



PROJET DE FIN D'ÉTUDES

PRESENTE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE

MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES

GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

Caractérisation moléculaire des ressources génétiques de la collection de l'INRA du prunier (*Prunus domestica* L.)

Présenté par : LBOUKHRISSI Chaymae

Encadré par : Dr. Charafi Jamal (INRA Meknès)

Pr. Al Figuigui Jamila (FST-Fès)

Soutenu le : 13 Juillet 2021

Devant le jury composé de :

- Pr. Rachiq Saad (FST-Fès)
- Pr. Derraz Khalid (FST-Fès)
- Pr. Al Figuigui Jamila (FST-Fès)
- Dr. Charafi Jamal (INRA Meknès)

Année Universitaire : 2020/2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وما اوتيتم من العلم الا قليلا

صدق الله العلي العظيم

Master Sciences et Techniques
Gestion et Conservation de la Biodiversité

Résumé

Nom et prénom : LBOUKHRISSI Chaymae

Année Universitaire : 2020-2021

Titre : Caractérisation moléculaire des ressources génétiques de la collection de l'INRA du prunier (*Prunus domestica* L.)

Le Maroc est considéré comme un centre important de diversité génétique pour un grand nombre d'espèces fruitières occupant une place très importante étant donné leurs rôles socio-économiques et environnementaux. Le présent travail porte sur l'une de ses espèces fruitières en l'occurrence le prunier, cette espèce qui a connu un développement rapide durant ces dernières années pour passer de 8951 ha en 2010 à 15 790 ha en 2019.

Comme pour toutes les espèces arboricoles, et pour accompagner l'effort de la mise en place des stratégies agricoles nationales, l'Institut National de la Recherche Agronomique de Meknès (INRA) a installé une collection des principales variétés du prunier qui entre dans son programme de conservation des ressources génétiques de l'espèce et constitue une base pour la sélection et les programmes d'amélioration génétique. La caractérisation des ressources génétiques est une étape indispensable pour une meilleure gestion de la conservation ex-situ et pour l'accompagnement des programmes de sélection et d'amélioration génétique.

L'étude de la diversité génétique de 29 génotypes de prunier, installés en collection de l'INRA au domaine expérimental d'Ain Taoujdate, par le biais de la technique moléculaire des ISSR, a révélé un polymorphisme élevé.

Vingt amorces utilisées dans cette étude ont engendré 236 marqueurs ISSR reproductibles. Ces marqueurs ont varié de 7 à 22 bandes avec une moyenne de 11,8 bandes par amorce. Ce nombre témoigne du niveau élevé de polymorphisme au sein des génotypes révélés par les amorces sélectionnées.

Toutes les amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec des pourcentages de polymorphisme variables et significatifs. Deux cent deux sur 236 marqueurs (85,6%) se sont avérés polymorphes et 34 (14,4%) monomorphes avec un taux de polymorphisme moyen de 82,3%. Les indices PIC des amorces confirment ce polymorphisme avec des valeurs qui varient de 0,105 jusqu'au 0,451 et avec une valeur moyenne de 0,3.

L'étude des distances génétiques et la comparaison deux-à-deux montrent que tous les paires de génotypes sont distincts par 38 marqueurs jusqu'à 125 marqueurs. La similarité minimale est de 47%, maximale de 84% avec une valeur moyenne de 67%.

Le dendrogramme phylogénétique a permis de montrer l'existence d'une structure génétique évidente des variétés de la collection. La distinction en plusieurs groupes et sous-groupes montre la présence des pools génétiques différents.

Mots clés : *Prunus domestica* L., Diversité génétique, Caractérisation moléculaire, ISSR, Polymorphisme.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de mes grands parents.

A mon très cher papa

A ma très chère maman

Honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez parlante pour exprimer ce que vous méritez pour tout les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance.

J'espère que j'étais et je serais toujours à la hauteur de la confiance que vous m'avez accordée.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et mon grand respect

A toute ma famille.

Spécialement à mes petites nièces Aya et Oumaima, mes neveux Saad, Adam, ChamsEddine et mon petit cœur Amirou

A mes tantes et à mes oncles.

A chaque cousin et cousine.

Respect, amour, reconnaissance sont les moindres sentiments que je peux vous témoigner

A mes Encadrants

A tous mes enseignants tout au long de mes études

A mes amis

A tous ceux qui m'ont encouragé, ne m'ont jamais oublié, qu'ils trouvent ici un signe de grandes amitiés

A

Tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail, qui m'ont soutenu et surtout qui m'ont supporté. Je ne serais qu'à leur exprimer ma grande reconnaissance.

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Ensuite, j'adresse mes sincères remerciements à Madame AL FIGUIGUI Jamila, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Fès pour son aide et ses conseils concernant la mission évoquée dans ce rapport, qu'elle m'a apporté lors des différents suivis, et pour son orientation, sa disponibilité tout au long de la période du stage et durant la préparation à la soutenance.

Je tiens tout particulièrement à adresser mes plus sincères remerciements accompagnés de mon profond respect à mon encadrant Dr. CHARAFI Jamal, chercheur au Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès pour tout le temps qu'il m'a consacré, pour m'avoir dirigé et encouragé tout au long de ce travail, je le remercie pour sa disponibilité, son aide précieuse, ses conseils, ses remarques et pour la confiance qu'il m'a accordé.

Mes remerciements s'adressent également à l'honorable Jury d'avoir accepté d'examiner mon mémoire. Merci à Messieurs RACHIQ Saad et DERRAZ Khalid, Professeurs à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je remercie aussi HAMDANI Anas, doctorant au Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès pour son aide et ses encouragements.

Et je profite de cette occasion pour adresser mes vifs remerciements à toute l'équipe de l'unité « Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques », pour leur esprit coopératif et leur aide, ainsi que tous mes collègues du laboratoire ADIBA Atman, CHAKIB Saida, BENBASSOU Nada, MTALAI Salma, OUAYAT Fatiha et IRCHAD Ahmed pour leur aide et les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Enfin, je souhaite adresser nos remerciements les plus sincères à tous ceux et toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Liste des abréviations

ADN: Acide_DésoxyriboNucléique

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

ARN: Acide RiboNucléique

°C: Degré Celsius

CTAB : Cetyl Triméthyl Ammonium Bromide

dNTp : Désoxyribonucleotide triphosphate

DO : Densité optique

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics

Ha: Hectare

HCl : Acide chlorhydrique

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ISSR: 'Inter – Simple Sequence Repeat'

K20: Potassium

Kb : Kilo base

MADRPMEF : Ministère de l'Agriculture, du développement Rural, la Pêche Maritime et des Eaux et Forêts

Mg : Milligramme

Mgcl₂ : Chlorure de Magnesium

mM : Millimolaire

ml: Millilitre

MT : Marqueur de Taille

N: Azote

NaCl : Chlorure de sodium

ng : Nanogramme

nm: Nanomètre

P2O5: Oxyde de phosphore

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG: Polyéthylène Glycol

PIC: Polymorphism Information Content

QSP : Quantité suffisante pour

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNAs

RFLP: Restriction Fragments Length Polymorphism

SM: Coefficient Simple Matching

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSR : Simple Sequence Repeat = Microsatellites

Taq : *Thermophilus aquaticus*

TBE : Tampon de migration

TH: Température d'Hybridation

TPM : Tour Par Minute

µl : Microlitre

UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages

UV: Ultra-Violet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Systématique du prunier	5
Tableau 2 : Besoins en éléments nutritifs pour le prunier pour un verger (5ans).....	13
Tableau 3 : Caractéristiques des principaux marqueurs.....	24
Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel pour PCR/ISSR.....	30
Tableau 5 : Amorces ISSR utilisées, leurs séquences et températures d'hybridation.	31
Tableau 6 : Concentration d'ADN des 29 géotypes étudiés et leur pureté.	35
Tableau 7 : Liste des bandes, nombre de marqueurs polymorphes (P) et monomorphes (M), pourcentages du polymorphisme lié à la diversité PIC	38

Liste des figures

Figure 1: Arbre du prunier (<i>Prunus domestica</i> L.).....	6
Figure 2 : Situation du prunier au Maroc	8
Figure 3 : Principe du Polymorphisme des fragments de restriction	16
Figure 4 : Révélation du polymorphisme des microsatellites par « P.C.R. ciblée ».	18
Figure 5 : Principe du Polymorphisme d'ADN par Amplification Aléatoire	20
Figure 6 : Mécanisme du Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés	21
Figure 7 : Principe de l'ISSR Si les bases arbitraires de l'amorce sont du coté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du coté 3' le produit B.	23
Figure 8 : Broyeur à billes (Retch MM400)	27
Figure 9 : Centrifugeuse Eppendorf, 5417R	28
Figure 10 : Migration sur gel d'agarose	32
Figure 11 : Système d'imagerie pour la lecture du gel d'agarose	32
Figure 12 : Exemple de test gradient chez les trois amorces ISSR : UBC808-2, IMA834-1 et UBC808-3	36
Figure 13 : Profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés générés par l'amorce UBC818	40
Figure 14 : Profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC808-3.....	41
Figure 15 : Matrice des distances entre les 29 génotypes de prunier.....	43
Figure 16 : Distribution des fréquences de similitude génétique, fournies par les ISSR, pour toutes les combinaisons paires entre les 29 génotypes de prunier.....	44
Figure 17 : Dendrogramme des génotypes étudiés du prunier engendré par les ISSR à l'aide de calcul des distances et la méthode UPGMA.....	46

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Partie I : Partie bibliographique.....	4
I. Généralités sur le prunier	5
1. Historique et origine phytogéographique du prunier.....	5
2. Classification botanique	5
3. Description morphologique générale	6
4. Exigences pédoclimatiques	7
5. Situation du prunier au Maroc.....	8
6. Portes-greffes	10
7. Croissance et développement du fruit.....	11
8. Phénologie du prunier	11
9. Irrigation et Fertilisation du prunier	11
10. rincipales maladies et ravageurs du prunier	12
II – Techniques de marquage moléculaire.....	13
1. Objectif de la recherche agronomique en génétique et amélioration des plantes.....	13
2. Aperçu sur l'évolution des marqueurs.....	14
3. Marqueurs moléculaires co-dominants.....	15
4. Marqueurs moléculaires dominants.....	18
5. Comparaison entre les marqueurs moléculaires co-dominants et dominants.....	24
Partie II : Matériel et Méthodes.....	25
I - Organisme d'accueil	26
II - Matériel végétal	27
III - Extraction d'ADN	27
1- Protocole d'extraction	27
2- Rôle des réactifs.....	28
IV- Evaluation de la qualité et la quantité de l'ADN extrait	29
V- Dilution des échantillons	29
VI -Analyse moléculaire à l'aide des marqueurs ISSR	29
1. Mise au point du mélange réactionnel de la réaction PCR/ISSR	29
2. Conditions de la PCR et choix des amorces ISSR	30
VII -Electrophorèse sur gel d'agarose	31
VIII -Analyse statistique des données	32
Partie III : Résultats et Discussion	34

I – Dosage de l’ADN extrait.....	35
II - Caractérisation moléculaire des 29 géotypes par les marqueurs ISSR.....	36
1. Sélection des amorces ISSR.....	36
2. Caractérisation des géotypes	37
III - Relations génétiques entre les géotypes	42
Conclusion générale	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
ANNEXES	54

INTRODUCTION GENERALE

Les ressources phylogénétiques sont des fondements biologiques de la sécurité alimentaire mondiale. Elles englobent un matériel génétique varié, constitué d'espèces végétales cultivées et sauvages apparentées que l'on peut utiliser à l'heure actuelle ou à l'avenir à des fins alimentaires et agricoles. Cependant, plusieurs espèces végétales sont menacées par des stress biotiques (diverses maladies à caractère épidémique) et abiotiques (urbanisation intensive, des irrégularités pluviométriques et une tendance vers une agriculture industrielle basée sur quelques variétés productives). En effet, seulement 150 espèces végétales sont actuellement cultivées dont 12% assurent environ 75% de notre alimentation et 4% fournissent plus de la moitié des aliments consommables (FAO, 2013). Il en résulte une raréfaction voire une extinction de certaines variétés ancestrales ainsi que de plusieurs de leurs formes apparentées sauvages. Tenant compte de ces considérations, la prise de conscience de l'érosion génétique des espèces végétales a engendré un intérêt accru pour la préservation des ressources phylogénétiques. Conscients de l'importance écologique et socio-économique de ces ressources, les chercheurs en matière de production végétale et de protection de la nature accentuent leurs efforts pour analyser les potentialités adaptatives des espèces végétales en vue de leur valorisation et leur conservation contribuant ainsi à une meilleure exploitation (Ajal, 2014).

Le Maroc est considéré comme un centre important de la diversité génétique pour un grand nombre d'espèces végétales cultivées et sauvages dont plusieurs sont menacées par des stress biotiques et abiotiques. Ainsi, la sauvegarde et la valorisation de ces ressources locales constituent non seulement un impératif mais également une composante majeure de l'équilibre des écosystèmes naturels et de leur valorisation dans des perspectives agro-économiques et environnementales. Il est donc indispensable d'établir une stratégie visant une valorisation rationnelle de ces espèces. Plusieurs actions sont nécessaires pour répondre aux objectifs de cette stratégie. Il s'agit de dresser l'inventaire des accessions, de mener des collectes, d'évaluer la diversité génétique du matériel génétique local, d'établir des actions de conservation in situ (protection de plantes dans leurs sites d'origine) et ex situ (banques de gènes, banques de semences, collections vivantes) et de mettre au point une stratégie d'exploitation rationnelle de ces ressources génétiques (Ajal, 2014).

Parmi les ressources végétales marocaines, les espèces fruitières occupant une place très importante étant donné leurs rôles socio-économiques et environnementaux, avec une superficie de plus de 265.000 Ha (en dehors de l'olivier et les agrumes) et une production moyenne de l'ordre de 884.000 tonnes par an (MADRPM, 2011).

Sur le plan social, ce secteur procure une activité agricole intense permettant de générer

près de 25 millions de journées de travail par an, soit l'équivalent de 165.000 emplois permanents. La filière arboricole fruitière permet à une large frange d'agriculteurs, notamment en zones de montagne, de jouir d'un revenu substantiel contribuant ainsi à la fixation de la population en milieu rural et à la limitation de l'exode vers les centres urbains (MADRPM, 2011).

Sur un plan économique, les différentes filières du secteur contribuent à l'équilibre de la balance commerciale grâce aux exportations de certains fruits frais ou transformés, en l'occurrence les abricots, les prunes et les pêches/nectarines précoces, qui constituent une source non négligeable de devises pour le pays. Ainsi, la filière arboricole tient une place importante dans la consommation nationale, par la satisfaction des besoins nutritionnels de la population et ce grâce à la production d'une gamme diversifiée de fruits frais et transformés évitant, par conséquent, à notre pays le recours aux importations. Par ailleurs, ce secteur assure le maintien en activité d'un important outil de conservation, de conditionnement et de transformation et joue un rôle précurseur vis-à-vis des autres secteurs agricoles en matière d'adoption des innovations technologiques. L'arboriculture fruitière contient au Maroc une large gamme d'espèces arboricoles dont les plus importantes restent l'amandier, le pommier, l'abricotier, le prunier et le pêcher qui occupent, à elles seules, plus de 95% de la superficie nationale (MADRPM, 2011).

Le présent travail porte sur l'une de ces espèces fruitières en l'occurrence le prunier. Cette espèce qui a connu un développement rapide durant ces dernières années pour passer de 8951 ha en 2010 à 15 790 ha en 2019 (FAO, 2019). L'extension de la culture a dépassé les zones de Chaouen-Ouazzane, Kénitra-Rabat, Khémisset et Haouz pour s'étendre dans le plateau de Saïss, la région d'Ifrane-Imouzer et Midelt. Ce développement a concerné la culture semi – intensive conduite en irrigué. Les types de pruniers locaux (Ch'himi, Zouitni, Meknassi,...), anciennement conduits en culture pluviale ont vu leur culture régresser au profit des nouvelles variétés très demandées dans le marché local comme le Golden japan, Santa rosa et Methley (Oukabli et Mamouni 2005).

