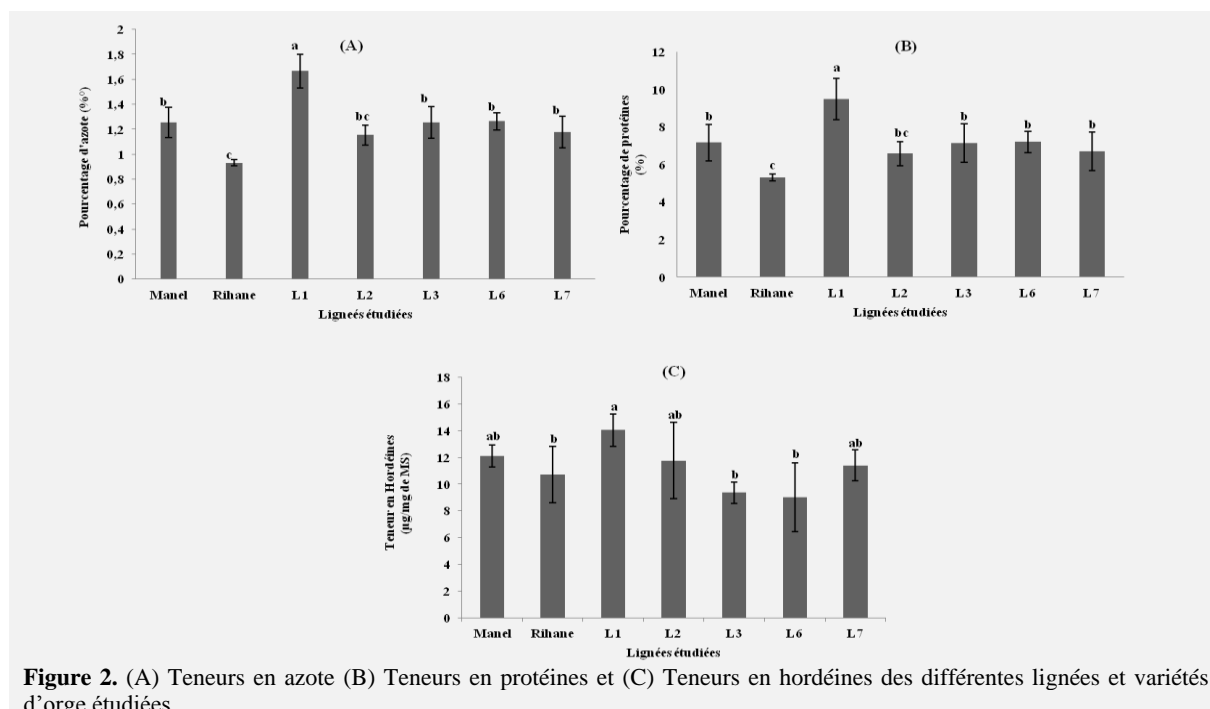


Figure 2. (A) Teneurs en azote (B) Teneurs en protéines et (C) Teneurs en hordéines des différentes lignées et variétés d'orge étudiées.

3.3 Analyse des hordéines par la technique de SDS-PAGE

3.3.1. Teneurs en hordéines

La teneur en hordéines des lignées varie significativement d'une lignée à une autre. En effet, la lignée L1, bien que ne différant pas significativement de L2, est la plus riche en hordéines (14,04 µg/mg MS). Les autres lignées présentent des teneurs allant de 9 à 12 µg/mg MS (figure 2C).

