

## LISTE DES ABREVIATIONS

AFC :	Analyse Factorielle par Correspondance
AFLP :	Amplified Fragment Length Polymorphism
CBNMP :	Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles
CTAB :	CetylTrimethyl Ammonium Bromide
ddl :	Degrés De Liberté
DH <sub>2</sub> O :	Distillée H <sub>2</sub> O
DNTP :	DésoxyriboNucleotide Tri Phosphate
EDTA :	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ENAM :	Ecole Nationale d'agriculture de Meknès
FAO :	Food and Agriculture Organization
H <sub>0</sub> :	Hétérozygotie observée
H <sub>e</sub> :	Hétérozygotie attendue
INRA :	Institut National de Recherche Agronomique
ISSR :	Inter Simple Sequence Repeat
L :	Linné
PB :	Paire de Bases
PCR :	Réaction en Chaîne par Polymérisation
PVP :	PolyVinylPyrrolidone
RAPD :	Polymorphisme de l'ADN amplifié par hasard
RFLP :	Restriction Fragment Length polymorphisme
rpm :	Rotation Par Minute
SSR :	Microsatellites ou Séquences Simples Répétées
Taq :	Thermusaquaticus
TBE :	Tris acide Borique Edta

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
Figure 1	5
Figure 2	6
Figure 3	7
Figure 4	7
Figure 5	9
Figure 6	9
Figure 7	11
Figure 8	11
Figure 9	11
Figure 10	25
Figure 11a	25
Figure 11b	
Figure 12	25
Figure 13a	27
Figure 13b	
Figure 14	28
Figure 15	30
Figure 16	32
Figure 17	33
Figure 18	34
Figure 19	34
Figure 20	36
Figure 21	36
Figure 22	39
Figure 23	40

## LISTE DES TABLEAUX

	<b>Page</b>
Tableau 1 : Liste des clones marocains de <i>Ficus carica</i> et des clones étrangers expérimentés à AïnTaoujdate (INRA 2002)	19
Tableau 2 : Liste des variétés étudiées et leurs lieux de récolte	24
Tableau 3 : Séquences et températures d'hybridation spécifiques des microsattellites utilisés	28
Tableau 4 : Croisement réalisé et descendance obtenue.	30
Tableau 5 : Séquences et températures d'hybridation spécifiques des locus ISSR utilisés	31
Tableau 6 : Résultats d'amplification de l'amorce MFC 3	33
Tableau 7 : Nombre de descendants, ségrégation d'allèles et le test de destruction de ségrégation de sept amorces utilisées pour réduire la taille de la population	38
Tableau 8 : Polymorphisme d'ADN engendré par les ISSR	37

# SOMMAIRE

	Page
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	1
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. SYSTEMATIQUE ET CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU FIGUIER</b>	3
1. ORIGINE DU FIGUIER	3
2. SYSTEMATIQUE ET CLASSIFICATION DU FIGUIER	3
3. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU FIGUIER	3
4. CARACTERISTIQUES DE FECONDATION DU FIGUIER	6
4.1. Mode de pollinisation	6
4.2. Biologie de la pollinisation	6
4.3. Cycle mutualiste Blastophaga psenes / figuier	8
<b>II. DONNEES GENERALES SUR LE SECTEUR FIGUICOLE</b>	8
1- PRODUCTION MONDIALE	8
2- SUPERFICIE DU FIGUIER AU MAROC	9
3- PRODUCTION DU FIGUIER A L'ECHELLE NATIONALE	10
<b>III. CONDUITE TECHNIQUE DU FIGUIER</b>	10
1. EXIGENCES EDAPHO-CLIMATIQUES DU FIGUIER	10
1.1. Sol	10
1.2. Eau	10
1.3. Climat	10
2. CREATION DE FIGUERAIE	12
2.1. Choix variétal	12
2.2. Densité et époque de plantation	12
2.3. Entretien de la culture	12
2.4. Irrigation	13
2.5. Travail du sol	13
2.6. Caprification	13
2.7. Fertilisation	13
2.8. Maladies et ravageurs	14
<b>IV. OBJECTIF DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE EN GENETIQUE ET AMELIORATION CHEZ LES PLANTES</b>	14
1. OUTILS DE BASE	14
2. POLYMORPHISME DES LONGUEURS DE FRAGMENTS DE RESTRICTION (RFLP)	15
2.1. Enzymes de restriction	15
2.2. Polymorphisme de l'ADN	15
2.3. Réaction en Chaîne par Polymérisation(PCR)	15
2.4. Principe du Polymorphisme des Longueurs de Fragments de Restriction(RFLP)	16
3. POLYMORPHISME DE L'ADN PAR AMPLIFICATION ALEATOIRE (RAPD)	16
4. POLYMORPHISME DE LONGUEUR DES FRAGMENTS D'AMPLIFICATION (AFLP)	16
4.1. Séquence à Répétition Inter Simple (ISSR)	17
4.2. Microsatellites	17
<b>V. DIVERSITE VARIETALE</b>	18
1- PROBLEMATIQUE DE LA DISCRIMINATION VARIETALE	18
2- HOMONYMIES ET SYNONYMIES VARIETALES CHEZ LE FIGUIER	20

	Page
<b>VI. APPLICATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE AU FIGUIER</b>	21
1. ETUDE DE VARIABILITE GENETIQUE PAR RAPD	21
2. ETUDE DE VARIABILITE GENETIQUE PAR ISSR	22
3. ETUDE DE VARIABILITE GENETIQUE PAR SSR	22
4. EFFICACITE DES TROIS MARQUEURS MOLECULAIRES	22
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>I. DIVERSITE GENETIQUE INTRASPECIFIQUE DE DIVERSES VARIETES</b>	23
1. MATERIEL VEGETAL	23
2. EXTRACTION DE L'ADN	24
1.1. Principales étapes de l'extraction de l'ADN	24
1.2. Rôle des réactifs	26
3. QUANTIFICATION D'ADN PAR SPECTROPHOTOMETRIE	26
4. TEST DE QUALITE D'ADN SUR GEL D'AGAROSE	27
5. DILUTION DES ECHANTILLONS	27
6. CONDITIONS D'APPLICATION DE LA PCR	27
6.1. Conditions de la PCR pour les locus microsatellites	28
6.2. Marqueurs moléculaires utilisés : Microsatellites	28
7. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	29
8. ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE	29
9. ANALYSE DES DONNEES	30
<b>II. AUTHENTICITE D'UNE DESCENDANCE DE PLANTS DE FIGUIER</b>	30
1. MATERIEL VEGETAL	30
2. MARQUEURS MOLECULAIRES ISSR UTILISES	31
3. ANALYSE DES DONNEES	31
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>I. DIVERSITE GENETIQUE INTRASPECIFIQUE DE DIVERSES VARIETES</b>	32
1. TEST DE QUALITE DE L'ADN	32
2. CARACTERISATION MOLECULAIRE PAR LES MICROSATELLITES	32
2.1. Amplification par l'amorce MFC <sub>3</sub>	32
2.2. Amplification par l'amorce TO <sub>6A12</sub>	34
2.3. Amplification par l'amorce MFC <sub>11</sub>	34
<b>II. AUTHENTICITE D'UNE DESCENDANCE DE PLANTS DE FIGUIER</b>	35
1. TEST DE QUALITE DE L'ADN	35
2. AMPLIFICATION DES AMORCES ISSR	35
3. TEST DU $\chi^2$	37
4. TAUX DE POLYMORPHISME ET FREQUENCES ALLELIQUES	37
5. HISTOGRAMME DES DISTANCES	39
6. DENDROGRAMME UPGMA	40
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	
	41
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
	43
<b>ANNEXES</b>	

L'arboriculture fruitière fait partie intégrante de la vie économique et sociale du Maroc. Ce grand pays, de part sa position géographique et ses diverses conditions pédoclimatiques, a le privilège de mettre en culture plusieurs espèces fruitières et de produire des fruits frais tout au long de l'année.

Le figuier est un arbre fruitier très répandu au Maroc ; la production des figues est concentrée essentiellement dans les provinces du Nord où le figuier, en culture exclusif, représente environ 4% de la superficie arboricole. Cette culture est souvent associée à des cultures intercalaires annuelles destinées à satisfaire les besoins vivriers mais également à l'olivier en tant que culture pérenne (Oukabli, 2012).

Au Nord du Maroc, la culture du figuier est très ancienne, de nature traditionnelle et exploitée dans un cadre vivrier.

L'extension de la culture du figuier est confrontée aux problèmes de disponibilités de plants authentiques de variétés sélectionnées pour leurs performances.

La diversité des conditions climatiques, les limites étroites entre le sauvage et le cultivé et la domestication locale ont permis au figuier d'acquérir une richesse génétique. Plusieurs travaux de prospection, de caractérisation et de conservation des ressources génétiques du figuier ont été effectués. Ces travaux viennent en appui aux programmes de recherche du développement.

Le figuier produit des fruits comestibles à l'état frais ou destinés au séchage. L'industrie accorde une importance à ce fruit pour ses diverses utilisations (confiture, patte de figue, sirop...). Il est aussi utilisé pour la fabrication d'une eau de vie. Les feuilles de figuier sont utilisées comme aliment de bétail.

La figue est un fruit très anciennement connu dans le monde. Cité dans la "Sourate Attine" du Coran, il est probablement originaire du Moyen Orient et naturalisé dans plusieurs régions et surtout celles du pourtour du bassin méditerranéen.

Ce dernier fournit l'essentiel de la production mondiale, estimée à un million de tonnes, dont 27% est produite par la Turquie.

La figue est un fruit chargé de symboles et les significations sont diverses associant des conseils de gastronomie, de rareté, de sagesse, de fertilité sexuelle et bien d'autres.

Comme dans les autres pays de la Méditerranée, le figuier est aussi très ancien au Maroc. Les villageois de certaines zones de production (Taounate, Chaouen, Ouezzane) affirment que sa culture est très ancienne et que le fruit séché s'échangeait avec les céréales, en provenance du Gharb. Sa culture, qui couvrait jadis plusieurs terrains plats, reste actuellement inféodée aux collines, aux terrains en pente et aux abords des habitations.

Cet arbre méditerranéen a été oublié et classé comme une espèce à importance secondaire, malgré le rôle qu'il peut jouer dans la mise en valeur de nombreuses régions. Surtout avec les sécheresses et la réduction dans les disponibilités en froid nécessaires à la fructification de certaines espèces fruitières intensives comme le pommier, le pêcher, le poirier et d'autres.

Dans le cadre de développer le figuier et de sélectionner des variétés performantes, l'INRA, en matière de recherche-développement, a mené des actions de prospection et de collecte des ressources génétiques locales, d'élargissement des collections variétales, desélection du matériel végétal performant et de discrimination variétale.