Comme pour toutes les espèces arboricoles, et pour accompagner l'effort de la mise en place des stratégies agricoles nationales, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) a installé une collection des principales variétés du prunier qui entre dans son programme de conservation des ressources génétiques de l'espèce et constitue une base pour la sélection et les programmes d'amélioration génétique. La caractérisation des ressources génétiques est une étape indispensable pour une meilleure gestion de la conservation ex-situ et pour l'accompagnement des programmes de sélection et

d'amélioration génétique.

Ce travail constitue la première approche de l'évaluation de la diversité génétique d'une collection nationale du prunier à l'aide des marqueurs moléculaires de type (ISSR), il devrait permettre l'identification des cultivars représentatifs de la diversité locale dans le but d'élaborer une collection réunissant la biodiversité disponible et d'assurer la conservation et la gestion des ressources génétiques de cette espèce.

Le présent document est constitué de quatre parties :

- La première partie dresse une synthèse bibliographique assez détaillée sur le prunier.
- Dans la deuxième partie, nous décrivons le matériel végétal ainsi que les différentes techniques d'analyse utilisées
- La troisième partie sera consacrée à la présentation des résultats acquis.
- A l'issue d'une discussion des résultats obtenus ainsi que de leur comparaison avec ceux de nos prédécesseurs, nous suggérerons des recommandations ainsi que des perspectives qui découlent de l'ensemble de nos travaux réalisés.

Partie I : Partie bibliographique

I. Généralités sur le prunier

1. Historique et origine phytogéographique du prunier

D'après Gautier (1993), les pruniers sont d'origine du sud Caucase et du nord de l'Iran, ils étaient cultivés en Syrie à Damas dès la Haute antiquité, puis furent diffusés sur toute la rive Nord de la Mer Med. A l'époque romaine, il existait en Italie de nombreux types de prunier à fruits diversement colorés, dont la Damascène est la plus ancienne. La culture du prunier est à la fois dispersée et relativement concentrée en Amérique (Californie), Argentine, en Asie et en Europe (France, Italie, Espagne)

Au Maroc, les travaux de recherche menés sur cette espèce ont débuté en 1938 à la station d'Ain Taoujdate par des expérimentations de 6 porte-greffes et les performances de quelques variétés de table (Santa Rosa, Giant, Golden Japon et Agen). D'autres études ont été conduites en 1963 sur des variétés à double fin (Stanley, Burton, French, Impériale Epineuse, Prune d'Ente) pour élargir la gamme variétale (Oukabli et Mamoun, 2005).

2. Classification botanique

Les pruniers font partie de la famille des Rosacées et appartient au genre *Prunus* (tableau 1) qui regroupe 400 espèces et des milliers de variétés cultivées (Cronquist, 1981 et Guiheneuf, 1998).

Tableau 1 : Systématique du prunier

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Rosales
Famille	Rosacées
Sous famille	Paranoïdes
Genre	<i>Prunus</i>
Espèce	<i>Prunus domestica</i> L.

3. Description morphologique générale

Le prunier est un arbre fruitier caractérisé par un tronc arrondi et des rameaux à aspect tortueux et très déployé. Son écorce est de couleur grise brune et présente une brillance. Les pruniers se diffèrent en hauteur selon les espèces et les variétés, ainsi les pruniers européens sont plus élevés en hauteur que les japonais (figure 1) (Rieger, 2010).



Figure 1: Arbre du prunier (*Prunus domestica* L.)

3.1 Rameau

Le développement des rameaux est annuel, ils sont de couleur verte et deviennent marron et plus aoutés avec l'âge. Leur dimension est en fonction du porte-greffe et la richesse du sol alors que la longueur des entre nœuds diffèrent selon les variétés (Hilaire, 2002).

Gautier, (1988) a rapporté que chez le prunier domestique, la croissance de la pousse est sympodiale. Cette croissance est active en mai et juin. Vers la fin juin début juillet la plupart des rameaux cessent de croître, le bourgeon terminal tombe par abscission au-dessus du dernier œil. Le phénomène débute sur les rameaux les plus faibles ou les rameaux retombants. Sur les arbres, les rameaux les plus vigoureux continuent leur croissance plus longtemps jusqu'à la 2^e quinzaine de juillet, puis intervient la chute des bourgeons terminaux.

3.2 Feuilles

Les feuilles du prunier sont alternes courtement pétiolées, ovales, dentées, acuminées, présentent quelques nectaires sur le pétiole et de deux stipules à leur base (Bretaudeau et Fauré, 1991).

3.3 Fleur

La fleur du prunier est hermaphrodite composée d'un calice mono-cépitale à cinq divisions, d'une corolle à cinq pétales, 20 à 30 étamines qui portent les anthères productrices de pollen, et un pistil plus long que les étamines avec un ovaire, le nombre de fleurs par arbre est estimé d'environ 3000 (Benettayeb, 1993)

Le prunier est très exigeant pour la pollinisation croisée et la fécondation. On distingue des variétés autogames, partiellement auto-fertiles et des variétés auto stériles (Bretaudeau et Faure, 1991) et (Blanchet, 1994). Pour les variétés auto fertiles (ou partiellement auto fertiles) la présence d'un pollinisateur compatible est un facteur de régulation de la production. Selon les régions, ces phénomènes d'auto-fertilité et d'autostérilité sont quelquefois modifiés par les conditions ambiantes (Bretaudeau et Faure, 1991).

3.4 Racine

Le système racinaire de l'arbre est souvent superficiel, parfois semi-pivotant, et présente une résistance à l'asphyxie radriculaire (Guyot et Gibassier, 1966).

3.5 Fruit

Le fruit est une drupe charnue de forme variable, composée de l'extérieur vers l'intérieur d'un épiderme lisse, mince, toujours glabre, couvert de pruine (Lespinasse et Leterme, 2005), de couleur variable : jaune, jaune-verte, rougeâtre, bleue –violacée, puis une chaire plus ou moins ferme, juteuse, acidulée ou sucrée et finalement un noyau qui présente une grosseur variable selon les variétés, il renferme une amande à saveur amère en raison de la présence d'acide cyanhydrique

4. Exigences pédoclimatiques

Le prunier est considéré comme un arbre rustique (Guiheneuf, 1998). Néanmoins, les exigences climatiques, différent selon les groupes variétaux. Ainsi, selon Gautier (1988), les pruniers européens préfèrent les climats continentaux aux hivers rigoureux. Par contre, les pruniers japonais se développent bien dans la zone méditerranéenne.

4.1 Température

Le prunier est une espèce qui tolère les températures froides hivernales et nécessite de 800 à 1100 heures de température froide en dessous de 7.2°C. En cas d'insuffisance en froid, la floraison et la feuillaison sont étalées. Les variétés européennes sont légèrement plus exigeantes en froid que les variétés japonaises (700 à 1000 heures en froid). Le prunier craint les gelées printanières à cause de sa floraison précoce. Il préfère des printemps chauds et secs. (Skiredj A, Walali L, 2003).

Selon Guibras et Clavet (1979), Le prunier entre en végétation à une température moyenne de 10°C, une température de -4 °C détruit le bouton floral, -2 °C détruit les fleurs, et de -1 °C endommage les jeunes fruits.

4.2 Pluviométrie

Les besoins globaux du prunier entre le début de mai à la fin de septembre sont évalués à 400-420 mm en sol nu travaillé, et 430-450 mm en sol enherbé (Gautier, 1988).

4.3 Sol

Le prunier est capable de se développer sur une large gamme de sols, de silico-argileux à argileux de préférence profonds, bien drainants, il faut cependant éviter les sols légers et les situations trop humides. Le prunier supporte jusqu'à 10% de calcaire actif et la plus part des porte-greffes résistent bien à l'asphyxie radiculaire. Par contre il redoute les sols, très limoneux et les sables très fins à pH en dessous de 6 (Bretaud, 1979 ; Gautier, 1988 ; Guiheneuf, 1998). De point de vue physique, les sols les plus favorables à la culture du prunier sont ceux dont la structure permet un bon développement des racines, une bonne circulation de l'eau et de l'air. Le prunier préfère les sols dont le pH se situe autour de la neutralité (Gautier, 1988).

4.4 Influence du vent

Le prunier craint le vent humide venant de la mer ou vent desséchant. On lui réserve des situations bien abritées.

5. Situation du prunier au Maroc

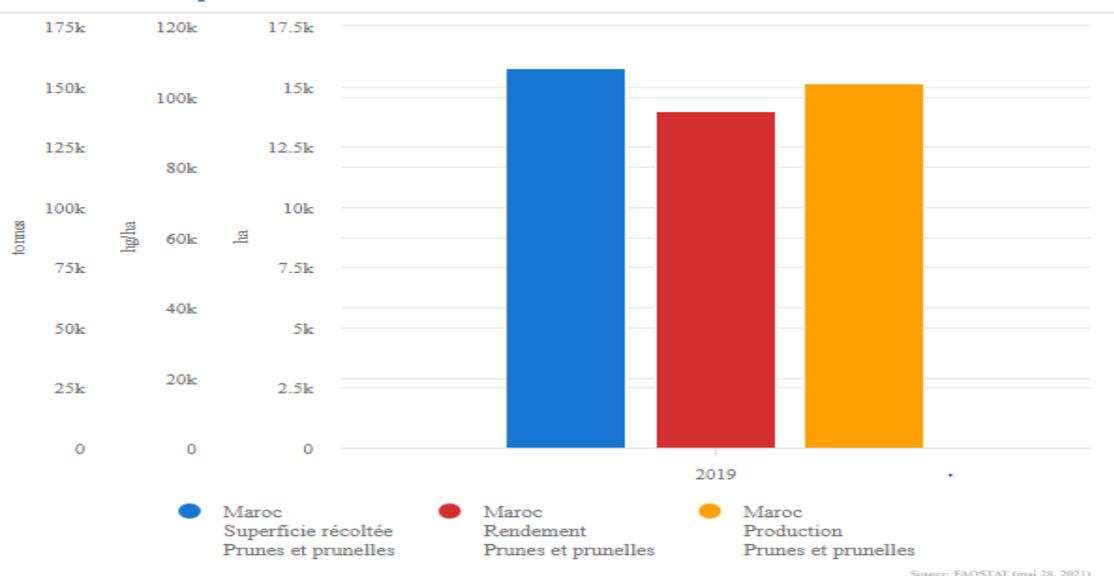


Figure 2 : Situation du prunier au Maroc (FAOSTAT, 2019)

Au Maroc, le prunier est l'une des principales espèces qui a connu un développement rapide, avec une superficie récoltée de 15 790 ha et une production annuelle estimée à 151 488

Tonnes/an (figure 2) (FAO, 2019). La majorité des variétés cultivées au Maroc sont de type Japonais (Golden Japan, Formosa, Santa rosa, Methley, Red Beauty), ce sont des variétés aqueuses et supportent mal les manipulations et le transport. La variété Stanley cultivée notamment au niveau de la région de Khémisat et Meknès, constitue la base des plantations au Maroc. Cette variété a donné de très bons résultats en termes de production. Des variétés tardives pouvant supporter de longues périodes de conservation ont été introduites au Maroc comme : Royal Diamant, Black Diamond (Oukabli et Mamouni, 2005).

6. Portes greffes

6.1. Importance des porte-greffes chez les arbres fruitiers

C'est la bonne combinaison du porte greffe et du greffon qui donne l'ensemble des caractéristiques de l'arbre fruitier. Si le greffon permet de donner les caractéristiques du fruit recherchés : goût, précocité, capacité de résistance aux maladies. Les porte-greffes peuvent avoir des effets notables sur les greffons, comme le contrôle de la hauteur des plantes, le temps de la floraison, la résistance au froid, résistance aux maladies et la composition nutritionnelle de la plante (Dozier et al, 1983). Oukabli (2006), rapporte que les porte-greffes assurent aussi par leur système racinaire, le stockage des réserves et l'absorption hydrominérale

6.2. Porte-greffes chez le prunier

Plusieurs porte-greffes sont disponibles pour les pruniers, qui sont adaptés à nos conditions pédoclimatiques. Les porte-greffes du prunier sont essentiellement le franc (*Prunus domestica*), le prunier GF 43, le prunier myrobolans (*Prunus cerasifera*), le prunier Mariana GF 81, les pruniers Damas et St Julien (Walali et Skiredj, 2003). Oukabli, (2006) rapporte que les porte-greffes les plus utilisés au Maroc sont les sélections Myrobolan B et Marianna GF 81, qui s'adaptent bien aux sols argileux profonds et tolèrent l'asphyxie.

7. Croissance et développement du fruit

Selon Stand (1999), le développement du fruit commence avec la formation des boutons floraux pendant la saison précédente. Ces derniers sont généralement formés après que les pousses aient cessé de croître en mai ou juin. Selon cet auteur, l'ovaire de la fleur a deux ovules, un ovule sera fécondé et se développe en fruit, tandis que l'autre ovule se désintègre à la paroi de l'ovaire ou péricarpe. Le péricarpe est constitué de trois couches : l'épicarpe, qui se développe dans la peau du fruit ; mésocarpe, qui forme la partie comestible charnue du fruit ; et l'endocarpe, qui devient le noyau. La croissance du fruit du prunier, comme dans d'autres espèces de *Prunus* est en double sigmoïde. Après la fécondation, le fruit passe généralement par trois phases de croissance, la durée de chaque étape varie en fonction de la variété.

Le stade I est une période de croissance rapide, principalement composée de la division cellulaire, qui commence 5 à 6 semaines après pleine floraison (Guiheneuf, 1998), et dure environ 30 jours. A la fin de cette phase, presque la quasi-totalité du fruit a été formée. L'endocarpe commence à durcir à la fin de l'étape I. Une importante chute des petits fruits non fécondés ou dont l'embryon est avorté se produit (Blanchet, 1994 ; Stand, 1999).

Le durcissement du noyau marque le début de la phase II, au cours de laquelle la taille des fruits augmente plus lentement. La croissance du péricarpe ralentit et s'arrête à la fin de ce stade. La phase II est très court et peut se chevaucher avec la phase III pour les variétés précoces, mais dure plusieurs semaines dans les variétés à maturation tardive (Stand, 1999).

La phase III est la période de croissance du mésocarpe qui dure généralement 4 à 6 semaines avant la récolte, la croissance au cours de cette étape implique l'expansion des cellules de l'épicarpe et mésocarpe qui ont été formées lors de la phase I, caractérisée par un grossissement rapide et l'enrichissement en sucres. La durée de croissance des fruits est estimée entre 100 et 180 jours (Blanchet, 1994 ; Guiheneuf, 1998).

8. Phénologie du prunier

C'est l'ensemble des processus et changements que subit l'arbre durant une année. Elle dépend des conditions externes, notamment les aléas climatiques.

8.1 Dormance

Le début de l'entrée en dormance coïncide avec la chute des feuilles et l'arrêt de l'allongement des pousses induit par des photopériodes courtes. Ainsi, les bourgeons formés à la fin de l'été passent l'hiver en état de dormance et ne reprennent normalement leur croissance qu'au printemps lorsque les conditions de température redeviennent plus favorables. La dormance des bourgeons est donc un mécanisme de défense qui aide la plante à survivre aux conditions hivernales défavorables. Pour la levée de la dormance, le prunier nécessite entre 700-1000 heures de froid. Des signaux chimiques tels que la teneur en sucres dans les bourgeons semblent influencer l'entrée en dormance des bourgeons végétatifs (Anderson et *al.*, 2001). Dans la majorité des cas, les phytochromes ou les hormones végétales sont les plus impliqués dans l'entrée ou la levée en dormance.

8.2 Induction florale

L'induction florale représente le passage au stade reproducteur, elle débute par la différenciation des cellules méristématiques, pour former les pièces foliacées et les bractées, associées à une croissance anticipée de leurs méristèmes axillaires qui engendreront directement les fleurs. Ce phénomène dépend du niveau de mobilisation des réserves

glucidiques accumulées par la plante sous le contrôle hormonal. L'organogenèse des pièces florales se poursuit de juillet à septembre. Les pièces reproductrices, d'abord sous forme rudimentaire, évoluent tout au long de l'hiver. Quelques jours avant l'anthèse, intervient la mise en place du sac embryonnaire et des grains de pollen (Gautier, 1988).

8.3 Floraison

Les espèces fruitières de la famille des rosacées fleurissent presque toutes au printemps, à partir du mois de février ou au début du mois de mars lorsque la température du milieu s'élève peu à peu et varie généralement selon les régions et les conditions climatiques de l'année (Gautier, 2001). D'après Mikolajski et Rooney (2007), les fleurs éclosent au printemps avant l'apparition des feuilles avec une couleur blanche. La floraison du prunier est une période délicate, elle se déroule dans un temps chaud et ensoleillé favorisant la sortie des abeilles ce qui favorise la fécondation. A l'inverse, un temps froid empêche le déroulement de la pollinisation.