3.3.2. SDS-PAGE

La séparation par SDS-PAGE (15%) des protéines de réserves, extraites à partir des grains des différentes lignées et variétés d'orge, a permis de visualiser les 4 groupes d'hordéines (A, B, C et D), les hordéines A et D n'ont pas été prises en considération au cours de notre analyse afin d'atteindre une meilleure résolution des catégories B et C d'hordéines (figure 3A). En effet, la majeure partie des hordéines (80%) est formée par les fractions B et C (Salcedo et al. 1980, Pelger et al. 1993). Les hordéines A ne sont pas considérées comme des réelles hordéines selon Mifflin et Shewry (1982) et les hordéines D sont moins variables que les B et C. En total, 25 bandes de différentes tailles ont été révélées au niveau des grains des 7 lignées et variétés étudiées et dont le poids moléculaire varie de 27 à 90 kDa avec une moyenne de 9 bandes par lignée (au minimum 7 bandes pour L1 et au maximum 10 bandes pour les lignées L2, L6 et L7). L'analyse des hordéines montre un haut degré de polymorphisme, chaque lignée ou variété présente un profil propre à elle (figure 3B). Un total de 7 profils est ainsi observé. Des bandes spécifiques pour certaines lignées ont été détectées, notamment :

- ✓ Une bande de taille 68 kDa chez Manel
- ✓ Une bande de taille 78 kDa chez L1
- ✓ Une bande de taille 63 kDa chez L2
- ✓ Une bande de taille 49 kDa chez L3
- ✓ Deux bandes de taille 65,5 et 59 kDa chez L7
- ✓ Rihane et L6 ne présentent aucune bande spécifique.

Les profils électrophorétiques des hordéines des grains d'orge étudiés ont servi pour l'établissement d'un dendrogramme illustrant la relation phylogénétique entre les 7 lignées et variétés étudiées (figure 3C). En se situant à un niveau de similarité de 57 %, on obtient 2 groupes et 1 lignage indépendant à savoir le groupe A, représenté par Rihane, L1 et L2, le groupe B, regroupant Manel, L6 et L3 et la lignée L7, formant un singleton.