À cause des nombreux cas de synonymies et d'homonymies, la culture du figuier s'est toujours accompagnée d'une connaissance plus ou moins imprécise de variétés. De ce fait, une vérification de l'authenticité des arbres s'impose à l'aide des marqueurs moléculaires et sur la base d'une comparaison avec les variétés de mêmes dénominations qui sont en collection dans le domaine expérimental d'AïnTaoujdate (INRA) (Charafi, 2012).

Dans cette optique, les marqueurs de type "empreintes génétiques" ou "fingerprint" tels que les RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et les ISSR (Inter Simple Sequence Repeats),... sont les plus adaptés à l'identification variétale. Toutefois, l'utilisation de ces techniques se heurte aux problèmes liés à la reproductibilité des résultats. De plus, les marqueurs révélés sont dominants et de ce fait, ne permettent pas de distinguer l'individu hétérozygote (Aa) de l'individu homozygote (AA ou aa). En revanche, les marqueurs comme les RFLP (Random Fragment Length Polymorphism), les microsatellites, ..., sont codominants et la reproductibilité des résultats est aisément vérifiable car ils sont spécifiques du locus.

L'utilisation conjointe de marqueurs des deux types permet, en remédiant aux inconvénients des uns et des autres, d'avoir une identification variétale efficace et une base de données de génotypes de référence fiable (Khadari et al., 2002).

Notre étude s'inscrit dans le cadre de la vérification d'authenticité de plusieurs descendants afin de vérifier leurs appartenance au croisement étudié ; ainsi que l'étude de la discrimination variétale de quatre variétés différentes à savoir : Naboute, El Quoti, Ghoudane et Massari, afin de résoudre le problème de confusion variétale.

Notre mémoire est scindée en trois parties. Après l'introduction générale, nous présentons une synthèse bibliographique sur le figuier et les différentes études réalisées en sa faveur dans le domaine moléculaire. La deuxième partie consiste en la description du travail effectué au sein du laboratoire de Biotechnologie de l'Unité de Recherches Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-génétiques du Centre Régional de Meknès. La troisième partie présente les différents résultats obtenus et leurs possibles discussions, qui seront suivis par une conclusion générale.

# I. SYSTEMATIQUE ET CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU FIGUIER

## 1. ORIGINE DU FIGUIER

Le figuier, *Ficus carica* L., est une culture ancienne liée aux traditions populaires des différents pays bordant la Méditerranée. Cependant, lorsqu'on recherche l'origine géographique de l'espèce, on rencontre quatre grandes hypothèses bien différentes. On retiendra celle qui considère le figuier comme une plante indigène du pourtour méditerranéen (Vidaud, 1997).

## 2. SYSTEMATIQUE ET CLASSIFICATION DU FIGUIER

*Ficus carica* L. (Bailey et Bailey, 1976) est une espèce fruitière méditerranéenne appartenant à la famille des *Moraceae*, qui comprend un grand nombre d'espèces (environ 1500), regroupées en 52 genres, dont le genre *Ficus* qui, à lui seul, comprend environ 700 espèces (Weibes, 1979). L'essentiel des espèces se trouve localisé principalement dans les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères, mais aussi en zones tempérées comme l'Europe ou le Japon.

La grande diversité des formes biologiques qui existent dans ce genre (figuiers étrangleurs, lianes héli-épiphytes, arbres) et les particularités de son mode de reproduction en ont fait un centre d'intérêt remarquable pour la biologie évolutive. *Ficus carica* L. ou arbre de Carique, par allusion à une zone de l'Ouest de la Turquie (vallée de Méandre), compte plus de 700 variétés (Vidaud, 1997).

## 3. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU FIGUIER

- **Latex** : C'est un liquide blanc ressemblant au lait caractérisant certaines familles de plantes ligneuses et herbacées. Chez le figuier, ce lait recèle des enzymes protéolytiques et provoque des démangeaisons ou dermatoses aux mains non gantées (Rivales, 1979).
- **Racines** : L'activité racinaire est un des points forts dans l'écologie du figuier. Outre son grand développement rappelant sa parenté avec les figuiers tropicaux, qui ont des racines aériennes et parfois étranglantes, la densité extraordinaire du chevelu racinaire lui permet une exploitation optimale de l'eau disponible dans le sol, ce qui explique sa pertinence dans des situations apparemment très sèches (Vidaud, 1997).
- **Tige et feuille** : La tige issue du figuier montre des feuilles entières, de taille croissante présentant un limbe profondément marqué. La nervation de la feuille

associée à ce limbe découpé est de type palmatinervée, signifiant que toutes les nervures principales partent d'un même point à la jonction du limbe et du pétiole (Vidaud, 1997).

La ramification est peu exprimée, mais très fréquemment, on peut observer, au niveau des toutes premières feuilles, la mise en place de nouvelles tiges. La tige présente une moelle creuse, particularité qui lui donne une certaine souplesse à la traction mais qui la rend soudainement cassante (Bouche, 1999).

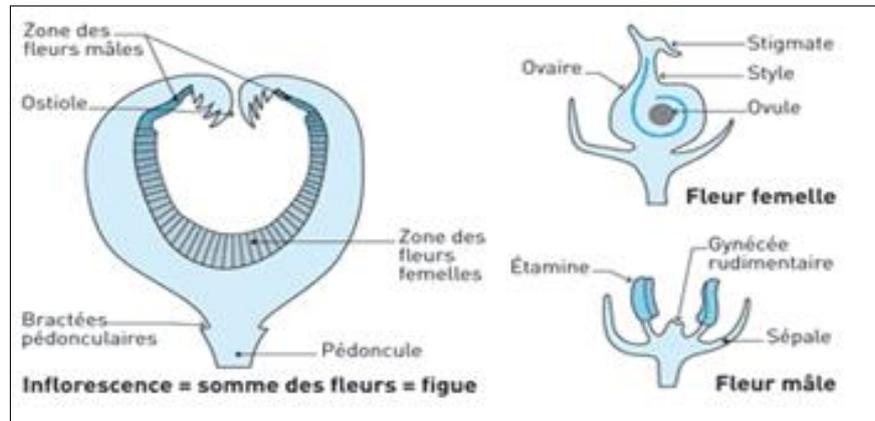
- **Bourgeon** : L'extrémité de toute tige présente un bourgeon terminal contenant tous les éléments de la future tige, ainsi que le méristème terminal qui assure la fabrication des nouvelles parties de la plante.  
À l'aisselle de chaque feuille, ou de la cicatrice qu'elle laisse après sa chute, existe un bourgeon qualifié de latéral ou auxiliaire. Un examen plus minutieux montre l'existence en fait de deux bourgeons, l'un est pointu et à destination végétative appelé "Œil à bois", l'autre est arrondi et à destination florale. Parfois, deux bourgeons arrondis sont présents de part et d'autre du bourgeon végétatif (Vidaud, 1997).
- **Ramification** : Au cours du temps, la croissance du figuier se traduit par la construction d'un tronc portant chaque année des branches à port dressé. Ces branches, elles même, portent des rameaux en petit nombre qui sont généralement peu ou pas ramifiées (Vidaud, 1997). Tous les rameaux de l'arbre peuvent porter des figes, mais l'importance des fruits par rameau dépend de l'âge du rameau et de la variété (Rivales, 1979).
- **Ecorce** : Au fur et à mesure de sa croissance, la plante revêt une texture spécifique, une écorce gris clair conservant longtemps les traces d'insertion des feuilles et la cicatrice annulaire caractéristique laissée par les stipules. Cette écorce se manifeste sur les parties âgées de deux à trois ans. Les parties plus jeunes passant d'un épiderme vert tendre à un brun vernissé, ornementé de nombreuses lenticelles de grande taille (Vidaud, 1997).
- **Inflorescence** : La figue ou la sycone est un ensemble de fleurs (Figure 1) regroupées dans une même structure dite inflorescence. La particularité de cette dernière réside dans le fait que les fleurs ne sont pas visibles de l'extérieur, elles sont enfermées dans une sorte d'urne et présentent un orifice appelé ostiole qui s'ouvre à l'opposé du court pédoncule portant la figue.  
À la base de cette figue se trouve deux écailles, ou bractées, qui la protègent quand elle n'est qu'un bouton. Ces écailles sont en fait les pré-feuilles de l'axe de l'inflorescence initiale. L'intérieur de la figue est tapissé d'une multitude de petites fleurs, tandis que la partie proche de l'ostiole présente de nombreuses petites écailles ou bractée ostiolaires. Parfois, selon les variétés, de petites écailles s'observent aussi à la surface de la figue.



Les fleurs, rencontrées dans la figue, peuvent être de deux types mâles ou femelles. Selon leur distribution, l'individu qui les porte sera qualifié de mâle ou de femelle.

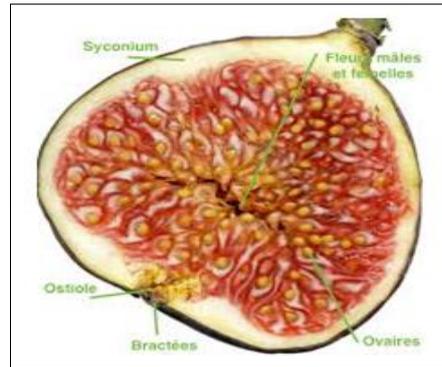
Chez les individus femelles, la figue est constituée uniquement de fleurs femelles.

Chez l'individu mâle, la figue contient à la fois des fleurs femelles et des fleurs mâles. Ces dernières étant peu nombreuses et situées tout autour de l'ostiole (Vidaud, 1997).



**Figure 1 : Organes floraux du figuier.**

- **Fleur mâle :** Elle est constituée de quatre à cinq étamines au centre desquelles se trouve un gynécée avorté. C'est donc une fleur, morphologiquement, hermaphrodite dont la fonction femelle n'est pas assurée.  
Ce type de fleur existe aussi bien chez l'arbre mâle que femelle, mais avec la différence que chez ce dernier, les étamines ne portent jamais d'anthères, les rendant ainsi fonctionnellement stériles.
- **Fleur femelle :** Elle est formée d'un périanthe de cinq pièces entourant un ovaire à ovule unique surmonté d'un style unique se terminant par un stigmate.  
Ce type de fleur existe aussi chez les arbres mâles et femelles avec une différence cette fois-ci de la longueur du style. Chez les individus femelles, le style est long (fleur longistylée) pendant qu'il est court chez les individus mâles (fleur brévistylée). Cette différence constitue une adaptation pour rendre le dépôt des œufs dans l'ovule, possible ou non selon la longueur du style (Mamouni, 2002).
- **Fruit :** C'est un faux fruit appelé sycone ou réceptacle charnu dans lequel les véritables fruits (les graines qui proviennent du développement de l'ovaire) n'adhèrent pas entre eux. Le sycone communique avec l'extérieur *via* l'ostiole fermé par des cellules ou écailles ostiolaires qui sont légèrement repliés vers l'intérieur (Tayou, 1985).