8.4 Nouaison

A la fin de la floraison et la chute de tous les pétales, la base de calice commence à grossir, la nouaison est effectuée. Elle est définie comme étant le mécanisme qui prend la relève de la floraison. Elle peut être le résultat de la fécondation des fleurs et la formation des fruits. La nouaison est contrôlée par plusieurs paramètres (le climat, la nutrition et l'irrigation) (Benettayeb, 1993).

8.5 Maturation

Le fruit subit d'importantes transformations internes, il acquit ses qualités gustatives, l'épiderme change de couleur après la cueillette. Le fruit détaché de l'arbre arrête sa croissance, mais n'arrête pas son évolution, celle-ci se poursuit jusqu'à la maturité de consommation qui varie selon les variétés.

9. Irrigation et Fertilisation du prunier

9.1 Besoin en eau

Les besoins en eau du prunier varient selon la région (demande climatique) et l'âge des arbres. Pour un verger adulte et en pleine production, une bonne alimentation en eau améliore le calibre des fruits, réduit l'alternance et le vieillissement des arbres. Les besoins en eau du prunier sont élevés durant la période (mai-juillet). Selon les pluies, l'irrigation débute donc à partir du mois de mai et commence par des irrigations à faible dose (10 à 15 m³/ha). Les doses d'irrigation augmentent sensiblement avec les chaleurs pour atteindre un maximum en juillet et août. Un volume journalier de 25 à 40 litres/arbre est nécessaire durant une période de 5 à 6 mois (mai à octobre), pour assurer une bonne production. Il est souhaitable également d'assurer

l'humectation sur toute la rangée en mettant des goutteurs de part et d'autre du tronc et entre les arbres sur la même ligne. Un manque d'eau en période estivale affecte le grossissement des fruits et l'élaboration des sucres. A l'approche de la maturité, les doses d'irrigation doivent être réduites pour favoriser l'accumulation des sucres dans le fruit et faciliter son séchage dans les fours (Oukabli et Mamouni, 2005).

9.2 Fertilisation du prunier

Engrais est un élément important utilisé par les agriculteurs afin d'accroître le rendement des cultures. L'azote se considère comme l'un des nutriments les plus coûteux parmi les fumures utilisées dans la production agricole. On estime en effet que près de 85 à 90 millions de tonnes d'engrais azotés sont ajoutés au sol dans le monde entier chaque année, ce qui représente 60% de la consommation d'engrais dans le monde, suivi par le phosphate (25%) et le potassium (15%).

Selon Mamouni et Oukabli (2005), pour un verger productif (5ans) les besoins en éléments nutritifs pour le prunier sont représentés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Besoins en éléments nutritifs pour le prunier pour un verger (5ans)

Élément fertilisant	Besoins
N	80 à 100 kg/ha à fractionner en 3 apports (1/3 au débourrement 1/3 après nouaison et 1/3 après récolte pour constituer les réserves
K20	100 à 150 kg/ha
P205	30kg/ha

10. Principales maladies et ravageurs du prunier

Chez le prunier, il existe de nombreuses maladies dues soit à des bactéries (*Pseudomonas syringae* et *P. morsprunorum*, criblure de feuilles, galle du collet), soit à des cryptogames (moniliose, rouille, *coryneum*, tavelure, cloque). Les ravageurs animaux présentent aussi un réel danger s'ils ne sont pas contrôlés. On peut citer le carpocapse, les acariens, les cochenilles, pucerons, tordeuse, cératite, capnode, zeuzère et cossus (Walali et Skiredj, 2003).

II – Techniques de marquage moléculaire

1. Objectif de la recherche agronomique en génétique et amélioration des plantes

L'objectif des recherches agronomiques en génétique et amélioration des plantes est de sélectionner de nouvelles variétés, performantes, productives et de meilleures qualités. Pour cela, il est nécessaire d'exploiter efficacement et de manière raisonnée la diversité génétique des plantes cultivées et de leurs apparentées sauvages. Il s'agit d'une étape indispensable à tout progrès d'amélioration génétique. L'étude de la diversité génétique permet de mieux gérer et valoriser les ressources génétiques (Adam & Dron, 1993). Le principe est d'étudier la variabilité qui existe au niveau des gènes (les allèles) à différents niveaux : niveau interspécifique (entre espèces) et au niveau population (entre populations). L'objectif recherché est d'identifier et dénombrer des entités distinctes et quantifier la variabilité génétique (Lesica et Allendorf, 1999 ; Martin *et al.*, 1999).

À ce niveau, les analyses reposent essentiellement sur l'utilisation des marqueurs génétiques, représentant chacun une portion du génome, ces marqueurs permettent de caractériser des individus et de mesurer leur variabilité génétique. Les premiers marqueurs utilisés dans la génétique des populations correspondaient à des caractères phénotypiques qui représentent l'inconvénient d'être sous l'influence des facteurs environnementaux (Adam et Dron, 1993).

Les caractéristiques d'un marqueur idéal peuvent être résumées comme suit :

- Polymorphe : c'est à dire variable entre individus
- Discriminant : permettant de différencier des individus très proches
- Multi-alléliques : possédant plusieurs allèles sur un même locus
- Co-dominant : un individu hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes.
- Indépendant du milieu : le génotype du marqueur peut être déterminé à partir de son phénotype quel que soit le milieu
- Réparti uniformément dans tout le génome : afin d'évaluer le polymorphisme dans de multiples endroits du génome
- Reproductible
- Economique et manipulable à grande échelle (Santoni *et al.*, 2000)

2. Aperçue sur l'évolution des marqueurs

2.1 Marqueurs morphologiques

Avant l'utilisation des marqueurs moléculaires, les études de la diversité et de la caractérisation génétique se limitaient aux observations morphologiques. Observer un caractère morphologique, c'est attribuer à chacun des individus, la valeur mesurée d'un caractère tels que les différents tests de virulence et de pathogénicité, les calibres, les formes, les couleurs des organes, la précocité, le rendement, etc. ... (Prado et *al.*, 1999). Ils ont servi à Mendel pour établir les fondements de la génétique. Ces marqueurs sont le plus souvent dominants. Il peut arriver que la forme récessive homozygote soit létale, ce qui complique l'analyse génétique. Les marqueurs morphologiques sont limités en nombre et leur expression est souvent fortement influencée par le milieu. Les différents individus doivent être évalués dans les mêmes conditions environnementales. Ces marqueurs ne doivent pas être négligés malgré leurs limites car ce sont encore les critères utilisés pour décrire et identifier les lignées et variétés chez les végétaux (Santoni et *al.*, 2000).

2.2 Marqueurs physiologiques

Les marqueurs physiologiques correspondent à tout type de molécules, facilement repérables, dont la présence renseigne sur un stade de développement, un état physiologique ou des situations complexes faisant intervenir de nombreux paramètres en interaction (Santoni et *al.*, 2000).

2.3 Marqueurs biochimiques

Les séquences exprimées du génome codent pour des protéines dont une partie assure les réactions enzymatiques du métabolisme. Les allèles d'un même locus codent pour des protéines qui peuvent présenter des différences de séquences et éventuellement d'activité. La quantité d'une substance peut ainsi révéler des variations des enzymes responsables de son accumulation. Les produits du métabolisme secondaire qui est très actif chez les arbres forestiers sont utilisables dans certains cas comme marqueurs. Les protéines enzymatiques, provenant directement de la traduction du génome, sont des marqueurs moins soumis à l'influence du milieu et de l'ontogenèse surtout si elles interviennent dans le métabolisme primaire : il s'agit des iso-enzymes. Ils sont parmi les premiers marqueurs utilisés pour la caractérisation des génotypes des plantes en 1983 par Tranksley et Orten. Leur polymorphisme peut révéler de nombreux allèles. Ces marqueurs correspondent uniquement à des séquences traduites. Ils ont été particulièrement utilisés dans les études génétiques, les études taxonomiques et les programmes de développement de variétés des Brassicaceae. Le

polymorphisme des enzymes est détecté par électrophorèse. Ces marqueurs sont co-dominants, ce qui permet de distinguer les homozygotes des hétérozygotes (Santoni et *al.*, 2000).

2.4 Marqueurs moléculaires

Suite au développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire, ces nouveaux marqueurs génétiques ont été rapidement utilisés pour vérifier la conformité variétale. Il s'agit des marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), des marqueurs AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism), des marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) et des microsatellites. Ils sont désormais abondamment utilisés afin de caractériser la structure des populations de plusieurs organismes (Santoni et *al.*, 2000; de Vienne & Santoni, 1998).

Tout récemment, l'utilisation de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) prend de l'ampleur car ce type de marqueurs permet d'observer des différences au niveau de séquences d'ADN codant. En tant que marqueurs génétiques, les SNP remplacent rapidement les répétitions de séquences simples (SSR) car ils sont plus abondants, stables, se prêtent à l'automatisation, efficaces et de plus en plus rentables (McCouch, et *al.*, 2010).

Les marqueurs moléculaires et les techniques qui permettent de les révéler peuvent être séparés en deux grands groupes : d'une part, les techniques qui fournissent des marqueurs co-dominants et révélés individuellement et, d'autre part, celles qui révèlent « en masse » des marqueurs dominants. Cette séparation est certes simplificatrice mais elle correspond à deux types majeurs d'utilisation des marqueurs (Santoni et *al.*, 2000).

3. Marqueurs moléculaires co-dominants

Ils sont révélés individuellement : RFLP, SSR, SNP ... Ces techniques visent à révéler le polymorphisme dans ou au voisinage d'une séquence particulière (technique spécifique de locus) (Santoni et *al.*, 2000).

3.1 Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP)

3.1.1 Enzymes de restriction

Les enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites spécifiques comprenant, en général, un nombre pair de bases (4, 6 ou 8). Une enzyme ayant un site de reconnaissance à 6 bases coupe l'ADN toutes les 4 096 bases en moyenne (46). Un génome de 109 bases peut donc produire environ 250 000 fragments de restriction de longueur variable. La spécificité est telle que le remplacement d'une seule base dans un site suffit à empêcher la coupure de l'ADN par l'enzyme

utilisée. C'est cette spécificité qui est exploitée pour la mise en évidence du polymorphisme : une présence/absence de site de restriction entraîne un polymorphisme de longueur des fragments (Santoni *et al.* 2000).

3.1.2 Principe du Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP)

Le principe repose sur la comparaison de profils de coupure par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre. Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction vont provoquer des longueurs de fragments de restriction différentes (figure 3). L'ADN des individus à comparer est donc digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les produits de restriction sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide ou d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire (Tagu, 1999).

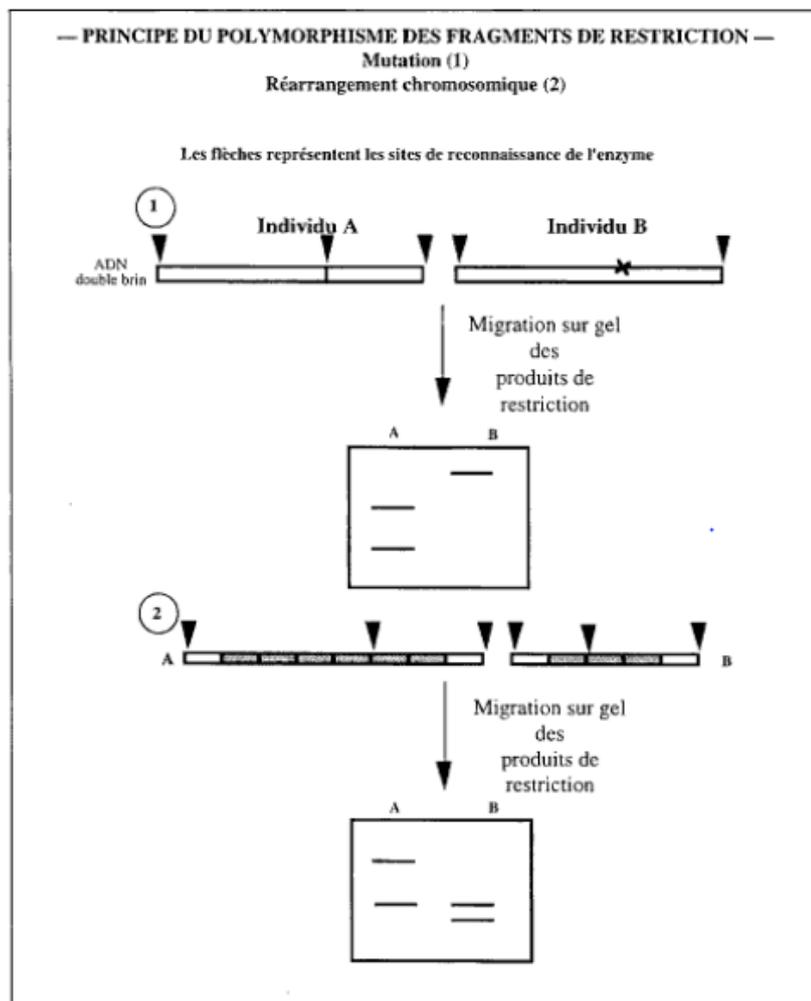


Figure 3 : Principe du Polymorphisme des fragments de restriction

3.2 Microsatellites

3.2.1 Principe de la technique PCR (Polymerase Chain Reaction)

En 1983, Kary Mullis, chercheur de la jeune firme de biotechnologie californienne Cetus, invente la *polymerase chain reaction* (PCR). Une technique qui permet d'amplifier des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'une ADN polymérase et d'amorces nucléotidiques spécifiques. Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus :

- ❖ La dénaturation des deux brins d'ADN à température élevée (environ 95°C) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares
- ❖ L'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40°C et 65°C afin de permettre une bonne fixation des amorces)
- ❖ La réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C.

Cette technique de P.C.R. a littéralement révolutionné les recherches en biologie moléculaire et trouve de nombreuses applications aussi bien dans le clonage et l'étude de l'expression des gènes que dans la recherche d'un polymorphisme génétique.

3.2.2 Principe des microsatellites

Les séquences microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) sont constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétra nucléotidiques (figure 4). Les plus courantes sont (A)_n, (AT)_n, (GA)_n, (GT)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, etc., la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. De tels motifs sont très abondants dans le génome des organismes eucaryotes. Chez les végétaux supérieurs, les premières estimations indiquent qu'il y aurait en moyenne un microsatellite di nucléotidique tous les 30 à 100 kb. Un motif microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus, mais les séquences bordantes le sont. Une paire d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de ces régions bordantes permettra, grâce à la PCR, d'amplifier ce seul locus microsatellite et de disposer ainsi d'un marqueur microsatellite. Le polymorphisme de longueur sera révélé en électrophorèse en gel d'acrylamide ou d'agarose à haute résolution (Santoni et *al.*, 2000).

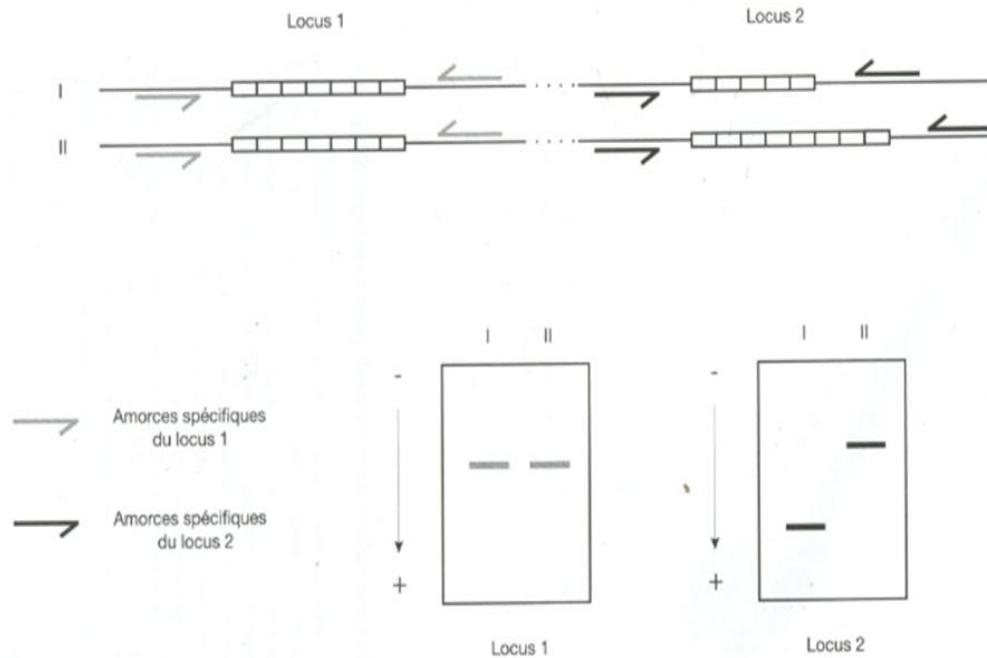


Figure 4 : Révélation du polymorphisme des microsatellites par « P.C.R. ciblée ». Grâce aux amorces spécifiques de locus, le polymorphisme des différents microsatellites peut être révélé individuellement.