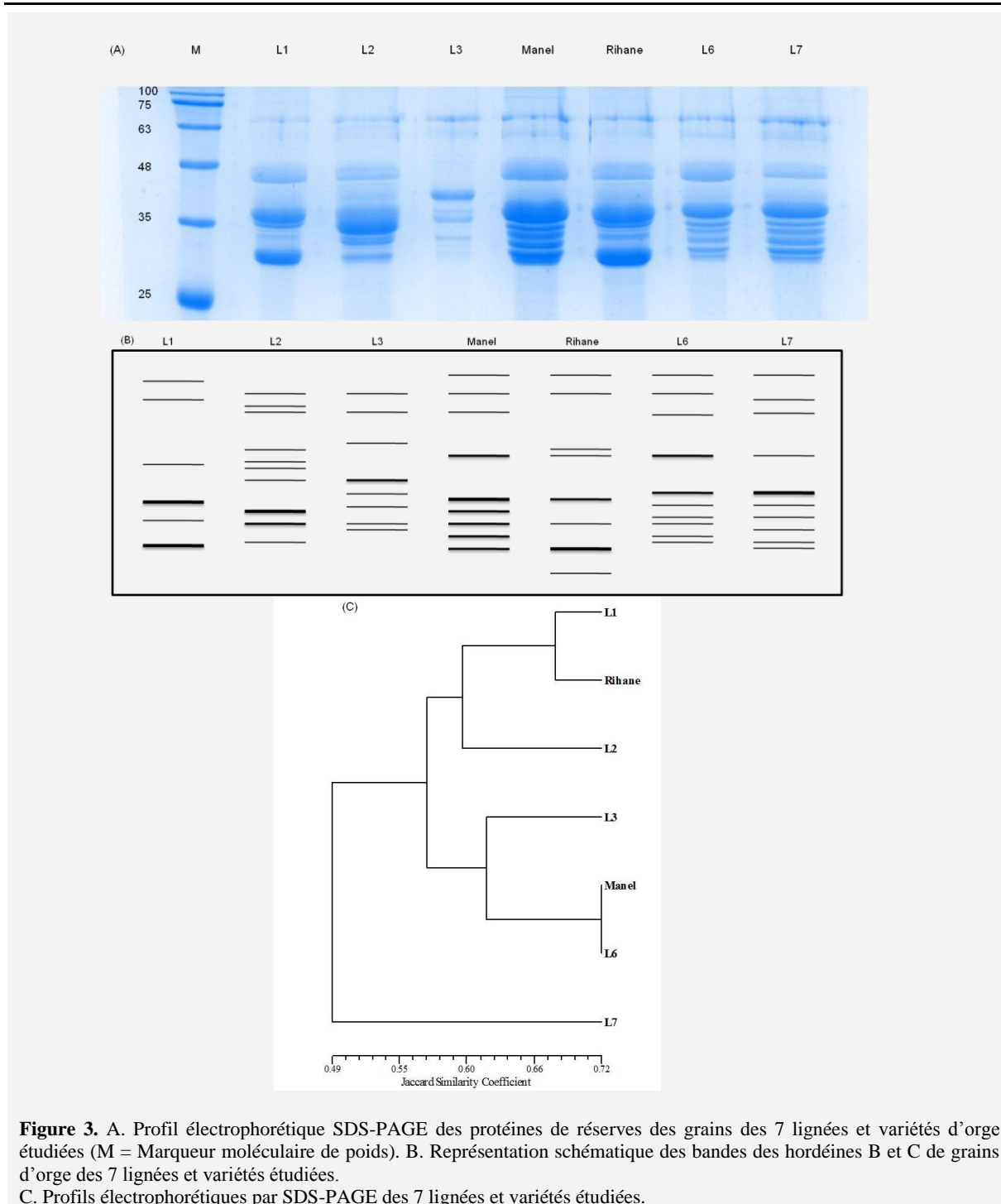


Figure 3. A. Profil électrophorétique SDS-PAGE des protéines de réserves des grains des 7 lignées et variétés d’orge étudiées (M = Marqueur moléculaire de poids). B. Représentation schématique des bandes des hordéines B et C de grains d’orge des 7 lignées et variétés étudiées. C. Profils électrophorétiques par SDS-PAGE des 7 lignées et variétés étudiées.

3. 4. Evaluation de la tolérance à la salinité et au stress hydrique des lignées et variétés d’orge au stade germinatif

Les résultats illustrés au niveau de la figure 4A présentent une réponse phénotypique au stress salin au cours de la germination. Les doses de sel utilisées dans cette étude ont été fixées sur la base de la charge en NaCl des eaux de surface et d’irrigation en Tunisie et dans les zones de vocation fourragère qui ne dépasse pas 6 à 7 g/l (Hachicha et al. 1995). Nous avons donc choisi d’utiliser 2 doses en NaCl (100 et 200 mM). On remarque que la germination varie selon les lignées et les concentrations appliquées. En condition témoin (0 mM NaCl), le taux de germination dépasse les 90 % pour la plupart des lignées, ceux qui montrent les pourcentages les plus élevés sont Rihane, Manel et L3 (respectivement 96%, 93% et 90 % de grains germés) suivi des autres lignées qui affichent des pourcentages allant de 80 à 86%. Pour des concentrations de NaCl moyennement élevées (100 mM),

la capacité germinative pour la plupart des géotypes n'est pas affectée et les valeurs enregistrées sont statistiquement proches des valeurs obtenues en condition témoins. Donc, 100 mM NaCl ne constitue ni une contrainte ni un stress ionique pour la germination de ces grains d'orge.

A 200 mM NaCl, toutes les lignées d'orge voient leur capacité germinative réduite exceptée la variété Rihane qui affiche un pourcentage de germination réduit de 6 % par rapport au témoin et de 3% par rapport à 100 mM, ce qui est considérable pour cette concentration de NaCl. La capacité germinative des lignées L3 et L6 a diminué à 200 mM quoiqu'elle reste encore supérieure à 50%. Les autres lignées sont sensibles à cette concentration de NaCl (entre 35 et 40% de germination).