**Figure 2 : Coupe longitudinale du fruit du figuier.**

## **4. CARACTERISTIQUES DE FECONDATION DU FIGUIER**

### **4.1. Mode de pollinisation**

Le figuier est un arbre de forte capacité de régénération végétative et de forte productivité. Il produit les fruits sans production de fleurs visibles. Sa production est de deux types : figes de première récolte ou figes fleurs (El-bacor) et figes de seconde récolte ou figes d'automne (Karmouce).

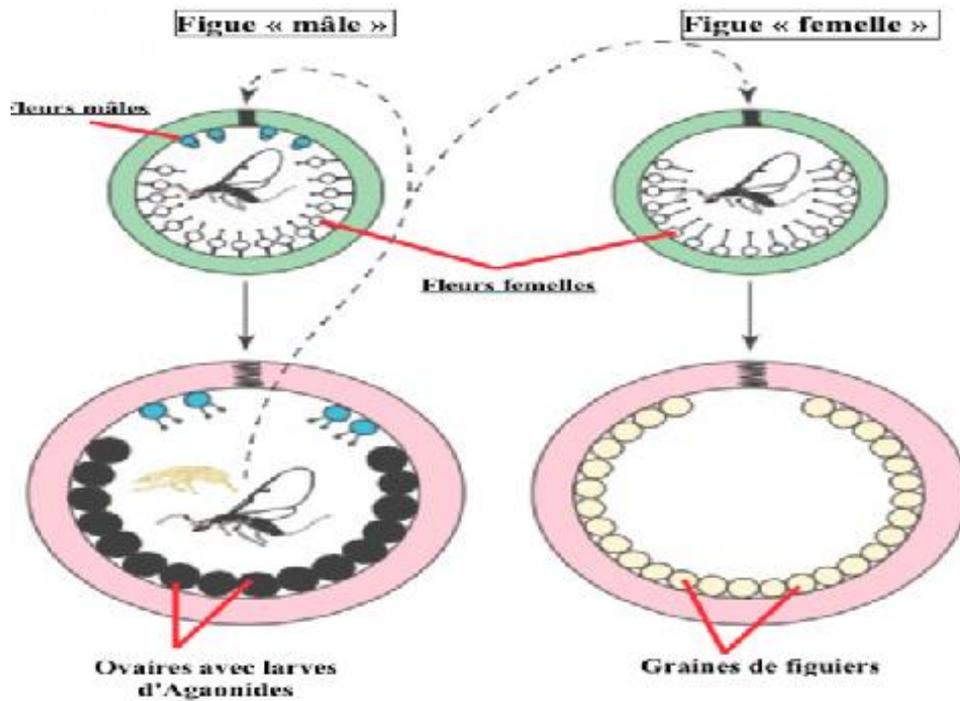
Les figes fleurs sont formées sur les rameaux défeuillés de l'année précédente. Elles passent l'hiver au stade 'grain de poivre' pour reprendre leur développement au printemps. L'évolution des figes fleurs ne nécessite pas de pollinisation et se fait d'une manière parthéno-carpique. Les figes d'automne sont formées à l'aisselle des feuilles des rameaux en croissance. Certaines espèces ne produisent que les figes d'automne et sont appelées 'Unifères'. D'autres donnent en plus une production de figes fleurs et sont de type 'Bifère' (Oukabli, 2003).

Il existe deux types d'arbres chez le figuier : un arbre mâle qui comporte des organes femelle avortés et un arbre femelle avec des organes mâles stériles. Donc aucune possibilité d'autofécondation, il est impératif qu'un insecte intervienne à la pollinisation comme le montre la Figure 3.

### **4.2. Biologie de pollinisation**

Le blastophage (*Blastophaga psenses*) est un hyménoptère de petite taille (2 mm), dont la reproduction se fait exclusivement à l'intérieur de la figue du caprifiguiier. Après le dépôt des œufs dans la fleur mâle, grâce à son ovipositeur, la larve se développe au détriment de la fleur en creusant une galle. Après deux mois environ, l'insecte arrive au stade adulte. Le mâle aptère (Figure 3A) sort le premier et cherche activement la femelle (Figure 3B) dans d'autres fleurs de la même figue.

Après l'accouplement, le mâle déchire la paroi de la galle et les bractées de l'ostiole pour permettre à la femelle d'effectuer son envol. Celle-ci, chargée de pollen et fécondée, quitte la fleur à partir de l'insertion du style et part à la recherche d'une figue réceptive pour déposer ses œufs. Cet objectif n'est atteint qu'après avoir trouvé un caprifiguiier.



**Figure 3 : Mode de pollinisation chez le figuier**

Chez l'arbre femelle, l'insecte étant incapable de déposer ses œufs (style plus long que l'ovipositeur), aura accompli la fonction de pollinisation. Les premiers envols assurent la pollinisation des figes comestibles pendant que les derniers assurent le dépôt des œufs dans les caprifiguiers assurant ainsi la reproduction de l'insecte (Vidaud, 1997).



**Figure 4: Femelle (A) et mâle (B) de *Blastohaga psenes*.**

### 4.3. Cycle mutualiste *Blastophaga psenes* / figuier

Chez le caprifiugier, les fruits retardés, appelés "mammes", naissent en été (Juillet/Août), passent l'hiver sur l'arbre (visible au cours de la dormance de l'arbre) et terminent leur développement au printemps suivant (Avril-Mai). Les "profichis", apparaissent à l'aisselle des feuilles sur le nouveau bois de l'année et finissent leur développement vers le mois de Juin de la même année (Oukabli et *al.*, 2008).

Le *Blastophage* hiverne dans les figues retardées du caprifiugier "mammes" à l'état larvaire. Ces larves reprennent leur différenciation pour éclore vers le printemps (Mai). En quittant les mammes, les femelles vont déposer leurs œufs dans des caprifigues nouvellement formées (Profichis). Ces dernières sont les seules réceptives en ce moment (Messaoudi, 2014). Ainsi, le renouvellement de cette génération d'insectes se fait à l'intérieur de l'arbre mâle. À partir de ces œufs, des insectes femelles émergent à l'âge adulte (en Juin) pour aller polliniser les figues d'automne (les envols précoces) ou déposer de nouveaux œufs dans les mammes (les envols plus tardifs) (Oukabli et *al.*, 2008).

## II. DONNEES GENERALES SUR LE SECTEUR FIGUICOLE

### 1- PRODUCTION MONDIALE

La superficie mondiale cultivée par le figuier est estimée de 449259 ha, soit une production totale qui dépasse un million de tonne de figues fraîches, dont plus de 90 % proviennent du bassin méditerranéen (Figure 4). La Turquie en tête produit près de 274 535 t, soit environ 25 % de la récolte mondiale. L'Egypte occupe le 2<sup>ème</sup> rang avec une production de 171 062 t, suivie de l'Algérie, et du Maroc. Ces deux derniers pays du Maghreb produisent en total environ 212 752 t, les classant au cinquième rang de la production mondiale.

Grâce aux diffusions plus récentes faites à la suite des colonisations et aux échanges mondiaux du matériel végétal, la culture du figuier s'est adaptée aux conditions des régions d'introduction. En effet, la production s'est parfaitement acclimatée à la nouvelle situation, voire plus favorables tant en Amérique du Nord (Californie notamment) qu'en Amérique du Sud (Brésil, Argentine), qu'à l'Australie, dans des situations climatiques identiques.

Les courbes représentant la production des figues sèches durant les dix dernières années (Figure 5) au Maroc et en Algérie ont la même allure d'évolution.

## 2- SUPERFICIE DU FIGUIER AU MAROC

Au cours des dix dernières années, la superficie du figuier a connue des fluctuations qui oscillent entre 40 000 et 50 000 ha (Figure 6). Ces fluctuations ont tendance dernièrement à se stabiliser aux environs de 50 000 ha. Jusqu'à 2012, la superficie cultivée par le figuier est de l'ordre de 52 606 ha (FAOSTAT, 2013).

En comparaison avec d'autres cultures en arboriculture, à savoir les agrumes, les rosacées, la vigne et l'olivier, le figuier demeure une espèce fruitière marginalisée dans un cadre économique largement vivrier avec un niveau de rentabilité très bas, par conséquent, les agriculteurs sont démotivés pour sa culture.

La superficie en Bour est dominante. Elle occupe presque 90 % de la superficie totale du figuier au niveau national (MAPM, 2013). Les plantations sont surtout concentrées au niveau des zones montagneuses du Rif (Figure 7), notamment dans les régions de Taza-Al-Hoceima-Taounate avec une superficie de 28 308 ha (59 % de la superficie totale en Bour). Suivi de la région de Tanger-Tétouan, dont la superficie est estimée en 13 645 ha (29%). La région de Doukkala-Aabda occupe le 3<sup>ème</sup> rang avec une superficie de l'ordre de 3 019 ha (6%). Le reste de la superficie est réparti sur les autres régions agricoles du Maroc.