3.3 Polymorphismes nucléotidiques simples (SNP)

Tout récemment, l'utilisation de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) prend de l'ampleur car ce type de marqueurs permet d'observer des différences au niveau de séquences d'ADN codant. Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) sont la forme la plus abondante de variation génétique dans les génomes eucaryotes. Les SNP peuvent être fonctionnellement responsables de traits ou de phénotypes spécifiques, ou ils peuvent être informatifs pour retracer l'histoire évolutive d'une espèce ou le pedigree d'une variété. En tant que marqueurs génétiques, les SNP remplacent rapidement les répétitions de séquences simples (SSR), car ils sont plus abondants, stables, se prêtent à l'automatisation, efficaces et de plus en plus rentables. L'intégration d'une capacité de génotypage SNP à haut débit promet d'accélérer le gain génétique dans un programme de sélection, mais impose également une série d'obstacles économiques, organisationnels et techniques (McCouch, et *al.*, 2010).

4. Marqueurs moléculaires dominants

Ils sont révélés « en masse » RAPD, ISSR, AFLP. Les techniques décrites ici, toutes fondées sur la PCR, ne « ciblent » pas une région particulière du génome fixée à l'avance. Presque toujours, elles révèlent simultanément plusieurs locus (jusqu'à plus d'une centaine), ce qui permet souvent, en peu d'expériences, de caractériser sans ambiguïté un génotype. Elles sont naturellement utilisées pour réaliser du génotypage rapide (ou fingerprinting / empreintes génétiques) mais

servent également pour la cartographie génétique chaque fois qu'il faut saturer en marqueurs une région particulière du génome (Santoni et *al.*, 2000).

4.1 Polymorphisme d'ADN par Amplification Aléatoire (RAPD)

Le principe des RAPD consiste à réaliser une réaction PCR sur l'ADN de l'individu étudié en utilisant une amorce courte, de 10 nucléotides en général, de séquence arbitraire (figure 5). L'amorce va s'hybrider chaque fois que se trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire (ou comportant un nombre limité de mésappariements). Si deux sites d'hybridation sont proches l'un de l'autre (à moins de 3 000 pb) et en direction opposée, c'est-à-dire dans une configuration permettant la PCR, l'amplification aura lieu. Si un de ces deux sites est absent dans un autre individu, il n'y aura pas d'amplification et un polymorphisme de présence/absence sera observé. Les produits d'amplification obtenus en RAPD, dont le nombre dépasse rarement la dizaine, sont en général séparés par électrophorèse en gel d'agarose (Santoni et *al.*, 2000).

Elle permet d'obtenir rapidement des fragments variés d'ADN génomique, qui seront ensuite analysés. Les conditions de préparation des échantillons et des cycles de la P.C.R. doivent être optimisées pour chaque application afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats (Tagu, 1998). Cette technique n'est pas limitée par le nombre d'amorces et permet d'identifier fréquemment le polymorphisme qui existe entre individus étudiés (Khadari et *al.*, 2001).

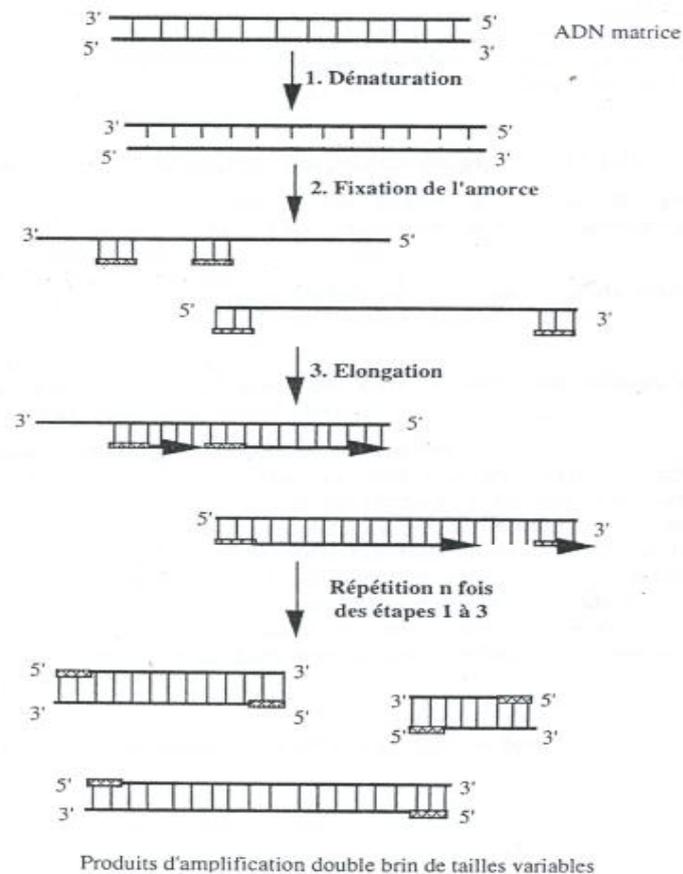


Figure 5 : Principe du Polymorphisme d'ADN par Amplification Aléatoire

Les marqueurs RAPD ont été utilisés dans l'élaboration des cartes génétiques de plusieurs plantes (MacRoberts et *al.*, 1999), et dans l'étude de la structuration de la diversité au sein d'un grand nombre d'espèces, particulièrement au niveau inter et intra-spécifique (Thormann et *al.*, 1994; Castragna et *al.*, 1997 ; Khadari et *al.*, 2003; Chen et Yamaguchi, 2005).

4.2 Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP)

La technique AFLP est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. L'ADN génomique purifié est d'abord coupé par deux enzymes de restriction (généralement EcoRI et MseI) ayant des sites de reconnaissance respectivement de 6 et 4 bases (figure 6). Des adaptateurs de séquence connue de 10 à 15 bases, adaptés aux extrémités cohésives des sites de restriction, sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN par une réaction de ligation. Une première amplification, dite présélective, amplifie les fragments d'ADN à l'aide d'amorces correspondant à la séquence des adaptateurs et du site de restriction additionné en 3' d'une base définie arbitrairement. Un mésappariement de cette base 3' terminale de l'amorce empêche totalement l'amplification. La deuxième amplification, dite sélective, utilise des amorces identiques aux premières,

additionnées de 1, 2 ou 3 bases supplémentaires à leur extrémité 3'. Un sous-ensemble de fragments est alors amplifié.

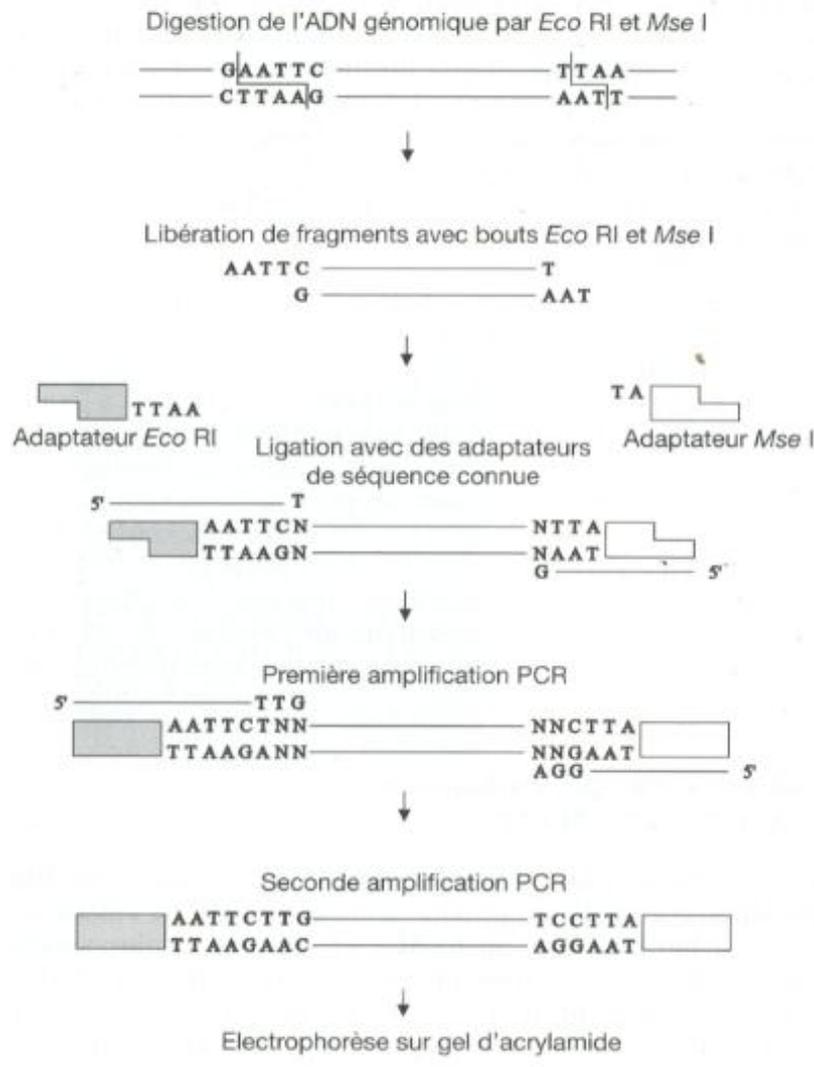


Figure 6 : Mécanisme du Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés (Tagu, 1998)

Les produits de l'amplification finale sont séparés par électrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant (gel de séquence). Ils peuvent être ensuite visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de la seconde amplification. Les profils sont en général complexes (50 à 100 bandes). Le nombre de bases arbitraires des amorces de l'amplification sélective détermine le nombre de bandes produites en fonction de la taille du génome de l'organisme étudié (Santoni et *al.*, 2000).

4.3 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) / Amplification inter microsatellite

Les marqueurs ISSR, liés aux séquences ou nucléotides de l'espace présent entre les séquences simples répétées (SSR) dans le génome, sont basés sur le polymorphisme de taille de 200 à 2500pb le long de ces espaces inter-microsatellites amplifiables par une seule amorce PCR (Zietkiewicz et *al.*, 1994). En général, les locus microsatellites sont régulièrement distribués en grand nombre à travers le génome d'eucaryote, fournissant ainsi un pool riche en potentiels marqueurs ISSR convenables pour révéler la diversité étroitement associée aux accessions (Wiesner et Wiesnerová, 2003).

En effet, cette amplification ISSR est définie par variation des PCR qui utilise des amorces à simple séquence répétée comme [AC]_n, pour amplifier les régions situées entre les séquences microsatellites (figure 7) (Kahl, 2001). Selon Zietkiewicz et *al.*, (1994), La production des marqueurs ISSR est, par rapport aux marqueurs AFLP, SSR et RFLP, moins coûteuse, rapide et facile à optimiser. Par ailleurs, ils sont considérés plus reproductibles que ceux de RAPD et détectent un grand polymorphisme génomique que les marqueurs RFLP (Zietkiewicz et *al.*, 1994; Oh et *al.*, 2000). Les marqueurs ISSR se sont révélés également très polymorphes, ils permettent ainsi de distinguer des variétés génétiquement très proches (Santoni et *al.*, 2000).

La technique ISSR a été largement et diversement appliquée dans l'étude de la variabilité génétique des plantes (Godwin et *al.*, 1997) et la caractérisation de certains organismes fongiques (Grunig et *al.*, 2001). Ainsi, elle a été utilisée pour déterminer le polymorphisme génétique des espèces de Sorghom, Ipomoea, Eucalyptus, Oryza, Lupinu, Asparagus, etc. (Yang et *al.*, 1996; Prevost et Wilknsn, 1999; Qian et *al.*, 2001; Sica et *al.*, 2005).

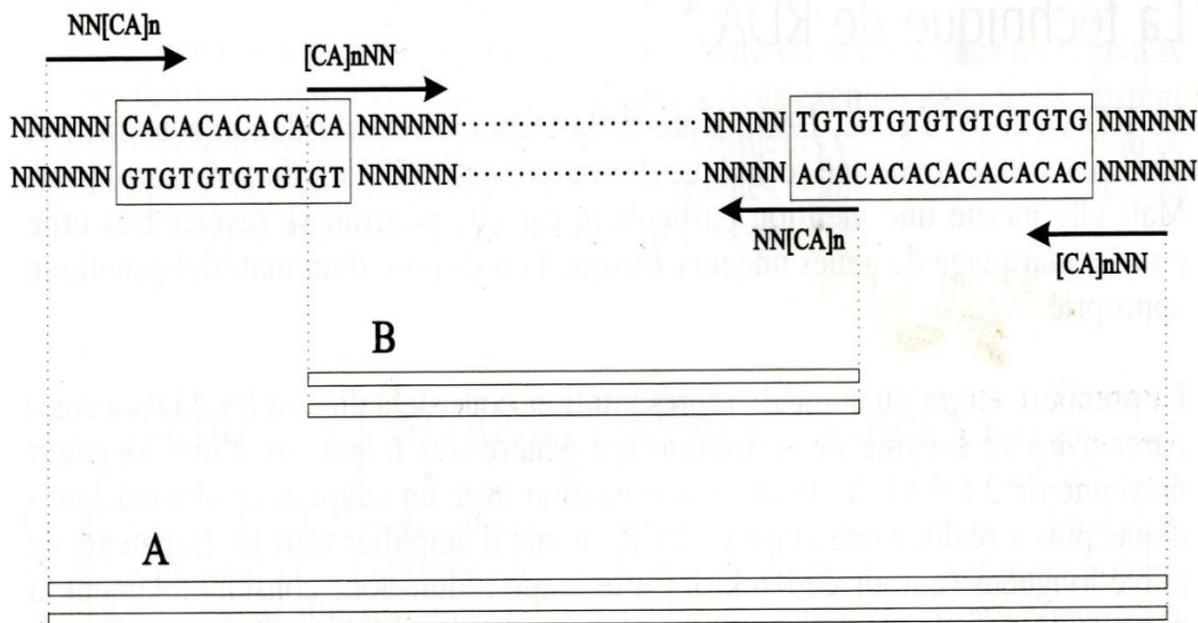


Figure 7 : Principe de l'ISSR Si les bases arbitraires de l'amorce sont du coté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du coté 3' le produit B. (Tagu, 1999)

Les marqueurs ISSR ont été très utilisés pour l'analyse du polymorphisme génétique au niveau inter et intra spécifique chez plusieurs espèces, à savoir le cas du riz (Joshi et al., 2000), le maïs (Kantety et al., 1995), la pomme de terre (Bornet et al., 2002) , le lupin (Talhinhas et al, 2003) et le prunier (Weisheng et al., 2007 ; Kadir et al., 2009 ; Weifeng et al., 2018). Les ISSR ont constitué des marqueurs de choix pour les avantages qu'ils présentent (Zietkiewicz et al., 1994). Ces marqueurs ISSR ont permis de révéler un niveau élevé de polymorphisme.

5. Comparaison entre les marqueurs moléculaires co-dominants et dominants

Tableau 3 : Caractéristiques des principaux marqueurs

	RFLP	SSR	RADP	AFLP	ISSR
Type de marqueurs	Enzyme / sonde	Amorce spécifique bordant le microsatellite	Amorce de séquences arbitraires	Enzyme / Amorce	Amorces de séquence de microsatellites / Bases arbitraires
Nombre de marqueurs	Illimité	Quelques milliers	Illimité	Illimité	Illimité
Polymorphisme	Elevé	Elevé	Très élevé	Très élevé	Très élevé
Type de polymorphisme	Site de restriction/ longueur de fragments d'amplification	Nombre d'unités de répétition	Site d'hybridation d'amorces	Site de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires	Taille des fragments d'amplification
Caractérisation génétique	Loci co-dominants et révélés individuellement		Loci dominants révélés en masse		
Reproductibilité	Parfaite	Parfaite	Faible	Faible	Forte

Pour l'étude de la diversité génétique, le choix d'une technique de marquage moléculaire dépend de l'espèce étudiée, du niveau de polymorphisme recherché, des données préliminaires sur le génome de l'espèce, du degré de technicité et du coût de la technique.