Les résultats des essais de germination sous différents traitements en PEG montrent que la faculté germinative des grains est affectée par la contrainte hydrique (figure 4B). Le taux de germination moyen varie entre 87,3% pour le témoin et 33,3% pour le milieu le plus concentré en PEG. En condition témoin, Rihane, Manel et L3 montrent les pourcentages les plus élevés (96, 93 et 90 % respectivement). Les autres lignées présentent des taux moins élevés. Un léger déficit hydrique ($\Psi = -3$ bars) n'a pas de conséquences notables sur le taux germinatif des graines des lignées L1 et L7. Une concentration plus importante en PEG ($\Psi = -6$ bars) aboutit à une réduction de la capacité germinative de quelques lignées, notamment celles de Manel, L1, L3 et L6 qui diminuent de plus de 10 %. La lignée L7 présente une diminution importante du taux germinatif de 33 %, après avoir bien germé à $\Psi = -3$ bars. La variété Rihane ne présente aucune sensibilité à ce potentiel hydrique.

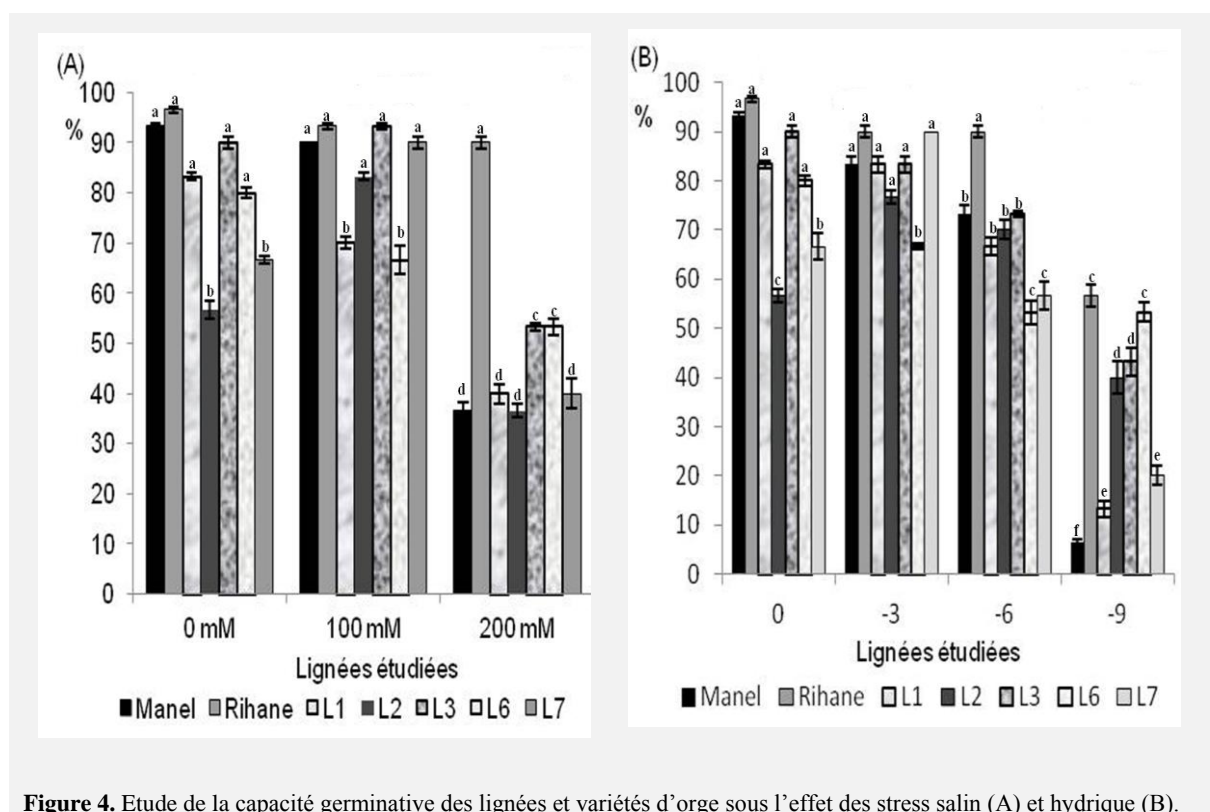


Figure 4. Etude de la capacité germinative des lignées et variétés d'orge sous l'effet des stress salin (A) et hydrique (B).