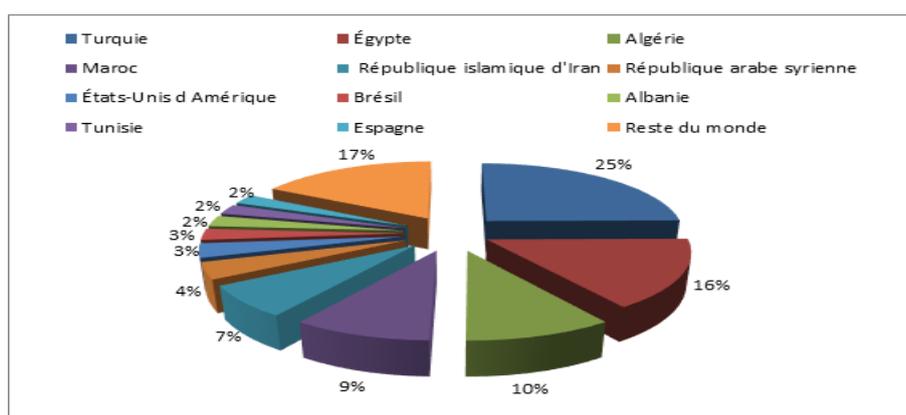


Figure 5 : Pays producteurs des figes et leurs parts dans le marché mondial

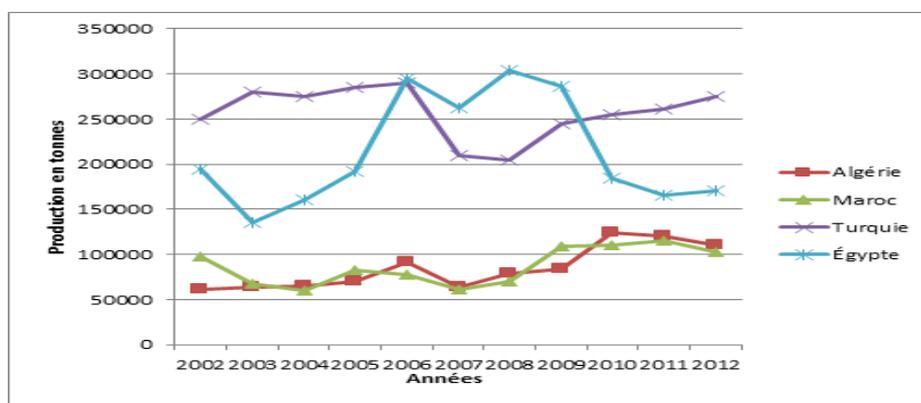


Figure 6 : Evolution de la production de figes dans les principaux pays producteurs du monde (2002/2012)

### 3- PRODUCTION DU FIGUIER A L'ECHELLE NATIONALE

D'après la Figure 8, on constate que la production des figes au Maroc, dépasse les 100 000 t/an en 2009 et atteint 101 989 t en 2012 (MAPM, 2103). Il est à noter également que cette production a connue des fluctuations interannuelles importantes entre 2002 et 2009, pouvant être expliquées par un certain nombre de facteurs à savoir :

- Les conditions climatiques, en particulier la pluviométrie (grande variabilité intra et inter annuelles et changements climatiques), ce qui influence directement les zones Bour où la quasi-totalité des superficies sont concentrées ;
- L'absence de figueraies modernes et régulières ;
- Le manque d'organisations professionnelles par rapport aux autres secteurs notamment les agrumes (Zindine, 2011).

## III. CONDUITE TECHNIQUE DU FIGUIER

### 1. EXIGENCES EDAPHO-CLIMATIQUES DU FIGUIER

#### 1.1. Sol

Le figuier s'adapte à une large gamme de sol, depuis les sols lourds argileux jusqu'aux sols sablonneux, mais la production est abondante sur les sols riches, calcaires, frais et profonds (Messaoudi, 2014). Le figuier tolère des pH de 6 à 7.7, mais craint les fortes concentrations en Sodium et en Bore (Walali et *al.*, 2003).

#### 1.2. Eau

Le figuier a des besoins en eau faibles par rapport aux autres espèces fruitières à feuilles caduques, mais cette demande est élevée pendant la maturation des fleurs (Juin). Le figuier devient sensible à la sécheresse durant la division cellulaire (Messaoudi, 2014). Ses besoins réels annuels en eau sont de l'ordre de 600 mm surtout au printemps et en été (Oukabli et *al.*, 2008).

#### 1.3. Climat

Le figuier craint les pluies ; les brouillards et les fortes hygrométries nocturnes sont très préjudiciables à la récolte. Les figes mûres ou à proximité de maturité ont une prédisposition à éclater selon les variétés (Vidaud, 1997).

Les jeunes figes sont endommagés par les températures -4 et -5 °C, complètement tués quand la température est inférieure à -8 °C. Les nouvelles pousses sont endommagées par des températures inférieures à -1°C. Les températures élevées en fin du printemps et en été agissent sur la qualité des figes destinées au séchage (Messaoudi, 2014).

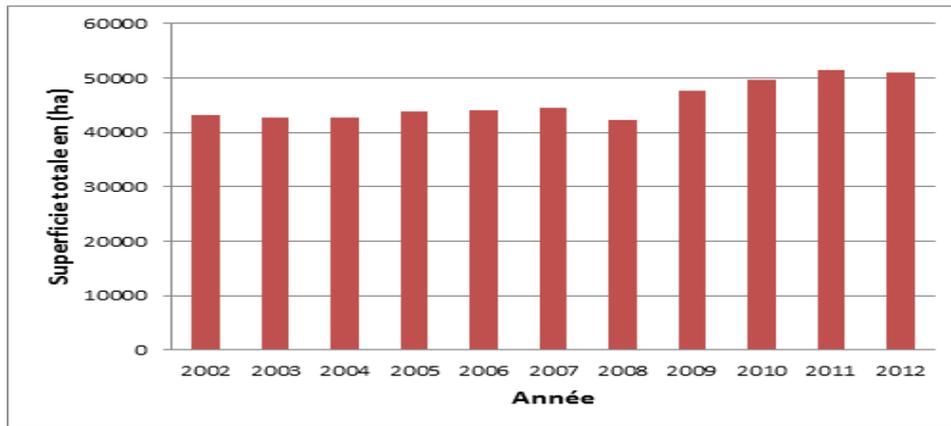


Figure 7 : Evolution des superficies du figuier au Maroc

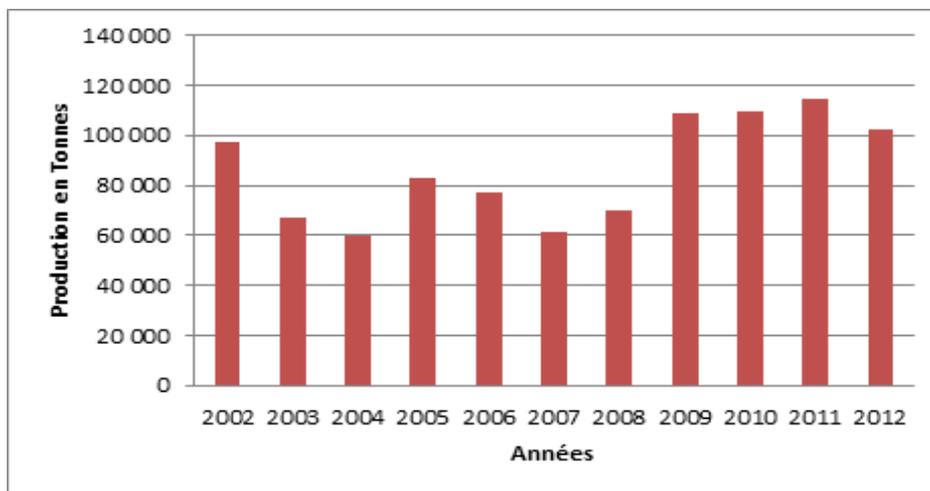


Figure 8 : Evolution de la production des figes au Maroc

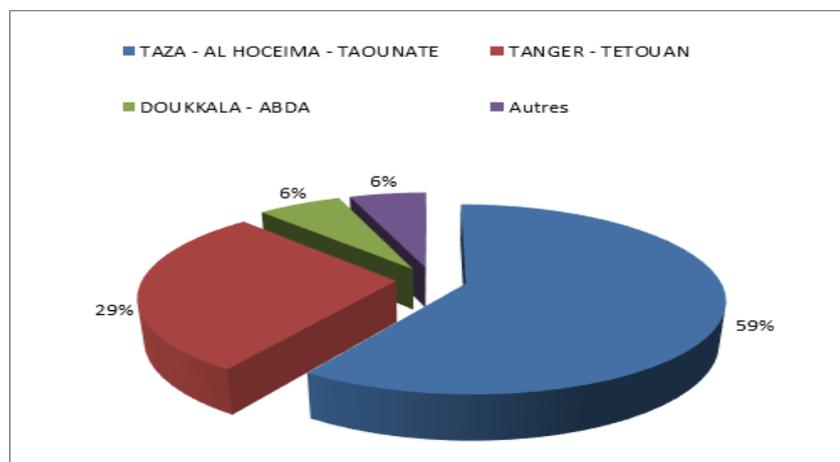


Figure 9 : Répartition de la superficie en Bour, emblavée par le figuier au niveau national

Le vent a moins de prise sur le figuier que sur bon nombre d'autres espèces fruitières cultivées. Il peut cependant, selon la violence avec laquelle il souffle, provoquer des dégâts directs sur les feuilles (déchirures possibles) ou indirects sur les fruits par frottement de ces derniers contre les rameaux (Vidaud, 1997).

## **2. CREATION DE FIGUERAIE**

Une étude technique préalable, mettant l'accent sur les éléments précédents (climat, sol et disponibilité en eau) de la région d'installation du projet et le matériel végétal, est indispensable pour la réussite de la culture (Messaoudi, 2014).

### **2.1. Choix variétal**

Le choix des variétés dépend de l'objectif de la production (bifère, unifère ou les deux types), de l'époque de maturité et de la qualité du fruit recherché (cf. partie variétés). La caprification est nécessaire chez certaines variétés, pour assurer le développement des figes d'automne et obligatoire pour produire des figes destinées au séchage. La mise en place d'un verger doit respecter un sexe ratio de 1/20 (Oukabli, 2007).

### **2.2. Densité et époque de plantation**

La densité de plantation doit être raisonnée selon la richesse du sol, la vigueur de la variété choisie, la disponibilité d'eau d'irrigation et la durée de vie du verger. Les plantations en carrée/rectangle offrent la possibilité de mécanisation des travaux du sol, ainsi, les densités peuvent être autour de 3 à 6 sur 5 à 9 m, soit un nombre d'arbres de 185 à 666 figuiers/ha. La période optimale de plantation des plants à racines nues ou avec des mottes est l'hiver, suivie d'une irrigation (Messaoudi, 2014).

### **2.3. Entretien de la culture**

#### **2.3.1. Taille de formation**

L'objectif est de développer des structures capables de fructifier et de produire suffisamment sur une longue durée. À la plantation, il faut tailler à 60 - 80 cm en supprimant toutes les pousses de la base pendant la 1<sup>ère</sup> saison.

À la première taille d'hiver, retenir 3 à 4 charpentes bien espacées entre elles et par rapport à la verticale et les tailler à 60-90 cm selon les variétés. Au cours de la 2<sup>ème</sup> taille de dormance, sélectionner les charpentes secondaires à raison de 2 à 3 par charpente primaires (Messaoudi, 2014).

### 2.3.2. Taille de fructification

Développer plus de nouvelles formations pour les variétés unifères et un équilibre entre le bois de l'année et le bois de plus d'un an pour les variétés bifères. Enlever tout le bois encombrant et/ou cassés et tailler les structures ayant perdu leur capacité de croître en hauteur (Messaoudi, 2014).

## 2.4. Irrigation

La production est possible mais faible en cas d'absence d'irrigation. La quantité à apporter dépend de l'âge et du stade phénologique de l'arbre, de la variété, du climat et du sol. Les irrigations copieuses en été favoriseront la reprise de la croissance aux dépens de la croissance terminale et de la maturité des figues. Ainsi, des irrigations pendant l'été provoquent la formation de fruits moins charnus et excessivement poreux. Par contre, le stress hydrique au cours de la saison de croissance provoque une chute des feuilles et une qualité médiocre (Messaoudi, 2014).