Partie II : Matériel et Méthodes

I. Organisme d'accueil

Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès – 9Km Route Haj Kaddour-Meknès

Le Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès couvre la zone d'action des Directions Provinciales d'Agriculture (DPA) de Boulemane, El Hajeb, Fès, Ifrane, Khénifra, Taounate, Taza et Sefrou. Les projets de recherche conduits au niveau du centre s'articulent autour de la gestion intégrée de l'arboriculture, intensification durable des grandes cultures, l'amélioration et diversification des systèmes de production en zones de montagne du Moyen Atlas, la conservation des ressources naturelles et la protection de l'environnement et de la biodiversité

Unités de Recherche

- Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques
- Agronomie et Physiologie Végétale
- Gestion Durable des Ressources Naturelles
- Protection des Plantes

Unité de Recherche Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques (URAPCRG)

Les recherches conduites au sein de l'URAPCRG s'articulent autour de la :

- Caractérisation des ressources génétiques locales et introduites et mise en collections conservatrices vivantes dans les domaines expérimentaux ou en chambre froides.
- Intégration des outils biotechnologiques en amélioration génétique des plantes pour la création de matériel végétal agronomique performant.
- Transfert des connaissances, du matériel végétal et autres produits de recherches auprès des utilisateurs.

L'URAPCRG dispose de quatre laboratoires, le présent travail a été réalisé au sein du **laboratoire du marquage moléculaire**. Ce dernier a pour mission d'appuyer les programmes d'amélioration génétique conduites sur les espèces pérennes/annuelles d'intérêt agronomique à savoir : prunier, grenadier, olivier, figuier etc. à travers la caractérisation moléculaire des ressources génétiques locales et introduites pour leur conservation, in-situ et ex-situ et leur utilisation dans ces programmes.

II - Matériel végétal

Cette étude a inclus 29 géotypes de prunier, installés en collection de l'INRA au domaine expérimental d'Ain Taoujdate. Les cultivars ont été plantés en 1996 à un écartement de 5m x 3m, à raison de 9 arbres par cultivar. Le verger est conduit en irrigué au goutte à goutte, de mai à mi-octobre. Les arbres sont conduits en forme libre (goblet) avec élimination des rejets. Le matériel végétal est composé de jeunes feuilles qui ont été prélevées au début de l'apparition de feuillage sur les arbres (mi-mars), puis congelées à -20°C. Elles sont ensuite lyophilisées dans un lyophilisateur type WPA Biowave S2100 pour servir à l'extraction de l'ADN.

III - Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN nécessite 3 étapes primordiales, dont :

- Action physique : consiste à détruire les structures cellulaires par broyage mécanique.
- Action chimique (lyse chimique) : tendant à solubiliser les composantes biochimiques du tissu et détruire les parois cellulaires.
- Purification (isolation) de l'ADN des autres molécules biologiques présentes dans les cellules (protéines, polysaccharides, composés phénoliques etc.), puis précipitation de l'ADN par l'alcool (isopropanol) et lavage par l'alcool (éthanol 70%).

1- Protocole d'extraction (Saghai maroof *et al.*, 1984)

Une quantité de 40 mg des feuilles lyophilisées ont été broyées mécaniquement à l'aide d'un broyeur à billes de type (Broyeur : Retch MM400) (figure 8), cette action physique consiste à détruire les structures cellulaires (particulièrement les parois cellulaires).



Figure 8 : Broyeur à billes (Retch MM400)

La poudre obtenue est mise dans un tube Eppendorf de 2ml à laquelle nous ajoutons 1250 µl de tampon d'extraction CTAB (voir composition Annexe n°3). Le CTAB est considéré comme un détergent cationique qui fragilise le lien entre l'ADN et les protéines. Ainsi, il détruit les

structures lipidiques membranaires, et fixe les polysaccharides et les polyphénols. Ensuite les tubes sont placés dans un bain marie réglé à 65 °C, pendant 30 min à 1 heure, en mixant avec le vortex toutes les 15 min. Puis, 500 µl de chloroforme/iso-amylque (24/1) (Annexe n°4) est ajouté et l'ensemble est agité à température ambiante pendant 20 min.

La solution obtenue est centrifugée à 13 000 tours par minute (TPM) à 25°C pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse de type (Centrifugeuse Eppendorf, 5417R) (figure 9). La phase aqueuse (supérieure) est transférée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5ml et la phase organique est éliminée.



Figure 9 : Centrifugeuse Eppendorf, 5417R

Un volume de 500µl du chloroforme/iso-amylque (24/1) est additionné et le mélange est agité pendant 3min et centrifugé à 13000 TPM à 25 °C pendant 10min. Après récupération du surnageant, nous y ajoutons 1ml d'isopropanol, les tubes sont placés 30min à 4°C (ou dans la glace). L'ADN est précipité avec 1ml d'isopropanol et l'ensemble est centrifugé 15min à 13 000 TPM à 4 °C. La phase liquide est soigneusement retirée. Le culot d'ADN récupéré est fixé au fond des tubes est rincé avec 500µl d'éthanol 70% (Annexe 5). Ce dernier est soigneusement retiré et le culot est laissé sécher à l'air libre pendant 15min environ. Finalement, 100µl de la solution Tris-EDTA (0,5 x) est ajouté à l'ADN récupéré pour être conservé au congélateur à -20°C.

2-Rôle des réactifs

2.1. Effet du milieu basique

L'objectif est de détacher (solubiliser) les histones (protéines à pH très basique, chargées positivement dans un milieu relativement acide par rapport à leur pH) de l'ADN (chargé négativement) en augmentant le pH du tampon d'extraction pour faire acquérir une charge

similaire à celle de l'ADN. Ceci crée une répulsion entre les deux types de molécules. Aussi, le pH basique limite l'action d'enzyme qui endommage l'ADN Désoxyribonucléases et qui demande l'intervention des cations (Mg^{2+} et Mn^{2+}).

2.2. Rôle des concentrations élevées en sel

L'utilisation de concentrations élevées en sel dans l'extraction de l'ADN a pour le rôle d'affaiblir la liaison entre l'ADN et les molécules chargées positivement (compétition vis-à-vis de l'eau).

IV- Evaluation de la qualité et la quantité de l'ADN extrait

La quantité d'ADN extraite est évaluée par la mesure de la DO à 260nm. Elle est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'ADN (ng/}\mu\text{l)} = \text{valeur d'absorbance à 260nm} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$$

Une autre mesure de la DO prise à 280nm permet d'évaluer également la quantité de protéines contenue dans la suspension d'ADN. Ainsi, la pureté de la solution est estimée via le ratio : absorbance 260 nm / absorbance 280 nm.

Un ratio inférieur à 1,8 indique une contamination par des protéines ou des substances aromatiques (par exemple : le phénol). Un ratio supérieur à 2 indique une possible contamination par l'acide ribonucléique (ARN). En pratique, les PCR ont bien fonctionné lorsque ces ratios sont compris entre 1,6 et 2,2.

V- Dilution des échantillons

L'objectif est d'avoir une concentration finale pour chaque échantillon de 20 ng/ μ l d'ADN. Pour tous les échantillons, on considère la concentration finale (C_F) à atteindre, à partir de la concentration initiale mesurée par le spectrophotomètre (C_I) et le volume final (V_F). Donc on calcule le volume initial (V_I) à prendre de chaque échantillon comme suit :

$$V_I = (C_F * V_F) / C_I$$

VI -Analyse moléculaire à l'aide des marqueurs ISSR

1. Mise au point du mélange réactionnel de la réaction PCR/ISSR

La PCR permet d'amplifier des séquences cibles (des microsatellites et d'I.S.S.R), afin de pouvoir identifier les marqueurs de l'individu. La spécificité de l'amplification est déterminée par les amorces qui sont spécifiques d'une séquence précise et unique du génome.

La composition du mélange réactionnel est celle décrit par (Houmnate et *al.*, 2016) (tableau 4).

Le volume final nécessaire pour la réaction PCR est fixé à 25 μ l.

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel pour PCR/ISSR.

1x Tampon de Taq
1,5mM MgCl₂
0,2 mM pour chaque dNTP
5 μM d'Amorce
1 U de Taq
20 ng d'ADN

2. Conditions de la PCR et choix des amorces ISSR

Un ensemble de 44 amorces ISSR a été testé sur 6 échantillons pris au hasard. Le but est de sélectionner un nombre d'amorces qui régénèrent des profils très clairs et reproductibles. Les tests sont effectués par le biais d'un Thermocycler-gradient qui permet le bon choix des températures d'hybridation.

Les amplifications ont été effectuées dans un Thermocycleur à 96 puits (Modèle Eppendorf, Mastercycler gradient) selon le programme ci-dessous :

Dénaturation initiale T : 94 °C -----> 5 minutes

Dénaturation T : 94 °C -----> 1 minute

Hybridation T : X °C -----> 1minute

Elongation T : 72 °C -----> 1 minute

Elongation finale T : 72 °C -----> 10 minutes

} **35 cycles**

Avec X la température d'hybridation pour laquelle on a testé 12 températures différentes entre 40 °C à 60°C

Vingt amorces sont ainsi sélectionnées grâce à leurs profils moléculaires (Tableau 5).

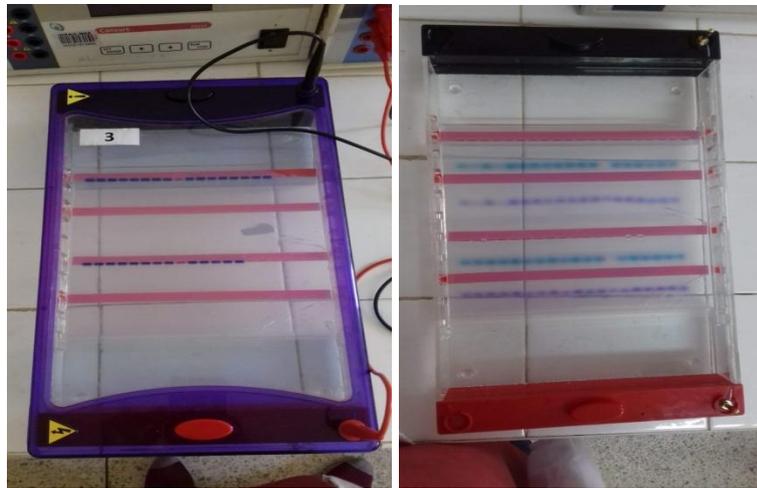
Tableau 5 : Amorces ISSR utilisées, leurs séquences et températures d'hybridation.

Amorce	Séquence (5' - 3')	T.H (°C)
F2	[CA] 6GC	50.7
F4	[AGC] 4CT	45.4
F7	[AC] 8CT	50.7
F8	[AG] 8CC	50.7
F10	[CA] 8AG	50.7
F11	[CA] 8AC	41.3
F14	[GT] 8CT	41.3
ISSR-1	[AG] 8CA	45.4
ISSF-1	[AG] 8TA	43.1
IMA-9-Z	[GA] 8CG	50.7
IMA-12-1	[CA] 8TC	50.7
IMA-834-Z	[AG] 8YT	50.7
IMA-834-1	[AG] 8YT	50.7
UBC-808-2	[AG] 8C	43.1
UBC-808-3	[AG] 8C	41.3
UBC-808-4	[AG] 8C	50.7
UBC-807	[AG] 8T	45.4
UBC-810	[GA] 8T	43.1
UBC-817	[CA] 8A	50.7
UBC-818	[CA] 8G	45.4

VII -Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose séparant des fragments ayant des tailles entre 0,2 et 2 kb a été utilisée pour la séparation des marqueurs ISSR générés après l'amplification par la PCR. Le gel utilisé est de 2% d'agarose préparé avec un tampon de TBE 1X (annexe n°8) sous un courant électrique en respectant la polarisation du pôle négatif vers le positif, sous un voltage de 4V/cm. Un marqueur de taille de type 1kb plus-ladder (invitrogen) (Annexe n°10) est servi comme témoin.

Après l'ajout de 5µl de bleu d'agarose (Annexe 9), les produits PCR sont ensuite déposés dans les puits du gel, en laissant un puit pour le marqueur de taille. L'électrophorèse a été effectuée sous 150 V jusqu'à ce que le colorant ait migré de plus que 2/3 de la distance dans le gel (figure 10).



Début

Fin

Figure 10 : Migration sur gel d'agarose

La révélation a été effectuée à l'aide du Bromure d'Ethidium (0,5 µg/ml) pendant 45 min. La lecture du gel d'agarose se fait dans un système d'imagerie utilisant l'UV à l'aide du logiciel VISION CAPT (figure 11). Les fragments d'ADN révélés sur gel sont appelés marqueurs.



Figure 11: Système d'imagerie pour la lecture du gel d'agarose

VIII -Analyse statistique des données

Les tailles de bandes produites par les marqueurs ISSR ont été calculées à l'aide du logiciel Mesurim pro en se basant sur un algorithme produit par les bandes de marqueur de taille.

L'interprétation des profils ISSR se fait phénotypiquement sur la base de la présence ou l'absence des différents fragments amplifiés pour chaque amorce chez tous les individus

analysés. La valeur « 1 » indique la présence d'une bande à un niveau de migration donné (Poids moléculaire en pb) alors que la valeur « 0 » signifie son absence dans un autre profil électrophorétique ; puisque les marqueurs sont dominants, chaque bande représente le phénotype d'un locus biallélique. Une fois la lecture est achevée, une matrice binaire constituée de 1 (présence) et 0 (absence) est créée où les lignes représentent les marqueurs dans une position déterminée et les colonnes représentent les génotypes étudiés.

A partir de la matrice des données nous pouvons calculer et comparer les différents paramètres permettant d'évaluer le polymorphisme entre les génotypes.

Les relations génétiques entre les génotypes analysés sont étudiées sur la base d'une matrice de similarité en utilisant le nombre de bandes polymorphes (Nei et Li, 1979). Les distances génétiques sont calculées à l'aide de programme Clustering Calculator développé par Brzustowski (2002) par le biais de Simple Matching Coefficient. Ainsi, sur cette base, un histogramme de comparaison des individus deux-à-deux en fonction du nombre de marqueurs ISSR qui les distinguent est par conséquent établi.

Un dendrogramme de classification ascendante hiérarchique pour les marqueurs ISSR a été construit sur la base de Simple Matching Coefficient, par le biais du logiciel NTSYS-pc ver. 2.11 (Rohlf, 2000).

Le paramètre dit P.I.C. (Polymorphism information content) lié à la diversité génétique pour chaque amorce utilisée est évalué selon la formule d'Anderson et *al.* (1993). Le PIC d'une bande (pour un marqueur dominant) est calculé comme suit :

$$PIC_i = 1 - \sum_j f_{ij}^2$$

Où f_{ij} est la fréquence du motif jème de la bande ième (noter que les marqueurs dominants ont deux modèles pour un groupe comme étant présents et absents). Ensuite, le PIC de chaque amorce est déduit par la formule suivante :

$$PIC = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n PIC_i$$

Partie III : Résultats et Discussion

I – Dosage de l'ADN

La quantité et la qualité de l'ADN extraite joue un rôle important dans la réussite de son amplification par PCR.

Tableau 6 : Concentration d'ADN des 29 géotypes étudiés et leur pureté.

Géotypes	A 260/280 (nm)	Concentration (ng/μl)
G1	1.957	1100
G2	1.980	3790.1
G3	1.975	1954.6
G4	1.883	1220.8
G5	1.930	1100
G6	1.932	1993.2
G7	1.881	1818.6
G8	2.002	686.8
G9	1.821	1220.4
G10	1.808	786.31
G11	1.827	604.15
G12	1.941	1150
G13	1.846	959.5
G14	1.934	1150.6
G15	1.926	600.8
G16	1.804	400
G17	1.907	1850
G18	1.968	800.54
G19	1.950	1150
G20	1.803	1200.4
G21	1.820	1100.9
G22	1.887	1485.7
G23	1.893	1220.8
G24	1.821	1150.9
G25	1.931	950.82
G26	1.908	650.7
G27	1.993	1150
G28	1.982	1060.7

G29	2.020	650.09
------------	-------	--------

Les résultats du dosage d'ADN des 29 génotypes, donnent un rapport qui varie entre 1,803 pour la variété G20 et 2,020 pour la variété G29. L'ADN des génotypes est généralement de bonne qualité. Cependant, celui des génotypes G8 et G29, décèle la présence des ARN avec des rapports supérieurs à 2 (Tableau 6).