4. Discussion

Les nouvelles lignées résistantes au BYDV (Najar, 2009) ainsi que les variétés sensibles étudiées ont affiché une diversité importante quand aux différents paramètres et caractères étudiés. La germination de semences est le principal facteur limitant le développement des pousses feuillées sous les conditions salines (Al-Karaki 2001). La variété Rihane tolère bien les conditions de stress qui peut être expliqué par sa richesse en amidon (Steven 2011). Sous contrainte saline, la capacité germinative pour la plupart des géotypes n'est pas affectée et les valeurs enregistrées sont statistiquement proches des valeurs obtenues en condition témoins. Par contre, sous les différents traitements de PEG, les résultats des essais de germination montrent que la faculté germinative des grains est affectée par la restriction hydrique. L'amidon, présent dans l'endosperme, est l'élément de réserve énergétique qui nourrit la plantule au moment de la germination par son hydrolyse en sucres fermentescibles (Steven 2011).

Parmi les constituants-clés de la qualité des grains figurent les protéines. Les grains d'orge riches en protéines sont recherchés dans l'alimentation humaine et animale (Ben Youssef et al. 2001). A partir du dosage de l'azote total, les teneurs en protéines calculées semblent être très faibles par rapport au teneur en protéines citées par Lee et al. (2010) qui ont dépassé les 20% pour certaines accessions d'orge de Chine et du Canada. La teneur en protéines est généralement considérée comme un facteur négatif dans le processus de maltage, même si, il existe quelques études rapportant des résultats contradictoires (Wang et al 2007, Lee et al. 2010, Steven 2011). Les cellules de la couche sub-aleurone sont riches en protéines avec peu ou pas de granules d'amidon. En dessous de cette couche, les cellules ont un aspect typique d'albumen amylicé, d'être emballés avec des granules d'amidon, mais avec de faibles teneurs en protéines; l'existence de gradients de protéines, de l'amidon, la composition de la paroi cellulaire, et d'autres composants d'intérêt est clairement en relation avec l'exploitation ultérieure du grain (Steven 2011). On peut dégager cette relation protéines-amidon à partir de nos résultats et pour laquelle la lignée L1 présente la teneur la plus élevée en protéines mais la plus faible en amidon, d'autre part, Rihane présente la teneur la plus faible en protéines et la plus forte en amidon. La teneur en hordéines est un paramètre crucial pour l'industrie de l'orge (Howard et al. 1996, Brennan et al. 1998, Wang et al. 2007). L'analyse des protéines de réserve, extraites à partir des différentes lignées et variétés d'orge, a révélé un polymorphisme clair révélé par les profils électrophorétiques. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Rahimi et al. (2014) en se basant sur le nombre de bandes obtenues.