## 2.5. Travail du sol

Le système racinaire étant traçant, les travaux du sol doivent être superficiels pour éliminer les adventices et faciliter l'infiltration des eaux de pluie. Lorsque le couvert végétal devient important (4<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> année), le travail du sol peut se limiter aux interlignes. (Oukabli et *al.*, 2008).

## 2.6. Caprification

La caprification est une technique qui consiste à favoriser la pollinisation en suspendant les caprifigues sur le figuier domestique. Au Maroc, les cultivateurs de la figue pratiquent la caprification en utilisant les profichis acheté du "souk" ou des voisins. La présence des "mammes" (étape du cycle de développement de l'insecte) est nécessaire pour assurer la survie du Blastophage. Un nombre important de profichis par arbre de caprifiguiers est fondamental pour optimiser la pollinisation (Oukabli et *al.*, 2008).

## 2.7. Fertilisation

Le figuier ne requiert pas de fortes doses en fumure. En sol irrigué et riche, on peut préconiser une fumure riche en potasse de type 1-1,5-2,5 (N, P, K). En sol pauvre, l'apport de fumure additionnée à la potasse (200 U) est préférable. La fumure doit être apportée loin du tronc à l'aplomb de la frondaison. L'apport d'azote en Juin améliore le calibre des figues d'automne. Dans la plupart des pays producteurs, comme la Turquie, la fertilisation apportée est sous forme organique (fumier) (Oukabli et *al.*, 2008).

## 2.8. Maladies et ravageurs

Dans les vergers mal entretenus (pas de taille), la cochenille du figuier ou Kermès (*Lepidosaphes ulmi*) se développe sur l'écorce, les feuilles et les fruits, sécrétant une substance cireuse blanc-rosâtre. Suite à ces attaques, la fumagine se développe sur les arbres; les fruits récoltés sont alors impropres à la consommation (Wallali et al., 2003).

Une autre maladie due à *Rosellinia necatrix*, se manifeste par un feutrage mycélien blanc sur les racines et l'extrémité des rameaux qu'il dessèche. D'autres maladies sont aussi fréquentes telles que l'*Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*. Un poudrage au soufre, le Zineb ou le Dithane M45 permettent un contrôle de ces maladies (Wallali et al., 2003).

Parmi les insectes, on peut citer le psylle du figuier qui s'attaque aux feuilles et aux jeunes pousses et la mouche noire des figues qui peut faire chuter certaines années jusqu'à 60 à 70% des fruits (Wallali et al., 2003).

## IV. OBJECTIF DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE EN GENETIQUE ET AMELIORATION CHEZ LES PLANTES

L'objectif majeur de la recherche agronomique en génétique et amélioration des plantes est de sélectionner de nouvelles variétés, performantes, productives et de meilleure qualité.

Pour cela, il est nécessaire d'exploiter efficacement et de manière raisonnée la diversité génétique des plantes cultivées et de leurs apparentées sauvages. Le principe est d'étudier la variabilité génétique (des allèles) au niveau interspécifique (entre espèces) et au niveau populationnel (entre populations).

L'objectif recherché est d'identifier et dénombrer des entités distinctes et quantifier la variabilité génétique au niveau intra-spécifique. Cette variabilité génétique peut se décomposer en "variabilité intra-population" (variabilité génétique entre les individus d'une même population), et en "variabilité inter-population" (variabilité génétique entre populations) (Charafi, 2007).

### 1. OUTILS DE BASE

Les enzymes cellulaires "isoenzymes" ont été les premiers marqueurs utilisées pour la caractérisation du génotype des plantes en 1983 par Tranksley et Orten. Cependant, le nombre de ces marqueurs était très faible et ils affichent de faibles polymorphismes (quelques allèles par locus). En outre, dans certains cas, le polymorphisme des isoenzymes est influencé par les conditions de l'environnement.

Alors, de nouveaux marqueurs génétiques basés sur le polymorphisme de l'ADN ont été largement développés et utilisés pour la caractérisation des gémoplasmes (Morgante & Olivieri, 1993 ; De Vienne & Santoni, 1998). Nous citons comme exemple les techniques :

- Restriction Fragment Length polymorphisme (RFLP) ;
- Polymorphisme de l'ADN amplifié par hasard (RAPD) ;
- Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP) ;
- Microsatellites ou Séquences Simples Répétées (S.S.R.).

## 2. POLYMORPHISME DES LONGUEURS DE FRAGMENTS DE RESTRICTION (RFLP)

### 2.1. Enzymes de restriction

Parmi les plus importantes découvertes en génétique moléculaire, on trouve l'identification des enzymes endonucléases de restriction pouvant couper les deux brins d'ADN (on dit également digèrent) en des sites spécifiques, appelés "sites de restriction", comprenant le plus souvent un nombre pair de bases (4, 6, 8 et parfois plus), arrangées en général en palindrome (Jones et *al.*, 1997).

### 2.2. Polymorphisme de l'ADN

Le polymorphisme de l'ADN est utilisé comme marqueur génétique d'identification d'individus dans de nombreux domaines. Au sein d'une population, le polymorphisme, défini comme la résultante de variations dans la séquence de l'ADN, se traduit soit par l'apparition de différents phénotypes, soit par des modifications des profils de restriction (Tagu, 1999).

### 2.3. Réaction en Chaîne par Polymérisation(PCR)

La Réaction en Chaîne par Polymérisation est 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°) afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténares ;
- L'hybridation d'oligo-nucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire cible (la température est alors ramenée à une valeur comprise entre 40 et 65°C afin de permettre une bonne fixation des amorces) ;
- La réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taqpolymérase) à partir des oligo-nucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C.

Cette technique de 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.

## **2.4. Principe du Polymorphisme des Longueurs de Fragments de Restriction(RFLP)**

Le principe de la technique RFLP (Annexe 1a ) 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. 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).

## **3. POLYMORPHISME DE L'ADN PAR AMPLIFICATION ALEATOIRE (RAPD)**

Les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) constituent une variante de la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) permettant l'amplification au hasard de portions d'ADN (Welsh et McClelland, 1990; Williams et *al.*, 1990).

Lors d'une recherche de polymorphisme d'un génome et si aucune séquence d'ADN précise n'est ciblée, il est possible d'utiliser des oligonucléotides des petites tailles (de 6 à 10 bases) de séquence aléatoire. Ces amorces vont se fixer sur l'ADN cible au hasard (Annexe 1b) et la nature des produits d'amplification obtenus est inconnue (Tagu, 1999).

Elle permet d'obtenir rapidement des fragments variés de l'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, 1999).

Les marqueurs obtenus par cette technique ont généralement une transmission mendélienne. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs d'introgression ou dans certains cas pour déterminer la paternité et les relations de parenté entre individus. Par ailleurs, ils sont utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique. 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.*, 1994).

## **4. POLYMORPHISME DE LONGUEUR DES FRAGMENTS D'AMPLIFICATION (AFLP)**

Historiquement, cette technique a été mise au point en 1993. Son principe repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir d'un échantillon d'ADN génomique. Elle permet la recherche de polymorphisme de longueur de fragment d'ADN de restriction au niveau de l'ADN (Annexe 1c). Elle est utilisée par exemple pour

l'identification d'espèces, l'analyse de pedigree et la recherche de marqueurs génétiques liés à un caractère.

La technique d'AFLP est également utilisée pour l'identification de gènes exprimés de manière différentielle. Dans ce cas l'analyse AFLP porte sur des ADN complémentaires (ADNc) synthétisé à partir d'ARN messagers. Cette technique appelée AFLP-ADNc permet de visualiser de manière indirecte des sous populations d'ARNm et de les comparer entre elles.

#### **4.1. Séquence à Répétition Inter Simple (ISSR)**

Une exploitation plus récente des ISSR consiste à les révéler en masse, en s'inspirant du principe de la technique RAPD. On utilise pour cela une amorce constituée pour partie d'une séquence des ISSR, et pour partie de base arbitraire. Deux types d'amorces sont concevables, selon les positions relatives de ces deux parties (Annexe 1d).

La P.C.R. va amplifier en même temps de nombreux fragments flanqués de microsatellites, donc très polymorphes (De Vienne, 1998). Le polymorphisme dépend ici du nombre d'unités de répétitions. La quantité de marqueurs polymorphes peut être élevée. La technique est simple et de faible coût. Enfin, l'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissances particulières des séquences d'ADN.

#### **4.2. Microsatellites**

Les microsatellites, qu'on appelle également SSR (Séquence à Répétition Simple) sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, ou tétra nucléotidiques. Les plus courants sont  $(A)_n$ ,  $(TC)_n$ ,  $(GATA)_n$ ,...etc.. La valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. De tels motifs sont en outre très abondants chez les eucaryotes, c'est-à-dire qu'un microsatellite donné peut être présent à des milliers d'exemplaires dans le génome d'une espèce (De Vienne, 1998).

Grâce aux amorces spécifiques de locus, le polymorphisme des différents microsatellites peut être révélé individuellement (Annexe 1e).

Ce type de séquence présente un fort polymorphisme consistant en la variation du nombre de répétitions. L'intérêt des microsatellites réside dans leur fort polymorphisme ainsi qu'à la capacité de semi-automatiser les manipulations. Si les SSR constituent des marqueurs moléculaires adéquats (reproductibles, codominants et d'utilisation aisée), leur caractérisation initiale est toutefois assez lourde. En effet, leur identification et leur développement doit passer par l'enrichissement d'une banque génomique en motifs répétés, puis par le clonage et le séquençage de nombreux fragments, par le développement d'amorces PCR, la mise au point des conditions d'amplification et la sélection des locus polymorphes.

Pour contourner ces difficultés, il est possible d'utiliser des microsatellites hétérologues développés sur des espèces phylogénétiquement proches. Une autre possibilité consiste à chercher *in silico* des motifs répétés dans les bases de données comme Genbank (Morgante&Olivieri, 1993 ; de Vienne &Santoni, 1998).

**Exemple** Allèle 1 : GTCACATATATATATATATATATATATATTG.

Allèle 2 : GTCACATATATATATATATATATATTG.

## V. DIVERSITE VARIETALE

### 1- PROBLEMATIQUE DE LA DISCRIMINATION VARIETALE

La diversité des conditions climatiques, les limites étroites entre le sauvage et le cultivé et la domestication locale ont permis au figuier d'acquérir une certaine diversité génétique au Maroc. Les travaux de prospection et les études génétique ont révélé une diversité importante et une originalité du patrimoine génétique national (Oukabli et *al.*, 2008 ; Achtak et *al.*, 2009). De même, le figuier représente une richesse variétale considérable en comparaison avec les autres arbres fruitiers comme l'olivier (Hmimsa et Ater, 2008).