II - Caractérisation moléculaire des 29 génotypes par les marqueurs ISSR

1. Sélection des amorces ISSR

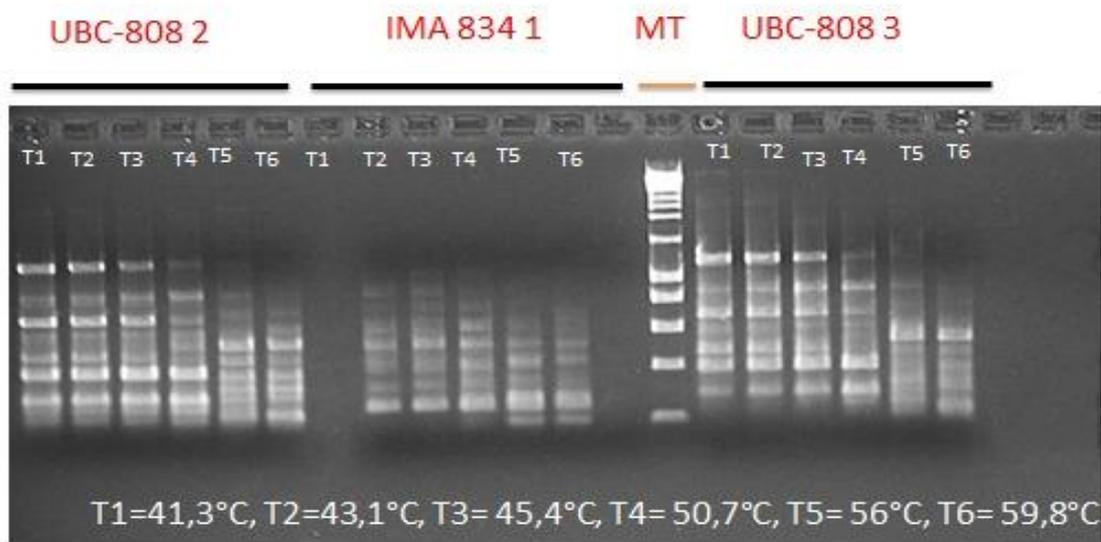


Figure 12 : Exemple de test gradient chez les trois amorces ISSR : UBC808-2, IMA834-1 et UBC808-3

Après avoir testé un total de 44 amorces ISSR par un test gradient de la température d'hybridation et la révélation sur gel d'agarose (2%), 20 amorces (46 %) ont généré des profils bien lisibles et reproductibles (voir exemple de gel : Figure 12). Selon plusieurs auteurs (Machkour-M'rabet et *al.* 2009; Wolfe, 2000; Oh et *al.*, 2000), la technique ISSR est dotée d'une meilleure qualité de ses profils qui émane surtout de la longueur de séquence de ses amorces, procurant des bandes épaisses et reproductibles. Dans des travaux similaires, seulement 11 amorces ISSR ont été utilisées pour caractériser des cultivars de prunier japonais (Basilio et *al.*, 2012) et 16 amorces ISSR pour des variétés de *Prunus domestica* L. (Qi et *al.*, 2015). Aussi, Weifeng et *al.* (2018) ont utilisés 14 amorces ISSR pour étudier la variabilité de 33 cultivars d'une collection de prunier.

2. Caractérisation des génotypes

Les résultats sont illustrés par le tableau 7 et les figures 13 et 14.

Tableau 7 : Liste des 20 amorces ISSR utilisées, leurs séquences, températures d'hybridation (TH), tailles des bandes, nombre de marqueurs polymorphes (P) et monomorphes (M), pourcentages du polymorphisme lié à la diversité PIC

Amorce	Séquence	T.H (°C)	Taille des bandes	Nombre des bandes	P	M	P (%)	PIC
F2	[CA] 6GC	50.7	318 - 3071	8	7	1	87.5	0.323
F4	[AGC] 4CT	45.4	614 - 3353	11	11	0	100	0.343
F7	[AC] 8CT	50.7	159 - 2785	16	15	1	93.6	0.381
F8	[AG] 8CC	50.7	233 - 3489	15	15	0	100	0.451
F10	[CA] 8AG	50.7	202 - 3438	15	15	0	100	0.351
F11	[CA] 8AC	41.3	207 - 1832	11	9	2	81.8	0.297
F14	[GT] 8CT	41.3	283 - 1318	10	4	6	40	0.129
ISSR-1	[AG] 8CA	45.4	160 - 971	10	4	6	40	0.105
ISSF-1	[AG] 8TA	43.1	331 - 2784	8	7	1	87.5	0.359
IMA9-Z	[GA] 8CG	50.7	227 - 2771	22	22	0	100	0.421
IMA12-1	[CA] 8TC	50.7	206 - 1783	7	5	2	71.4	0.232
IMA834-Z	[AG] 8YT	50.7	188 - 1586	16	14	2	87.5	0.333

IMA934-1	[AG] 8YT	50.7	165 - 577	8	5	3	62.5	0.196
UBC808-2	[AG] 8C	43.1	217 - 808	9	9	0	100	0.322
UNC808-3	[AG] 8C	41.3	235 - 737	7	4	3	57.1	0.183
UBC808-4	[AG] 8C	50.7	150 - 705	12	11	1	91.7	0.292
UBC807	[AG] 8T	45.4	385 - 3289	12	12	0	100	0.370
UBC810	[GA] 8T	43.1	260 - 1834	13	13	0	100	0.319
UBC817	[CA] 8A	50.7	222 - 2279	15	15	0	100	0.383
UBC818	[CA] 8G	45.4	246 - 1006	11	5	6	45.5	0.208
			Moyenne	11.8	10.1	1.7	82.3%	0.3

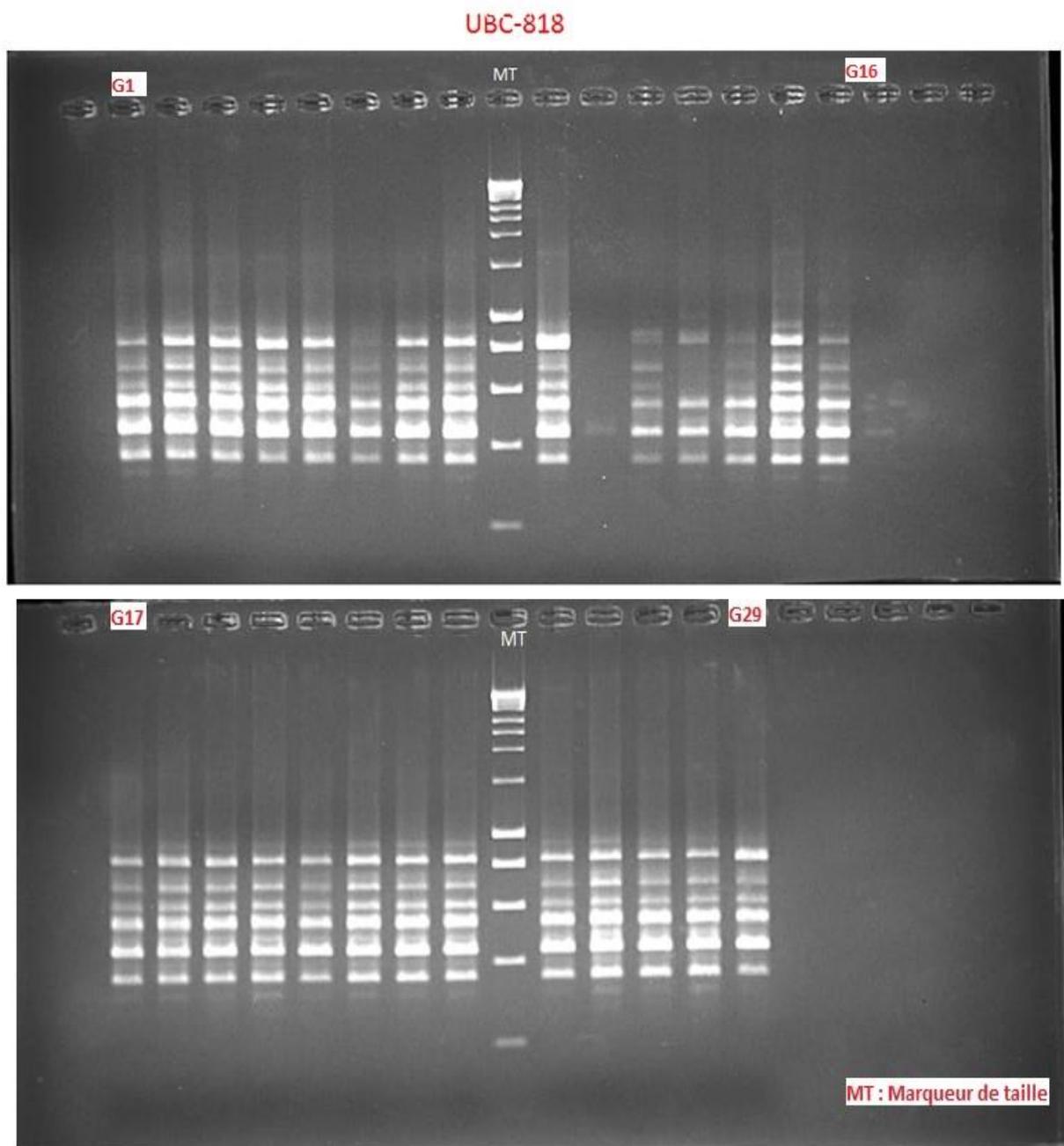


Figure 13 : Profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC818.

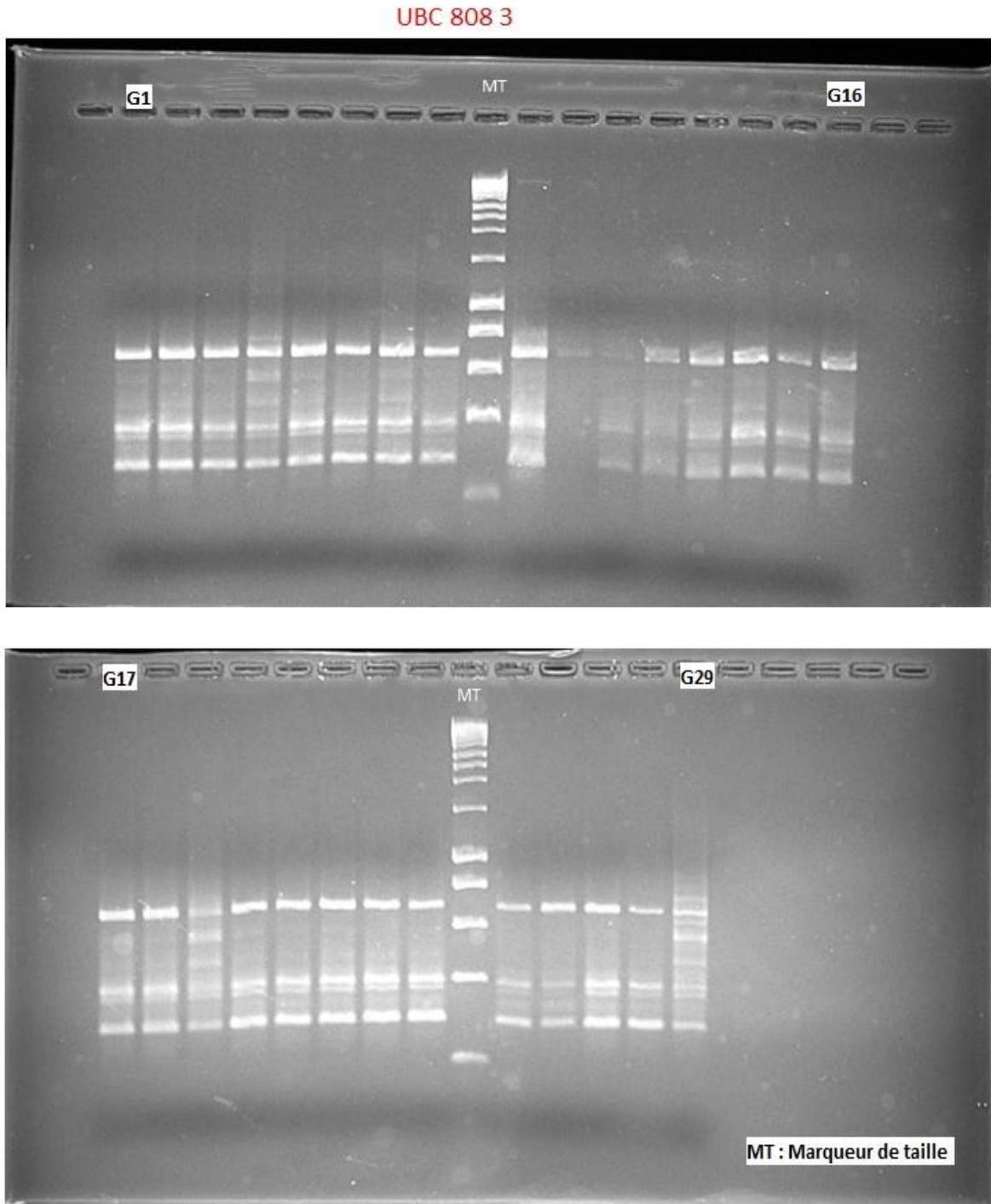


Figure 14 : Profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC808-3.

Vingt amorces utilisées dans cette étude ont donné 236 marqueurs ISSR clairs et reproductibles. En comparaison avec d'autres travaux sur le prunier, le nombre obtenu est supérieur aux nombres révélés par plusieurs études. Par exemple chez le prunier, pour 33 génotypes et avec 14 amorces, Weifeng *et al.* (2018) ont trouvé 146 bandes. De même, Weisheng *et al.* (2007) ont détecté 103 fragments par 12 amorces parmi 104 variétés. Chez d'autres espèces fruitières, l'abricot par exemple, Ming *et al.* (2013) ont trouvé 155 marqueurs en utilisant 15 amorces chez 14 cultivars.

Le nombre de marqueurs par amorce varie entre 7 pour les amorces IMA12-1 et UBC808-3 et 22 pour l'amorce IMA9-Z avec une moyenne de 11,8 marqueurs par amorce (Tableau 7). Ce nombre témoigne du niveau élevé de polymorphisme au sein des génotypes étudiés (voir exemples de gel : Figure 13 et 14). Le résultat obtenu est supérieur à celui obtenu par Weisheng *et al.* (2007) qui ont trouvé un nombre allant de 4 à 13 marqueurs avec une moyenne de 8,58. Aussi chez 33 génotypes, Weifeng *et al.* (2018) ont élucidés un nombre de marqueurs par amorce qui varie entre 6 et 16 avec une moyenne de 10,4 marqueurs et celui de Kadir *et al.* (2009) avec 9,8 bandes en moyenne, 5 nombre minimum et 17 comme maximum. Chez d'autres espèces, le caroubier par exemple, Le nombre de marqueurs ISSR révélé par 15 amorces oscille entre 1 et 19 avec une moyenne de 11 par amorce (Konate, 2007). En général, le nombre de marqueurs ISSR généré, est positivement corrélé avec le nombre d'amorces utilisées. Cependant, ce nombre peut être beaucoup influencé par l'espèce végétale analysée et par la nature du gel de migration utilisé (Nagaraju *et al.*, 2002; Wiesner et Wiesnerová 2003).

La taille des bandes générées par ces 20 amorces chez les génotypes de prunier est variable. Elle oscille entre 150 pb (cas de l'UBC808-4) et 3489 pb (cas de F8) (Tableau 7). Selon Basilio *et al.* (2012), la technique ISSR génère des fragments d'ADN amplifiés dont la taille varie de 300 à 3500 pb.