5. Conclusion

La recherche de nouvelles variétés à haut potentiel agronomique représente pour le sélectionneur une préoccupation constante. Dans le but d'une meilleure valorisation de leurs potentialités. L'objectif de notre étude constitue, suite à un travail spécifique de croisements ayant abouti à différentes nouvelles lignées (L1, L2, L3, L6 et L7), de caractériser, décrire et enfin de faire ressortir des lignées d'orge intéressantes comparativement à deux variétés témoins (Manel et Rihane). L'analyse et l'examen des différents paramètres évalués montrent une diversité entre les lignées, bien que souvent très proches au niveau de certains caractères descriptifs. A priori, les variétés témoins Rihane et Manel n'occupent plus la position de tête ; mais peuvent même se trouver en dernière file telle que Manel pour son comportement vis-à-vis du stress hydrique. Par ailleurs, certaines nouvelles lignées possèdent une bonne qualité nutritive telle que L1 pour ses teneurs en azote en protéines. Cependant, en considérant l'ensemble des paramètres descriptifs dans leur globalité, il en ressort que la lignée L6 apparaît performante sur plusieurs niveaux notamment ses teneurs en sucres solubles, amidon, azote et protéines, et aussi son comportement vis-à-vis des stress salin et hydrique. Nous pouvons conclure ainsi que la lignée L6 est la meilleure parmi toutes mais aussi pourrait constituer un génotype intéressant à exploiter en tant que géniteur dans les programmes d'amélioration génétique. L'ensemble de ces caractères observés peuvent être corrélés au caractère de résistance au BYDV.

Abbreviations:

APS: Ammonium Persulphate.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate.

DTT: Dithiothreitol.

TEMED: N,N,N,N tetramethylethylenediamine.

UPGMA: Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Means.

BYDV: Barley Yellow Dwarf Virus.

6. Références

- Abassi M, Najjar A, Ben Ghanem H, Rezgui S, Albouchi A (2012)** Comportement vis-à vis du stress salin de lignées d'orge sélectionnées pour leur résistance au BYDV en Tunisie. *Revue des Régions Arides* 2, 3 : 3-13
- Al-Karaki GN (2001)** Germination, sodium and potassium concentration of barley seeds as influenced by salinity. *J. Plant Nutr.* 24: 511-522
- Ben Youssef S, Chakroun M, El Felah M, Omri N (2001)** Aptitude à la double exploitation de génotypes d'orge en région sub-humide de Tunisie. *Fourrages* 168 : 509-521
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-54