Le matériel végétal existant au Maroc provient d'individus issus de semis et probablement introduit d'autres pays méditerranéens. Le mode de multiplication végétative, par bouturage et/ou marcottage, a facilité l'échange de matériel végétal entre les pays mais aussi entre les régions. Cet échange a souvent accompagné le flux des populations humaines et a engendré, en revanche des confusions dans les dénominations variétales (Oukabli, 2008).

Les travaux de recherche sur le figuier montrent qu'il existe des problèmes de dénomination variétale (Tableau 1), surtout des homonymies et/ou des synonymies qui ont généré une situation extrêmement confuse dans le profil génétique du figuier. Comme exemple, 36 variétés/dénominations ont été dénombrées à Taounate, 29 à Ouazzane, 26 à Tétouan et 7 à Zerhoun. Dans chaque zone, 3 à 5 variétés prédominent ; les autres sont représentées par quelques arbres dispersés dans le verger (Khaloui, 2010).

**Tableau 1 : Liste des clones marocains de *Ficus carica* et des clones étrangers expérimentés à AïnTaoujdate (INRA 2002).**

Nom du clone marocain	Nom de la variété	Origine géographique
EmbarLebied	White late	USA
FerqouchJmel	Kadota	Italie
EmbarLekhel	Hamaya	Japon
Fassi	Rhzali	Palestine
Hamra	Tarlit	Algérie
Zrequa	Taranimt	
ElquotiLebied	Adronianiki	Grèce
Aoud Elma	Calamon	
Aissa Moussa	Kalamata	
Yaouc	Bourjassotte Noire	Afrique-Nord
Amtelaâ Arch	Azougouar	Algérie
JeldElhmar	Azendjar	
Ferzaoui	Abakor Blanca	
Chaari	Bioudi	Tunisie
Bousbati	Cuello Dama Blanca	Espagne
Sebti	Verdale	Portugal
Jebli	Troino	Italie
Chbâa ou R'goud		
Reggoudi	Khelima	Grèce
Kahoulia	Royal Blanche	-
Filalia	BrebaNegra	Espagne
M'hadaq	Sangue de Caballo	
Megioud	Brown Turkey	Turquie
Nabout	Abiarous	Algérie
HaferElbghal	Tameriout	
Bourqui	Lerida	Espagne
M'tioui	Grosse Dame Blanche	France
Mendar	Smyrne	Turquie
ElquotiLazraq	Melissosyki	Grèce
Rhouli	Abghaïti	France
AounqElmam	Chetoui	Afrique nord
Ham Rhmam		
Abrouqui		
Noukali		
Hamra 25		
Hamra 22		
HaferJmel		
Elkhal		
GhadarElarch		
Elhmiri		
Ahra		
Azougar		
Rhoudane		
Ournakssi		

## 2- HOMONYMIES ET SYNONYMIES VARIETALES CHEZ LE FIGUIER

Bien que le nombre de variétés constituant l'espèce *Ficus carica* L. soit considérable, leur inventaire et leur identification sont confrontés aux problèmes de confusion taxonomique. Ainsi, différentes variétés peuvent porter une même appellation (homonymie) tandis qu'une même variété peut être désignée par des dénominations différentes d'une région à l'autre (synonymie) (Oukabli, 2003).

Selon les relations génétiques entre les génotypes, on peut distinguer trois types d'homonymies :

- Les homonymies correspondant aux génotypes très proches (au sein d'un clone), c'est l'exemple des variétés 'Rhoudane', 'Zerki', et 'Biyadi', qui comprennent respectivement trois, quatre et quatre génotypes très proches. Ces cas correspondent probablement à des cas de mutations somatiques intra clones, et ne constituent pas réellement des cas d'homonymies.
- Les homonymies regroupant des variétés présentant des caractères pomologiques similaires mais des génotypes distincts. C'est le cas des cultivars 'AïnHajla', 'Rhoudane', 'Kehla', et 'Biyadi', représentant deux, six, huit, neuf et six génotypes distincts, respectivement.
- Des cas d'homonymies regroupant des variétés distinctes aux niveaux pomologique et génétique.

Il existe également deux types de synonymies :

- Les vraies synonymies : il s'agit des figuiers sous des dénominations différentes mais présentant des caractères pomologiques et un profil génétique identique. C'est le cas de 'Johri' et 'El Messari'.
- Les fausses synonymies : ce sont des figuiers ayant une dénomination générique identique ou proche et des caractères pomologiques identiques à l'exception de la couleur de l'épiderme (cas des mutations somaclonales). Exemple de variétés : 'Col de Dame blanche', 'Col de Dame grise' (Achtak, 2009).

## 3- SELECTION GENETIQUE DU FIGUIER

Les figuiers domestiques se présentent en deux types :

- Des variétés qui ne produisent que des figes d'automne et sont appelées "unifères" à titre d'exemple : Ournakssi, LembdarLakhlal, Khlima, Fassi, Hamara, Filalya, Ghouddane, Ham Rhaman, JebliAounq, Hamam, et Beida (Messaoudi, 2014).

- D'autres donnent, en plus, une production de figes fleurs et sont appelées "bifère" comme : El quoti el bied, Hafer el-bghal, Hamra, M'Hadaq et Nokkal (Messaoudi, 2014).

Plusieurs travaux d'étude variétale et de sélection ont été effectués au Maroc. La sélection génétique est basée essentiellement sur trois principaux critères : la production des figes fleurs, la production des caprifigier (pour la caprification) et la production des figes d'automne pour le séchage.

Les variétés et les clones de figuier sélectionnés pour la culture, par les chercheurs du CRRA de Meknès au Maroc sont : Nabout, Beida 2256, Chetoui, Ember Lebied, Hafer el bghal, Châari 2587, Regoudi, Ferqouch Jmel, Ghoddane, Assel, Filalia, Jeblia, Ember El-Khel, Bousbati, Ournaksi 2280 et Fassi (Oukabli, 2012). Des variétés étrangères, à savoir : Abacor Blanca, Lerida, Cuella Damo Blanca, Khelima, Tarbit, Kodata et Trojana sont aussi sélectionnées (Oukabli, 2012). Récemment, d'autres variétés sont recommandées aux agriculteurs pour les figes destinées au séchage : El quoti et Naboute comme variétés nationales et Col de Dame Blanche, Sarilop et Kadota comme variétés étrangères (Oukabli, 2012).

## **VI. APPLICATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE AU FIGUIER**

### **1. ETUDE DE VARIABILITE GENETIQUE PAR RAPD**

La technique RAPD est utilisée dans les études de diversité entre les différents cultivars de figuier. Elle a permis d'étudier la variabilité génétique au sein des différents clones de figuier, des populations naturelles ou domestiquées et la caractérisation des génotypes (Khadari et *al.*, 1994).

En effet, le travail de Khadari et *al.* (1994) avait pour but la recherche et la caractérisation des marqueurs RAPD en vue d'identifier les différents génotypes qui sont présents au sein d'un ensemble d'échantillons de figuiers. Le matériel végétal étudié étant 21 accessions de figes représentant 19 dénominations différentes. Ces variétés sont issues de quatre différentes localités : Roumanie, Porquerolles, Perpignan et Montpellier. Le but était d'étudier la stabilité clonale de ces variétés tout en sachant qu'elles ont le même spectre enzymatique et les mêmes traits morphologiques. La seule différence réside dans la couleur de l'épiderme du fruit.

Ce travail a démontré le pouvoir d'identification variétal à l'aide de ce type de marqueurs. Ainsi, l'étude a révélé un ensemble de marqueurs RAPD dans le but de leurs utilisations dans des travaux d'évaluation de la diversité génétique des populations naturelles de cette espèce.

## 2. ETUDE DE VARIABILITE GENETIQUE PAR ISSR

L'efficacité des marqueurs (Khadari et *al.*, 2003) ISSR dans la caractérisation moléculaire de 30 cultivars de figuier, a été déterminée par l'évaluation de l'hétérozygotie et le nombre d'allèles identiques. Cette étude a permis d'identifier 2 à 6 allèles différents par locus avec une moyenne de 4 allèles par locus.

## 3. ETUDE DE VARIABILITE GENETIQUE PAR SSR

D'après les travaux de recherche concernant le développement des microsatellites chez le figuier, il s'avère que le nombre de locus mis au point est faible. Ceci est en partie expliqué par l'intérêt secondaire accordé à cette espèce, en comparaison avec la vigne et les rosacées en termes d'exemple.

Les travaux ayant utilisé les marqueurs SSR dans la caractérisation des ressources génétiques du figuier sont limités. Khadari et *al.*(2003) ont utilisé cinq locus pour caractériser la collection du figuier de CBNMP (France). En effet, avec un nombre de 25 allèles détectés ils ont pu distinguer 52 profils SSR différents sur 70 individus soumis à l'analyse.

En Tunisie (Saddoud et *al.*, 2005), l'utilisation de six locus a permis de distinguer facilement entre 16 cultivars du figuier.

Plus tard, au Maroc (Achtak et *al.*, 2009), la caractérisation de 241 génotypes locaux et cultivars, prospectés à travers tout le pays et à l'aide de 17 locus SSR a permis de révéler 140 génotypes distincts. Ceci a montré également une richesse allélique et similaire entre le figuier cultivé et le figuier sauvage (95 et 103 allèles respectivement).

Tandis qu'en Espagne, Giraldo et *al.* (2005), ont détecté un faible polymorphisme entre 209 accessions de figuier d'une seule collection. Ces accessions ont été classifiées en 98 génotypes (3,9 allèles par locus et  $H_0 = 0,38$ ). Ainsi, ces auteurs ont déduit que ce matériel végétal appartient au même pool génétique.

## 4. EFFICACITE DES TROIS MARQUEURS MOLECULAIRES

Les marqueurs RAPD et ISSR ont été utilisés pour la caractérisation des cultivars de figuier (Khadari et *al.*, 1995 ; Elisario et *al.*, 1998 ; Galderisi et *al.*, 1999 ; Cabrita et *al.*, 2001 ; Khadari et *al.*, 2003 ; De Masi et *al.*, 2003 ; Khadari et *al.*, 2004 ; Ikegami et *al.*, 2009) et leur comparaison par Khadari et *al.* (2003) montrent que les marqueurs ISSR sont plus efficaces que les RAPD pour l'identification des cultivars de figuier.

Bien que, l'utilisation des marqueurs RAPD ait été aussi limitée par l'emploi arbitraire des courtes séquences, ces marqueurs présentent aussi le problème de reproductibilité des résultats (Jones et *al.*, 1997). De ce fait, le recours aux marqueurs de type codominant est indispensable pour contourner ces problèmes.