Toutes les amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec des pourcentages de polymorphismes variables et significatifs. Deux cent deux soit (85,6%) des fragments se sont avérés polymorphes et 34 soit (14,4%) monomorphes (Tableau 7) avec un taux de polymorphisme moyen de 82,3%, plus sa valeur tend vers 100%, plus l'amorce en question est polymorphe et vice versa. Les amorces F4, F8, F10, IMA9-Z, UBC807, UBC810 et UBC817 présentent un indice de diversité maximum (100%) qui ont données respectivement 11, 15, 15, 22, 12, 13 et 15 bandes polymorphes. Le pourcentage de polymorphisme moyen de cette étude est supérieur à celui trouvé par Ming *et al.* (2013) qui est de 62,49%. Cependant, il est faible

par rapport aux études de Kadir et *al.* (2009) avec 89% de bandes polymorphes. Ces différences entre les études sont du principalement à la différence de nombre et type d'amorces utilisées et aussi au type du matériel végétal caractérisé. D'autre part, le monomorphisme révélé par ces marqueurs (34 marqueurs monomorphes) appartenant aux 12 différentes amorces, est d'une grande importance moléculaire, d'autant plus qu'ils peuvent être proposés et exploités comme étant des marqueurs ISSR liés au prunier.

Les valeurs du contenu d'information sur le polymorphisme (PIC) indiquent la capacité de distinguer entre les génotypes pour chaque amorce. Toutes les amorces utilisées ont généré des profils très polymorphes, avec un indice PIC variable entre 0,105 comme valeur minimale pour l'amorce ISSR-1 et 0,451 pour l'amorce F8, comme valeur maximale et une valeur moyenne de 0,3 (Tableau 7). Ces valeurs sont inférieures aux valeurs de PIC obtenues par Kadir et *al.* (2009), dans une étude de caractérisation moléculaire des génotypes du prunier par les marqueurs ISSR, qui varient de 0,350 à 0,938. Cette différence observée pourrait être due aux génotypes utilisés, ainsi qu'à la nature et le nombre des marqueurs moléculaires obtenus. Dans notre étude, la majorité des amorces ont montré des valeurs de PIC aux alentours de 0,3 indiquant le pouvoir discriminant intéressant des amorces utilisées.

III - Relations génétiques entre les génotypes

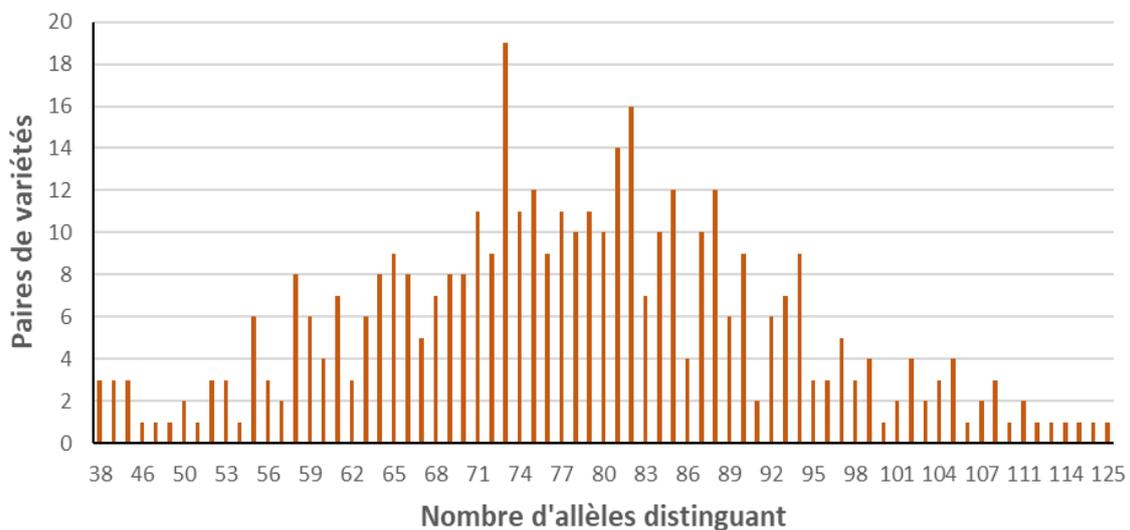


Figure 15 : Distribution des fréquences de similitude génétique, fournies par les ISSR, pour toutes les combinaisons paires entre les 29 génotypes de prunier

G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	G24	G25	G26	G27	G28	
G02	0,280																											
G03	0,216	0,191																										
G04	0,318	0,360	0,297																									
G05	0,314	0,271	0,250	0,309																								
G06	0,335	0,377	0,339	0,364	0,343																							
G07	0,314	0,381	0,326	0,225	0,356	0,369																						
G08	0,314	0,305	0,301	0,360	0,280	0,292	0,398																					
G09	0,297	0,246	0,225	0,318	0,280	0,309	0,347	0,263																				
G10	0,419	0,436	0,458	0,483	0,479	0,331	0,403	0,487	0,411																			
G11	0,369	0,386	0,390	0,458	0,360	0,314	0,445	0,411	0,369	0,280																		
G12	0,369	0,377	0,398	0,475	0,419	0,339	0,436	0,343	0,343	0,271	0,237																	
G13	0,305	0,373	0,343	0,394	0,347	0,275	0,373	0,331	0,322	0,275	0,191	0,258																
G14	0,254	0,305	0,326	0,352	0,347	0,394	0,314	0,305	0,297	0,428	0,318	0,369	0,297															
G15	0,332	0,377	0,398	0,407	0,403	0,314	0,394	0,360	0,335	0,381	0,297	0,331	0,267	0,284														
G16	0,318	0,301	0,322	0,339	0,335	0,373	0,360	0,343	0,326	0,415	0,441	0,441	0,419	0,318	0,373													
G17	0,301	0,275	0,263	0,347	0,326	0,347	0,343	0,284	0,309	0,432	0,356	0,373	0,301	0,318	0,322	0,364												
G18	0,284	0,275	0,271	0,322	0,258	0,331	0,360	0,284	0,250	0,441	0,305	0,356	0,275	0,267	0,297	0,322	0,161											
G19	0,398	0,373	0,377	0,309	0,364	0,394	0,280	0,398	0,322	0,445	0,411	0,377	0,381	0,297	0,335	0,377	0,275	0,258										
G20	0,305	0,339	0,343	0,343	0,347	0,352	0,314	0,347	0,386	0,326	0,343	0,271	0,305	0,318	0,369	0,275	0,246											
G21	0,326	0,360	0,347	0,339	0,369	0,390	0,369	0,352	0,335	0,458	0,356	0,398	0,335	0,250	0,254	0,339	0,288	0,254	0,233	0,258								
G22	0,292	0,318	0,288	0,322	0,309	0,347	0,343	0,326	0,309	0,466	0,381	0,381	0,309	0,292	0,280	0,322	0,246	0,212	0,258	0,242	0,178							
G23	0,309	0,343	0,347	0,356	0,352	0,373	0,369	0,309	0,292	0,449	0,373	0,373	0,318	0,250	0,314	0,356	0,288	0,246	0,309	0,301	0,229	0,161						
G24	0,373	0,331	0,352	0,394	0,390	0,470	0,424	0,373	0,331	0,496	0,453	0,470	0,398	0,314	0,360	0,394	0,301	0,309	0,271	0,331	0,233	0,208	0,233					
G25	0,301	0,343	0,322	0,339	0,335	0,364	0,335	0,309	0,292	0,432	0,356	0,390	0,309	0,267	0,297	0,347	0,237	0,246	0,258	0,267	0,195	0,212	0,178	0,233				
G26	0,301	0,360	0,271	0,347	0,326	0,339	0,326	0,301	0,275	0,432	0,390	0,381	0,292	0,309	0,314	0,356	0,271	0,237	0,284	0,242	0,246	0,178	0,220	0,225	0,161			
G27	0,288	0,381	0,343	0,403	0,347	0,394	0,432	0,347	0,331	0,445	0,326	0,369	0,314	0,305	0,301	0,360	0,309	0,267	0,288	0,280	0,191	0,233	0,250	0,246	0,199	0,250		
G28	0,318	0,360	0,347	0,415	0,360	0,390	0,411	0,335	0,309	0,356	0,331	0,331	0,301	0,318	0,288	0,398	0,288	0,280	0,318	0,258	0,271	0,220	0,220	0,309	0,263	0,254	0,233	
G29	0,407	0,415	0,411	0,267	0,381	0,453	0,305	0,407	0,381	0,530	0,428	0,445	0,398	0,356	0,343	0,419	0,292	0,335	0,246	0,339	0,326	0,292	0,335	0,373	0,309	0,352	0,339	0,309

Figure 16 : Matrice des distances entre les 29 génotypes de prunier.

La comparaison deux-à-deux des 29 génotypes a montré que toutes les paires des génotypes sont distinctes par 38 jusqu'à 125 marqueurs, avec la plupart par plus de 60 marqueurs (figure 15) ceci montre que ces génotypes sont génétiquement très distincts. Selon les distances calculées par le coefficient Simple Matching (SM) (figure 16), on remarque que les distances varient d'un minimum de 0,16 (G17/ G18) à un maximum de 0,53 (G10/G29), avec une moyenne de 0,33. Cet intervalle de variation est important par rapport à celui de Kadir et *al.* (2009) qui ont trouvé des distances entre 0,07 et 0,73. Aussi chez 30 génotypes de prunier, Qi et *al.* (2015) ont trouvé des distances entre 0,004 et 0,445.

Cette diversité entre les génotypes de prunier étudiés se confirme par une similarité minimale de 47%, maximale de 84% et une moyenne de 67%. Des similarités proches ont été obtenues entre 30 cultivars de prunier avec un maximum de 99 % et minimum de 55 % (Qi et *al.*, 2015) et de 73% à 7% pour le travail de Kadir et *al.* (2009). Chez d'autres espèces fruitières, l'abricot par exemple, Ming et *al.* (2013), ont obtenu des similarités avec une valeur maximale de 97% et minimale de 86% et une moyenne de 92%. Les différences sont dues au type de matériel végétal caractérisé et le type et le nombre d'amorces utilisées.

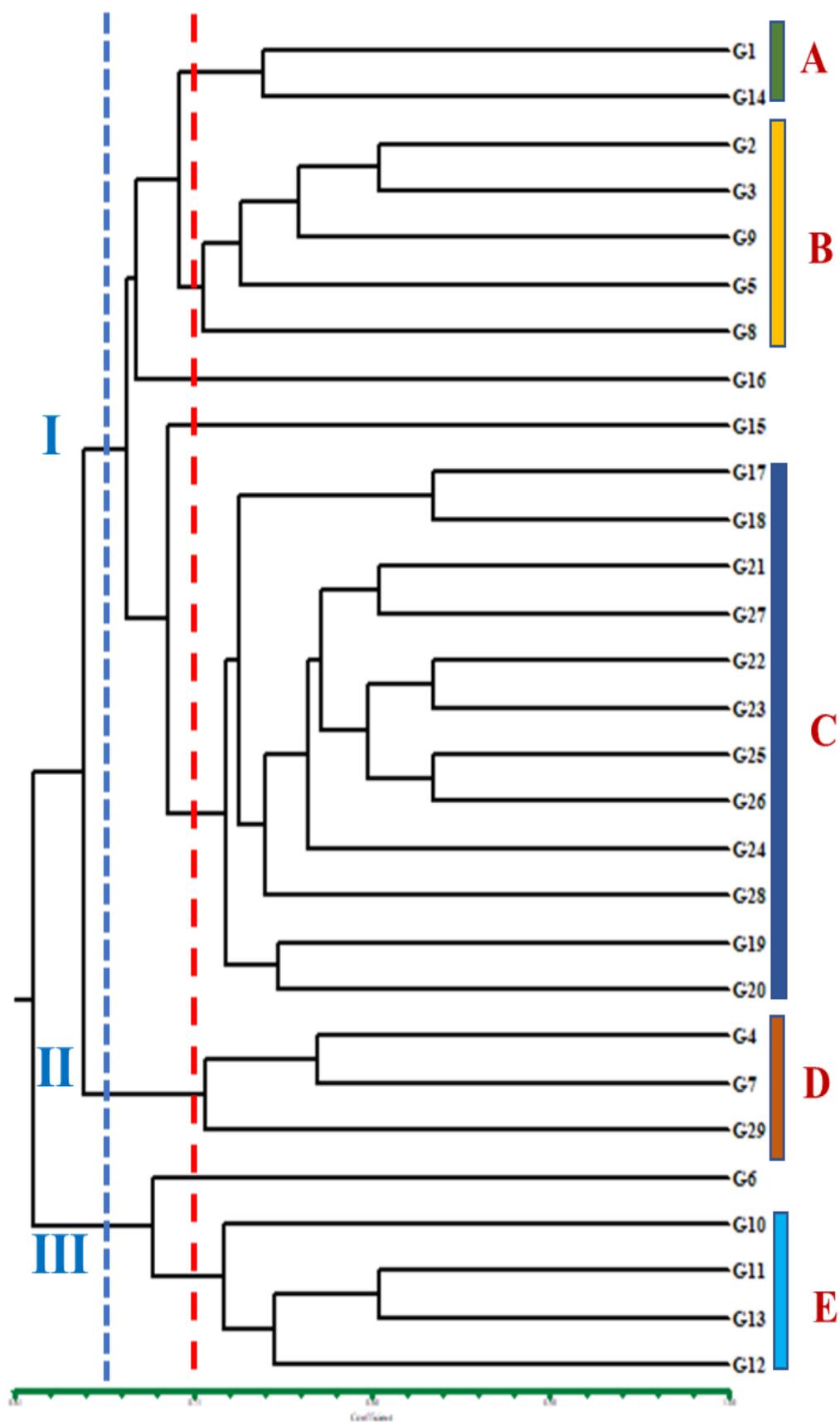


Figure 17 : Dendrogramme des génotypes étudiés du prunier engendré par les ISSR à l'aide de calcul des distances et la méthode UPGMA.

La matrice binaire obtenue à partir de la lecture des différents gels et sur la base de calcul des distances génétiques, a aboutie à la construction d'un dendrogramme (Figure 17) à l'aide du logiciel NTSYS par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). L'arbre hiérarchique illustre parfaitement les relations génétiques existantes entre les 29 génotypes de prunier et montre le grand niveau de diversité de la collection avec la présence des pools génétiques différents. Une première subdivision à un niveau de similarité de 65% permet de distinguer trois groupes principaux homogènes (I, II et II), contenant respectivement 21, 3 et 5 génotypes (Figure 17).

Cependant, en augmentant le niveau de similarité à 71%, l'arbre se distingue en cinq sous-groupes homogènes (A, B, C, D et E) qui peuvent être synonymes de pools génétiques différents (Figure 17).

Sous-groupe A : comprend deux variétés : **G1** et **G14**

Sous-groupe B : comprend (17,24%) de variétés : **G2, G3, G9, G5** et **G8**

Sous-groupe C : englobe presque la moitié des variétés (41,38%) : **G17, G18, G21, G27, G22, G23, G25, G26, G24, G28, G19** et **G20**

Sous-groupe D : comporte un mélange de trois variétés (10,35%) : **G4, G7** et **G29**

Sous-groupe E : contient un mélange de quatre variétés (13,79%) : **G10, G11, G12** et **G13**

Conclusion générale

Comme beaucoup d'espèces fruitières, la collection du prunier de l'INRA est la seule qui existe pour l'espèce au niveau du Maroc. La caractérisation moléculaire de 29 génotypes, montre clairement que les marqueurs moléculaires ISSR utilisés au cours de la présente étude, se sont avérés très efficaces en termes de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez le prunier ainsi que pour l'exploration des relations génétiques entre les génotypes. Ainsi, l'utilisation de 20 amorces a permis de déceler une grande diversité génétique au sein des génotypes étudiés. Ces marqueurs ont varié de 7 à 22 bandes avec une moyenne de 11,8 bandes par amorce. Ce nombre témoigne du niveau élevé de polymorphisme au sein des génotypes révélés par les amorces sélectionnées.

Toutes les amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec des pourcentages de polymorphisme variables et significatifs. Deux cent deux sur 236 marqueurs (85,6%) se sont avérés polymorphes et 34 (14,4%) monomorphes avec un taux de polymorphisme moyen de 82,3%. Les indices PIC des amorces confirment ce polymorphisme avec des valeurs qui varient de 0,105 jusqu'au 0,451 et avec une valeur moyenne de 0,3.