- Brennan CS, Smith DB, Harris N, Shewry PR (1998)** The production and characterization of Hor3 null lines of barley provides new information on the relationship of D hordein to malting performance. *J. Cereal Sci.* 28 : 291-299
- Buysse W, Stern R, Coe R, Matere C (2007)** GenStat Discovery Edition 3 for everyday use. ICRAF Nairobi, Kenya. 117 pp
- Dakir EH, Ruiz ML, Garcí'a P, Marcelino PV (2002)** Genetic variability evaluation in a Moroccan collection of barley, *Hordeum vulgare* L., by means of storage proteins and RAPDs. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 49: 619-631
- Dimova D, Mihova G, Vulcheva D, Vulchev D, Ivanova I (2010)** Using polymorphism of grain storage proteins for identification of feed barley varieties. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 16 (4) : 436-442
- Doll H, Andersen B (1980)** Preparation of Barley Storage Protein, Hordein, for Analytical Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 115 : 61-66
- Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956)** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 :350-356
- Hachicha M, Job JO, Mtimet M (1995)** Sols irrigués et sols sodiques. Les sols salés et la salinisation en Tunisie. *Sols de Tunisie, Bulletin de la Direction des sols.* 15, 341p
- Howard KA, Gayler KR, Eagles HA, Halloran GM (1996)** The relationship between D hordein and malting quality in barley. *J. Cereal Sci.* 24 : 47-53
- Kjeldahl JT (1883)** Neue methode zur bestimmung des stikstoffes in organischen korper *Z. Anal Chem*
- Laemmler UK (1970)** Cleavage of structural protein during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685
- Lee YJ, Lee TG, Jeon WB, Kim DY, Hong MG, Lee MB, Hyun JN, Kim MJ, Lee MJ, Park CS, Seo YW (2010)** Employment of hordein subunit polymorphisms in establishing selection criteria for high quality malting barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Crop. Sci. Biotech.* 13(2) : 91-97
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996)** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell* 86:147-157
- Mifflin BJ, Shewry PR (1982)** Genes for the storage proteins of barley. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr.* 31 : 251-267
- Molina-Cano JL, Polo JP, Romera E, Araus JL, Zarko J, Swanston JS (2001)** Relationship between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph I. Genotype by environment interaction of hordein content. *J Cereal Sci.* 34 : 285-294
- Molina-Cano JL, Sopena A, Polo JP et al (2002)** Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II. Genetic and environmental effects on water uptake. *J Cereal Sci.* 36:39-50
- Najar A (2009)** Le virus de la jaunisse nanisante de l'orge BYDV. Importance, caractérisation moléculaire et intégration dans la sélection de lignées d'orge résistantes. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. INAT, Univ Tunis, 240p.
- Nalbandi K, Kohnhrouz BB, Saeed KA, Gholizadeh A (2012)** Isolating Barley (*Hordeum vulgare* L.) B1 Hordein Gene Promoter and Using Sequencing Analysis for the Identification of Conserved Regulatory Elements by Bioinformatic Tools. *African Journal of Biotechnology.* 11 (29):7378-7387
- Pelger S, Säll T, Bengtsson BO (1993)** Evolution of hordein gene organization in three *Hordeum* species. *Hereditas* 119 :219-231
- Piston F, Martin G, Dorado G, Barro F (2005)** Cloning and molecular characterization of Bhordeins from *Hordeum chilense* (Roem. Et Schult.) ». *Theor. Appl. Genet.* 111: 551-560
- Pomortsev AA, Kalabushkin BA, Terent'eva IA (2002)** Hordein Polymorphism in Barley Varieties from North Africa. *Russ. J. Genet.* 38 (11): 1267-1278
- Rahimi M, Majidi Harvan I, Valizadeh M, Darvish Kajori F, Ebrahimpour F (2014)** Evaluation of genetic diversity of wild-type barley (*Hordeum vulgare* L. sub sp. *Spontaneum*) based on storage proteins polymorphism. *International Journal of Biosciences* 5 (3): 266-274
- Rohlf FJ (1998)** NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, Exeter Software, New York
- Salcedo G, Sanchez-Monge R, Argamenteria A, Aragonillo C (1980)** The A-hordeins as a group of salt soluble hydrophobic proteins. *Plant Science Letters* 19(2): 109-119
- Schmitt JM, Svendsen I (1980)** Amino acid sequences of hordein polypeptides. *Carlsberg Res. Commun.* 45:143
- Shewry PR, Mifflin BJ (1982)** Genes for the storage proteins of barley. *Plant Foods Hum. Nutr.* 31(3): 251-267
- Shewry PR, Bunce NAC, Kreis M, Forde BJ (1985)** Polymorphism at the Hord 1 locus of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochem. Genet.* 23: 398-402
- Shewry PR, Finch RA, Parmar S, Franklin J, Mifflin BJ (1983)** Chromosomal location of hor-3, a new locus governing storage proteins in barley. *Heredity* 50: 179-189
- Shewry PR, Tatham AS (1990)** The prolamine storage proteins of cereal seeds: structure and evaluation. *Biochemical Journal* 267: 1-12
- Shewry PR, Tatham AS, Barro F, Barcelo P, Lazzeri (1995)** Biotechnology of breadmaking: unraveling and manipulating the multi-protein gluten complex. *Biotechnology* 13: 1185-1190
- Steven E, Ullrich (2011)** Barley Production, Improvement, and Uses. First ed. Wiley-Blackwell
- Wang J, Chen J, Dai F, Wu F, Yang J, Zhang G (2007)** Protein fractions in barley grains as affected by some agronomic factors and their relationships to malt quality. *Cereal Research Communications* 35 (1) : 129-140
- Williams P, Sobering D, Antoniszyn J (1998)** « Méthodes de détermination de la teneur en protéines à la Commission canadienne des grains ». Commission canadienne des grains