Anderson et *al.* (1993) et Tessier et *al.* (1999) ont pu déduire que les ISSR sont les marqueurs les plus efficaces pour étudier la discrimination variétale chez le figuier. Ces auteurs ont avancé aussi que les microsatellites (SSR) sont adaptés à cette application.

Ce travail comporte deux parties. L'une concernant l'étude de la diversité génétique intra spécifique de différentes variétés de Figuier récoltées de différentes régions et différents vergers au sein de la même région.

La seconde partie concerne l'étude d'une descendance de plants de Figuier afin de vérifier l'authenticité du croisement concerné.

## I. DIVERSITE GENETIQUE INTRASPECIFIQUE DE DIVERSES VARIETES

### 1. MATERIEL VEGETAL

Cette étude est réalisée sur 35 génotypes, correspondant à quatre variétés différentes (Tableau 2) :

- **Variété Naboute**: Comportant dix génotypes différents. Deux sont récoltés de Taoujdate (NT1 et NT2), un seul de l'ENAM (NE), le reste de Taounate et plus exactement issus de trois Douar distincts. Deux génotypes de Douar "Lakhlalfa" (NM1et NM2) ; trois de Douar "Zrizar" (NBr<sub>1</sub>, NBr<sub>2</sub>et NBr<sub>3</sub>) et deux autres génotypes de Douar "Bouhouda" (NB<sub>1</sub> et NB<sub>2</sub>).
- **Variété Ghoudane** : On a récolté Quatre génotypes de deux régions différentes. Deux provenant de l'ENAM (GE<sub>1</sub> et GE<sub>2</sub>) et deux autres de Taoujdate (GT<sub>1</sub> et GT<sub>2</sub>).
- **Variété EL Quoti** : 13 échantillons sont récoltés, dont 11 proviennent de la région de Ouazzane, plus exactement de quatre Douar différents : Trois génotypes de Douar "MarjatDfali" (QB<sub>1</sub>, QB<sub>2</sub> et QB<sub>3</sub>), Trois de "Beni Ahmed Cherkia" (QB<sub>4</sub>, QB<sub>5</sub>et QB<sub>6</sub>), un de "Mansoura" (QB<sub>7</sub>) et quatre génotypesde Douar "Tertkalou" (QB<sub>9</sub>, QB<sub>11</sub>, QB<sub>12</sub>et QB<sub>13</sub>).  
Les génotypes QLZTet QBT de Taoujdate.
- **Variété Massari** : les génotypes de cette variété proviennent de la région de Ouazzane, mais de trois Douars différents : M<sub>1</sub>et M<sub>2</sub>de "Beni Ahmed Cherkia" ; M<sub>3</sub>et M<sub>4</sub> de "Boulid". Et enfin, les quatre derniers de "Tertkalou" (M<sub>5</sub>, M<sub>6</sub>, M<sub>8</sub> et M<sub>9</sub>).

Le matériel végétal est composé de jeunes feuilles prélevées au début de l'apparition du feuillage sur les arbres (mi-Mars).

La lyophilisation est effectuée dans des bouteilles en verre (Figure 10)après une congélation à -20°C. Le lyophilisateur utilisé est du type WPA Biowave S2100.

Tableau 2 : Liste des variétés étudiées et le lieu de récolte.

N	Génotypes	Région	Douar	N	Génotypes	Région	Douar
1	NT <sub>1</sub>	Taoujdate		17	QB <sub>1</sub>	Ouazzane	MarjatDfali
2	NT <sub>2</sub>			18	QB <sub>2</sub>		
3	NE	ENAM		19	QB <sub>3</sub>		
4	NM <sub>1</sub>	Taouante	Lakhlalfa	20	QB <sub>4</sub>	Ouazzane	Beni Ahmed Cherkia
5	NM <sub>2</sub>						
6	NBr <sub>1</sub>	Taouante	Zrizar	22	QB <sub>6</sub>		
7	NBr <sub>2</sub>						
8	NBr <sub>3</sub>						
9	NB <sub>1</sub>	Taouante	Bouhouda	23	QB <sub>7</sub>	Ouazzane	Mansoura
10	NB <sub>2</sub>						
11	GE <sub>1</sub>	ENAM		24	QB <sub>9</sub>	Ouazzane	Tertkalou
12	GE <sub>2</sub>			25	QB <sub>11</sub>		
13	GT <sub>1</sub>	Taoujdate		26	QB <sub>12</sub>		
14	GT <sub>2</sub>			27	QB <sub>13</sub>		
15	QLZT	Taoujdate		28	M <sub>1</sub>	Ouazzane	Beni Ahmed Cherkia
16	QBT			29	M <sub>2</sub>		
				30	M <sub>3</sub>	Ouazzane	Boulid
				31	M <sub>4</sub>		
				32	M <sub>5</sub>	Ouazzane	Tertkalou
				33	M <sub>6</sub>		
				34	M <sub>8</sub>		
				35	M <sub>9</sub>		

Légende : N : Naboute      G : Ghoudane      Q : EL Quoti      M : Massari  
 LZ : Lazraq,      B : Bayad      T : Taoujdate      E : ENAM

## 2. EXTRACTION DE L'ADN

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

- Une action physique : consiste à détruire les structures cellulaires (particulièrement la paroi cellulaire) par broyage mécanique (Figures 11) ;
- Une action chimique (lyse chimique) tendant à solubiliser les composantes biochimiques du tissu et détruire les parois cellulaires ;
- Une purification (isolation) de l'ADN, des autres molécules biologiques présents dans les cellules comme les protéines, les polysaccharides et les composés phénoliques (séparation par affinité aux phases). Puis, précipitation de l'ADN par l'isopropanol et lavage de cet ADN par l'éthanol à 70%.

### 2.1. Principales étapes de l'extraction de l'ADN

Après la dessiccation des échantillons, on procède à l'extraction de l'ADN en utilisant la méthode CTAB, de Sghai-Marrof et al. (1984), modifiée. Les étapes d'extraction sont les suivantes :

- Broyer dans un tube Eppendorf, de 2 ml, 20 à 40 mg de feuilles lyophilisées.
- Ajouter 1250 µl de tampon d'extraction CTAB (Annexe 2).



**Figure 10 : Lyophilisation des feuilles dans WPA Biowave S2100.**



**Figure 11a: Broyeur à billes.**



**Figure 11b : Sortie des billes des tubes Eppendorf après broyage.**



**Figure 12 : Spectrophotomètre.**

- Mettre les extraits dans le bain marie réglé à 65°C pendant 30 min à 1h, en mixant à l'aide d'un vortex toutes les 15 min.
- Additionner 500 à 700 µl du chloroforme/iso-amylque (24/1)(Annexe 2).
- Agiter pendant 15 à 20 min.
- Centrifuger à 13 000 rpm, à 25°C, pendant 10 min.
- Prendre le surnageant dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.
- Ajouter 500 µl du chloroforme/iso-amylque (24/1), et agiter pendant 3 min.
- Centrifuger à 13 000 rpm, à 25°C, pendant 10 min.
- Prendre le surnageant et ajouter 800 µl d'iso-propanol froid.
- Laisser les tubes pendant 30 min ou plus, à 4°C avant la dernière centrifugation.
- Centrifuger à 13 000 rpm, pendant 10 min, à 4°C.
- Récupérer le culot et rincer avec 500 µl d'éthanol froid 70%.
- Sécher les tubes Eppendorf de l'éthanol dans un dessiccateur.
- Additionner 100 µl de la solution Tris-EDTA (0.5 X).
- Conserver les échantillons dans le congélateur.

## 2.2. Rôle des réactifs

### 2.2.1. 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 de l'enzyme qui endommage l'ADN Désoxyribonucléases et qui demande l'intervention des cations ( $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ).

### 2.2.2. Rôle des concentrations élevées en sel

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

## 3. QUANTIFICATION D'ADN PAR SPECTROPHOTOMETRIE

L'objectif est la mesure de la concentration d'ADN des 27 échantillons du figuier, qui passent par la 1<sup>ère</sup> étape de dilution des échantillons avec un facteur de dilution équivalent à 1/40 à partir de l'ADN concentré.

Puis nous procédons à l'étalonnage du spectrophotomètre (Figure 12) de type (WPA, Biowave, S2100, Diode Array spectrophotometer) et qui donne des valeurs numériques de la densité d'ADN.

D'après ce test, les concentrations d'ADN obtenues oscillent entre 255 et 3361,3 µl/ml, avec une moyenne de 1456 ng/ml, donc l'extraction est bien faite. Ensuite, nous procédons au test d'ADN sur gel d'agarose pour visualiser les bandes d'ADN et s'assurer

qu'il n'est pas dégradé. 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 : 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 étaient compris entre 1,6 et 2,2.

#### 4. TEST DE QUALITE D'ADN SUR GEL D'AGAROSE

Pour tester la qualité de l'ADN par électrophorèse, un gel d'agarose 1% est préparé (Figure 13a). 15 µl de chaque échantillon (10 µl d'ADN + 5 µl du bleu d'agarose) sont déposés dans chaque puits (Figure 13b). La migration est effectuée dans un tampon de type TBE 1X (Tris 1M, EDTA 0,5 M pH 8, acide borique 1M, eau moléculaire Stérile).

L'électrophorèse est effectuée sous un courant électrique de 80V. Après la migration, les bandes d'ADN sont visualisées sous une lumière UV en utilisant un système d'imagerie après coloration au bromure d'éthidium.



Figure 13a : Préparation du gel.

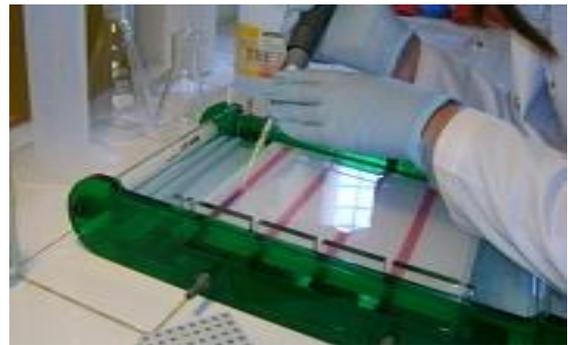


Figure 13b : Dépôt des échantillons.

#### 5. DILUTION DES ECHANTILLONS

L'objectif de cette dilution est d'avoir une concentration finale pour chaque échantillon de 15 ng/µl 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 ( $V_F$ ). On calcule le volume initial ( $V_I$ ) à prendre de chaque échantillon par la formule qui suit :

$$V_I = (C_F \times V_F) / C_I$$

#### 6. CONDITIONS D'APPLICATION DE LA PCR

La PCR permet d'amplifier des séquences cibles (des microsatellites et des ISSR) 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 (cas des microsatellites).