L'étude des distances génétiques et la comparaison des génotypes deux-à-deux montrent que toutes les paires de génotypes sont distinctes avec plus de 38 marqueurs avec un maximum de 125 marqueurs. La similarité minimale est de 47%, maximale de 84% et la moyenne est de 67%.

Le dendrogramme phylogénétique a permis de montrer l'existence d'une structure génétique évidente des variétés de la collection. La distinction en plusieurs groupes et sous-groupes montre la présence de pools génétiques différents.

Par ailleurs, les résultats de notre étude procurent des indices importants dans la compréhension de la relation entre les variétés de prunier testées, ce qui peut contribuer à l'élaboration et à la planification des stratégies de sélection et d'amélioration génétique. Les différents pools génétiques et la grande diversité vont constituer une base pour élargir la variabilité génétique et le profil variétal des cultures.

Au terme de ce travail nous permettons de recommander ce qui suit :

- ✓ Elargir l'étude à d'autres génotypes et variétés cultivées au Maroc.
- ✓ Utiliser des marqueurs co-dominants de type SSR ou SNP pour mieux comprendre la diversité et sa structuration génétique.
- ✓ Associer l'analyse moléculaire aux marqueurs phénotypiques pour mieux comprendre la distinction en pools génétiques et les relations génotypiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam A. F. et Dron M., 1993.** Les outils moléculaires et leur applications à l'amélioration des plantes. Dans: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire et des gènes? Ed. AURELP-UREF. John Libbey Eurotex, Paris, pp. 23-46.
- Ajal E., 2014** - Analyse moléculaire de la diversité génétique du grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc : Exploration des marqueurs AFLPs et ISSRs Thèse Doc. Génétique et Biotechnologie végétale., FST Beni mellel, Maroc, 150 p.
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley, et M.E. Sorrells., 1993.** Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36:181–186.
- Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Steinberg, F.M., 2001.** Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J. Nutr.*, 131 :2837–2842.
- Basilio Carrasco., Carole Díaz., Mario Moya., Marlene Gebauer., Rolando García-González., 2012.** Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers, 39(3):533-543.
- Benettayeb Z.E., 1993.** Biologie et écologie des arbres fruitiers. Ed. Office des publications universitaires. Ben Aknoun, Alger, 66p.
- Bornet B., F Goraguer., G Joly., M1 Branchard., 2002.** Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by ISSRs. 45(3), 481-484
- Blanchet P., 1994,** Pollinisation et fécondation L'Arboriculture fruitière, n° 473.
- Bretauudeau J. et Faure Y., 1979.** Tailles et greffes de nos arbres fruitiers. Ed. Baillière, Paris, 81p.
- Bretauudeau J. et Faure Y., 1991.** Atlas d'arboriculture fruitière. Volume 3. Paris, 66p.
- Castragna R., Gnocchi S., Perenzi M. et Heun H., 1997.** Genetic variability of the wild diploid wheat *Triticum urartu* revealed by RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 94:424-430.
- Chen L. et Yamguchi S., 2005.** RAPD markers for discriminating tea germplasm at the specific level in China. *Plant Breeding*, 124:404-409.
- Cronquist A., 1981.** An integrated system of classification of flowering plants. Ed. Columbia University Press. New York, 2 162 p.
- De vienne D., 1998.** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 195pages. ISSN : 1144-7605.

Dozier W.A., et al. 1983. Rootstock influence on growth, yield, and survival of ‘Loring’ peach trees on an old peach site. *Journal of the American society for Horticultural science* 108:250-252.

Gautier M., 1988. La culture fruitière. Vol 2. 1re édition. Tec et Doc. Paris, 452p.

Gautier M., 1993. La culture fruitière : L’arbre fruitier. Ed. Tec et Doc. Paris, 148 p.

Gautier M., 2001. La culture fruitière : Production fruitière. Vol 2. Ed. Tec et Doc. Paris ,665p.

Godwin I. D., Aitken E. A. B. and Smith L. W., 1997. Application of intersimple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 18:1524-1528

Gruning Ch. R., Sieber T. N. et Holdenrieder O., 2001. Characterization of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycol. Res.* 105:24-32.

Guirbal M & Calvet C., 1979. Manuel d’arboriculture fruitière. Ed Bailliaire. Paris, 200p.

Guyot L. et Gibassier P., 1966. Les noms des arbres. Ed. Presses Universitaires de France. Paris.127p.

Hilaire, 2002, Effets des doses croissantes d’azote sur la croissance végétative, la production, la qualité et la conservation des fruits chez le Prunier (*Prunus domestica* L., cv. Fortune) dans la région de Sefrou. Mémoire de fin d’études).

Houmanat K., Charafi J., Mazouz H., El Fechtali M., Nabloussi A., 2016. Genetic diversity analysis of safflower (*Carthamustinctorius* L.) accessions from different geographic origins using ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18 (6): 1081-1087.

Joshi SP., VS Gupta., PK Aggarwal., PK Ranjekar., DS Brar., 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by ISSR polymorphism in the genus *Oryza*, 100(8), 1311-1320

Kadir Ugurtan Yılmaz., Sezai Ercisli., Bayram Murat Asma., Yıldız Dogan., Salih Kafkas., 2009. Genetic Relatedness in *Prunus* Genus Revealed by Inter-simple Sequence Repeat Markers, 44(2):293–297.

Kahl G., 2001. The Dictionary of Gene Technology. Wiley- VCH, Weinheim.

Kantety Ramesh V., Xiaoping Zeng., Jeffrey L Bennetzen., Brent E Zehr., 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using ISSR amplification. 1 (4), 365-373

Khadari B, Bervillé A (2001) Genetic diversity of Moroccan cultivated olive using RAPD markers. *Acta Horticulture* 546: 439-442.

- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J. P., Besnard G., Bervillé A. and Dosba F., 2003.** The use of molecular marker of germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet.*, 106:521529.
- Konate I., 2007.** Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Thèse, Biotechnologie et Biologie Moléculaire, Université Mohammed V-Agdal, Faculté des Sciences, Rabat, 196p.
- Lesica P & Allendorf FW (1999)** Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration ecology* 7(1):42-50.
- Lespinasse J.M et Leterme E., 2005.** De la taille à la conduite des arbres fruitiers. Ed. Rouergue-Parc Saint Joseph. France, 104p.
- Machkour-M'Rabet S., Henaut Y., Dor A., Perez-Lachaud G., Pelissier C., Legal L., 2009.** L'étude de la diversité génétique dans tarantulas (Araneae, Mygalomorphae) à l'aide des marqueurs moléculaires ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). *Journal d'Archeologie*, pp: 10-14.
- MacRoberts N., Finch R. P., Sinclair W., Meikle A., Marshall G., Squire G. and McNicol J., 1999.** Assessing the ecological significance of molecular diversity data in natural plant populations. *J. Exp. Bot.* 50,340:1635-1645.
- MADRPM, 2011.** Contrat programme (2011-2020) entre le Gouvernement du Royaume du Maroc et la Profession des Arboriculteurs Fruitiers relatif à la mise à niveau de la filière des arbres fruitiers, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime Maroc.
- Mamouni A, Oukabli A. 2005,** Le prunier : variétés à pruneaux et de table, Transfert de Technologie en agriculture, INRA, UR Amélioration des plantes et Conservation des Ressources phyto-génétiques, CRRRA Meknès, 4p.
- Martin C, Gonzales-Benito ME & Iriondo JM (1999)** The use of genetic markers in the identification and characterization of three recently discovered populations of a threatened plant species. *Molecular ecology* 8:S31-S40.
- McCouch Susan R., Keyan Zhao., Mark Wright., Chih-Wei Tung., Kaworu Ebana Michael., 2010.** Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breed.* 60, 524–535.
- Mikolajski A. et Rooney D., 2007.** Les arbres fruitiers. Ed. Marabout. France, 191p.
- Ming Li., Zhong Zhao., Xing Jun Miao., 2013.** Genetic variability of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) populations in the Ili Valley as revealed by ISSR markers, 10.1007/s10722-013-9996-x
- Nagarju J., Kathirvel M., Kumar R. R., Siddiq E. A. et Hasnain S. E., 2002.** Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *PNAS*, 99:5836-5841.

- Nei M. et Li W.H.**, 1979. Modèle mathématique de la variation de l'étude génétique en ce qui concerne les endonucléases de restriction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5269-5273.
- Oh T. J., Gorman M. et Cullis C. A.**, 2000. RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitalissimum*). Theor. Appl. Genet., 101:590-593.
- Oukabli A**, 2006. Les porte-greffes des arbres fruitiers adaptés aux conditions. Transfert de technologie en agriculture, N° 143
- Prado E, Faivre Rampant P, Prat D (1999)** Analyse du génome des arbres forestiers - applications à la gestion des ressources génétiques. INRA, Centre d'Orléans, 122 p.
- Prevost A. and Wilkinson M. J.**, 1999. A new system of comparing of PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet., 98:107-112.
- Qi SUN., Kang Liao., Wenjuan Geng., Juan Liu., Mansur Nasir., Huan Liu., Yang Jia., Qian Cao.**, 2015. Analysis of Genetic Relationship in *Prunus domestica* L. in Xinjiang Using ISSR Markers, 16(3):447-453,503
- Rieger M.**, 2010. Plum-*Prunus domestica*, *Prunus salicina*. Retrived on June 12, 2013. Http: http://www.fruit-crops.com/plum-prunus-domestica-prunus-salicina/ripening_of_melon. Postharvest Biol Technol. 1: 143-151.
- Stand, L.**, 1999. Integrated Pest Management for Stone Fruits. Chapter 1.
- Qian W., Ge S. et Hong D-Y.**, 2001. Genetic variation within and among population of a wild rice *Oriza granulata* from China detected RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet., 102:440-449.
- Rohlf F.J.**, 2000. Taxonomie Numérique NTSYS-PC. Système d'analyse multivariée. Version 2.1. EXETER software. Setauket, New York.
- Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado E., Prat D.**, 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. INRA, Station de génétique et d'amélioration des plantes, Centre INRA de Montpellier, 2, place Viala, 34060 Montpellier cedex 01, France, 9 :311-327.
- SAGHAI-MAROOF M. A., SOLIMAN K. M., JORGENSEN R. A. et ALLARD R. W.** 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS, 81, 8014-8018.
- Sica M., Graziella G., Montieri S., Gaudio L. and Aceto S.**, 2005. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. Genetics, 6:1-7.
- Talhinhas P., J Neves-Martins., J Leitao.**, 2003. AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus spp.* 122(6), 507-510.

Thormann C. E., Ferreira M. E., Camargo L. E. A., Tivang J. G. et Osborn T. C., 1994. Comparaison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.*, 88:973-980.

Walali L. D., et Skiredj A., 2003. Fiches techniques L'abricotier, le prunier, le poirier et le pommier, Transfert de technologie en agriculture, N° 107, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat.

Weifeng Wu., Faxing Chen., Kaiwun Yeh., Jianjun Chen., 2018. ISSR Analysis of Genetic Diversity and Structure of Plum Varieties Cultivated in Southern China,

Weisheng Liu., Dongcheng Liu and Aimin Zhang., Chenjing Feng and Jianmin Yang., Jaeho Yoon., Shaohua Li., 2007. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships among Plum Germplasm Resources in China Assessed with Inter-simple Sequence Repeat Markers *132(5):619–628.*

Wiesner I. et Wiesnerová D., 2003. Effect of resolving medium and staining procedure on inter-simplesequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm. *Genet. Res. Crop Evol.* 50:849-853.

Wolfe A. D. et Culley T. M., 2000. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86:545-556.

Yang W., De Olivera A. C., Godwin I., Schertz K. and Bennetzen J. L., 1996. Comparison of DANN marker technologies in characterization plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36:1669-1676

Zietkiewicz E., Rafalski A. et Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics.*, 20:176-183.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

BRZUSTOWSKI J.,2002. Clustering calculator.

<http://www.biology.ualberta.ca/jbrzusto/cluster.php>

FAO, 2013. Maroc – Statistiques Agriculture. Extrait de <http://fr.actualitix.com/pays/mar/statistiques-agriculture-maroc.php>

FAO (FAOSTAT), Bases de données statistiques de la FAO 2019. Extrait de www.faostat.fao.org

ANNEXES

- **Annexe 1** : Préparation de Tris (1M) pH=8
- **Annexe 2** : Préparation d'EDTA (0.5M) pH=8
- **Annexe 3** : Préparation du tampon d'extraction (100mL)
- **Annexe 4** : Solution de Chloroforme/ alcool Iso-amylque
- **Annexe 5** : Solution d'Ethanol (70%)
- **Annexe 6** : Tampon de migration TBE×5
- **Annexe 7** : Tampon de migration TBE×1
- **Annexe 8** : Gel d'agarose
- **Annexe 9** : Préparation du bleu d'agarose
- **Annexe 10** : Marqueur de taille utilisé pour la lecture des gels d'Agarose :
HyperLadder 1Kb

Annexe 1 : Préparation de Tris (1M) pH=8

1 M Tris-HCL (pH=8)	Pour 200 ml
Tris base	24,228 g
Eau distillée	QSP 200 ml

Annexe 2 : Préparation d'EDTA (0.5M) pH=8

0.5 M EDTA (pH=8)	Pour 100 mL
EDTA	18.6g
Eau distillée	QSP 100 mL

Annexe 3 : Préparation du tampon d'extraction (100mL)

Tampon d'extraction	100mL
Tris (1M) Ph = 8	10 ml
EDTA (0.5M) pH=8	4 mL
NaCl (Sodium chloride)	8.2 g
CTAB (Hexadecyltrimethyl-Amonium Bromide)	2 g
PEG 40000 (Polyéthylène Glycol)	0.5 g
Na-Bisulfate (Sodium di-sulfite)*	0.1 g
B-mercaptoethanol (solution toxique)*	100 µl
H2O distillée	86 ml

*à ajouter au dernier moment

Annexe 4 : Solution de Chloroforme/ alcool Iso-amylque

Chloroforme/ alcool iso-amylque	Pour 100mL
Chloroforme	96 mL
alcool iso-amylque ou 3- Méthyl-butanol	4 mL

Annexe 5 : Solution d'Ethanol (70%)

Ethanol 70%	Pour 100 mL
Ethanol absolu ou Ethanol anhydrous denatured	70 mL
Eau distillée	30mL

Annexe 6 : Tampon de migration TBE×5

TBE 5×	2000 mL
Acide borique	55 g
Tris base (Sigma)	108 g
EDTA base	7.04 g
Eau distillée	QSP 2 L

Ajuster le pH avec l'acide borique jusqu'à pH 8

Annexe 7 : Tampon de migration TBE×1

TBE 1×	Pour 2000mL
TBE 5×	400mL
Eau ultra-pure	1600mL

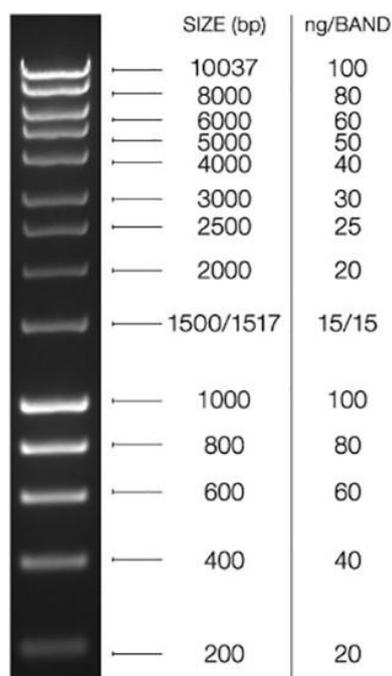
Annexe 8 : Gel d'agarose

Solution d'agarose	1%	1.5%	2%
Agarose poudre (g)	1g	3g	6g
TBE 1× (mL)	100ml	200ml	300ml

Annexe 9 : Préparation du bleu d'agarose

Bleu d'agarose	Pour 10 mL
1 M Tris- HCl (pH 8)	0.5 mL
0.5 M EDTA (pH 8)	0.1 mL
50% Glycérol	5 mL
Bleu de bromophénol	20 mg

Annexe 10 : Marqueur de taille utilisé pour la lecture des gels d'Agarose : HyperLadder 1Kb



- ✓ Large gamme de tailles – 14 bandes uniformément réparties de 200 pb à 10 kb
- ✓ Facile à orienter – plusieurs bandes de référence plus lumineuses
- ✓ Stable – peut être conservé à température ambiante jusqu'à 6 mois