## 6.1. Conditions de la PCR pour les locus microsatellites

Les résultats de la lecture au spectrophotomètre nous indiquent la concentration nécessaire afin de réaliser la PCR (la concentration idéale d'ADN doit être comprise entre 15 et 20 ng/ $\mu$ l). L'ADN dilué subit, ensuite, une amplification par la méthode de PCR qui nécessite premièrement la préparation du mixte réactionnel (Annexe 3).

L'ADN est déposé premièrement au fond de la plaque (ou dans des tubes Eppendorf à PCR) par ordre de 5 à 10  $\mu$ l. Ensuite, on prend un volume de 22.50 $\mu$ l de chaque solution. La Taq polymérase, enzyme qui permet l'amplification de l'ADN, n'est ajoutée qu'à la fin. Les échantillons sont mis dans un thermocycleur (Figure 14) en choisissant un programme adéquat aux températures d'hybridations de chaque amorce utilisée.

## 6.2. Marqueurs moléculaires utilisés : Microsatellites

La caractérisation moléculaire est faite au laboratoire de l'Unité de Recherche : Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-Génétiques (APCR-PG) du C.R.R.A de Meknès. Six locus sont proposés comme clés d'identification variétale chez le figuier (Achtak et *al.*, 2009). On a testés ces six locus (Tableau 3).



Figure 14 : Thermocycleur en marche.

Tableau 3 : Séquences et températures d'hybridation des six microsatellites utilisés.

Locus	Séquence d'amorces (5'-----3')	Température d'hybridation
LMFC30-F	TCTTTT TAGGCAGATGTTAG	55 °C
LMFC30-R	TTGTCCGTTTCTTATACAAT	
MFC2-F	GCTTCCGATGCTGCTCTTA	55 °C
MFC2-R	TCGGAGACTTTTGTTC AAT	
MFC3-F	GATATTTTCATGTTTAGTTTG	55 °C
MFC3-R	GAGGATAGACCAACAACAAC	
TO6A12-F	CAAATGAAAACACAAATTTGCCAA	55 °C
TO6A12-R	TGCAAGTACTAATTCCTCTGCCGTG	
MFC9-F	GGAGGCAAACGACAAACGACAT	60 °C
MFC9-R	CAAGGAACCAAGCGGGAGGG	
MFC11-F	CAAAAGAGAAGACCAGCATC	60 °C
MFC11-R	GACGAGGGAAGGAGAGACAC	

## 7. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Après obtention de l'ADN amplifié, sa visualisation par rayons UV débute par la migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 2%. Le gel de migration est préparé, puis coulé dans la cuve électrophorétique(Annexe 4) :

- Préparation de TBE 5X (tampon de migration) :
 

53.91g de tris	}	Pour un litre
3.72g d'EDTA		
27.52g d'Acide borique		
- Préparation du gel :
  - TBE 1X (30 ml de TBE 5 X + 120 ml d'eau distillée)
  - Agarose 2% : 3g en 150 ml.

Le gel doit être coulé rapidement, dans la cuve où sont posés au préalable les peignes convenables à la quantité d'ADN à déposer, afin d'empêcher sa solidification. Après un temps suffisant pour la solidification du gel coulé, le support du gel + les peignes sont posés sur le support de coulage où la solution TBE 1X est déjà versée. Les peignes construisent des puits où l'ADN et le bleu d'agarose sont déposés (environ 20µl du mélange). La cathode vers le haut et l'anode en bas ce qui permet la migration de l'ADN du pôle négatif vers le positif.

## 8. ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE

La préparation du gel d'acrylamide passe essentiellement par les étapes suivantes :

- Préparation de la plaque à encoche et la plaque longue par rinçage à l'eau, l'alcool et le traitement par des produits spécifiques (Bind-silane et Sigmacote) ;
- Préparation de la solution de gel d'acrylamide filtré 6% (20 :1 acrylamide et bis-acrylamide, 7,5 Urée et tampon TBE 1x) ;
- Coulage du gel en ajoutant le TEMED (Tétra-méthylène-diamine) et le persulfate d'ammonium 10 % ;
- Installation du gel sur la cuve suivie de chauffage durant une heure sous une tension de 3000V ;
- Dépôt de 5 µl de chaque échantillon après une dénaturation pendant 5 minutes dans le thermocycleur ;
- Préparation d'un volume de 2 litres des solutions suivantes :
  - Acide acétique 10 % pour la fixation ;
  - 4 g de Nitrates d'argent dissous dans 2 litres d'eau ultra pure pour la coloration du gel ;
  - 60 g de Carbonates de sodium dissous dans 2 litres d'eau moléculaire pour la révélation.

## 9. ANALYSE DES DONNEES

Sur la base de la présence-absence des allèles obtenus et de leurs fréquences, on procède aux différentes analyses suivantes :

- Les distances entre les allèles produites par les marqueurs SSR sont calculées en utilisant le logiciel Mesurim Pro
- Un dendrogramme de classification ascendante hiérarchique est aussi construit sur la base de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic mean).

## II. AUTHENTICITE D'UNE DESCENDANCE DE PLANTS DE FIGUIER

### 1. MATERIEL VEGETAL

Cette étude est faite sur une descendance provenant du croisement représenté dans le tableau 4 :

**Tableau 4 : Croisement réalisé et descendance obtenue.**

Parents du croisement	Mâle	Femelle	Descendants
Sigle	PC7	P16	54
Nom des plants	Ksbat SKHIRAT	Ferqouch JMEL 2226	

La Figure 15 montre la méthode adoptée pour établir le croisement voulu dans le domaine expérimentale Taoujdate ; c'est la même méthode adoptée dans notre étude.

Cette méthode consiste à apporter une branche ou caprifigue (♂) abritant le blastophage, et la placer sur une branche de l'arbre femelle visée par la pollinisation. Le tout est englobé par un sachet, afin d'empêcher toute pollinisation naturelle.



**Figure 15 : Méthode de croisement forcé des parents au domaine expérimental Taoujdate**

Le but de cette étude, dont le protocole expérimentale est détaillé dans la première partie ; est de comparer les bandes électrophorétiques des deux parents avec celles des nombreux descendants, estimés qu'ils proviennent de ce croisement et cela avec différentes amorces ISSR.

## 2. MARQUEURS MOLECULAIRES ISSR UTILISES

Parmi une trentaine d'ISSR dont dispose le laboratoire, on a testé une dizaine d'amorces selon un gradient de température d'hybridation sur cinq échantillons pris au hasard puis sur la totalité des échantillons. Le tableau 5 représente les sept amorces utilisées après le test.

**Tableau 5 : Séquences et températures d'hybridation spécifiques des sept locus ISSR utilisés.**

Locus	Séquence d'amorces (5'-----3')	Température d'hybridation
UBC 817	AGAGAGAGAGAGAGAGCC	46 °C
UBC 818	AGAGAGAGAGAGAGAGCG	41 °C
F11	CACACACACACACACAAC	41 °C
IMA 5-3	CACACACACACACACATG	45 °C
IMA 5-Z	CACACACACACACACAGT	45 °C
ISSF1	AGAGAGAGAGAGAGAGTA	41 °C
UBC 841 Y-1	GAGAGAGAGAGAGAGYC R3'	46 °C

## 3. ANALYSE DES DONNEES

A partir du nombre de bandes (marqueurs) obtenues :

- Les distances de bandes produites par les marqueurs ISSR sont calculées en utilisant le logiciel Mesurim Pro.
- Test statistique  $\chi^2$ .
- Un histogramme de comparaison des individus en fonction des nombres de marqueurs qui les distinct est établi.
- Un dendrogramme de classification ascendante hiérarchique est aussi construit sur la base de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method WithArithmeticmean).
- Calcul de la similarité de la population F1.
- Calcul du taux de polymorphisme.

## I. DIVERSITE GENETIQUE INTRASPECIFIQUE DE DIVERSES VARIETES

### 1. TEST DE QUALITE DE L'ADN

Les tests sur gel d'agarose (Figure 16) ont permis de s'assurer de la qualité d'ADN extrait. Ce test est réalisé par six amorces précitées dans le tableau 3.

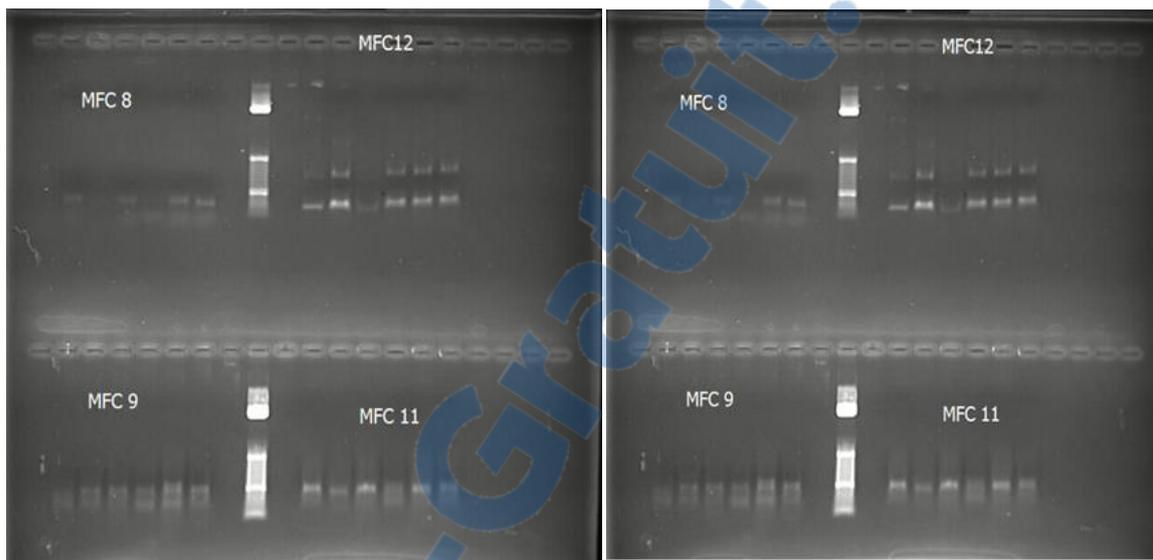


Figure 16 : Test de qualité d'ADN sur gel d'agarose.

D'après la figure 20, toutes les amorces montrent la présence de bandes à chaque échantillon. L'ADN n'est donc pas dégradé et l'extraction est réussie. Ceci est confirmé aussi par la lecture de la DO au spectrophotomètre des dilutions de l'ADN. Les valeurs étant comprises entre 1,8 à 2 révèlent une bonne qualité de l'ADN.

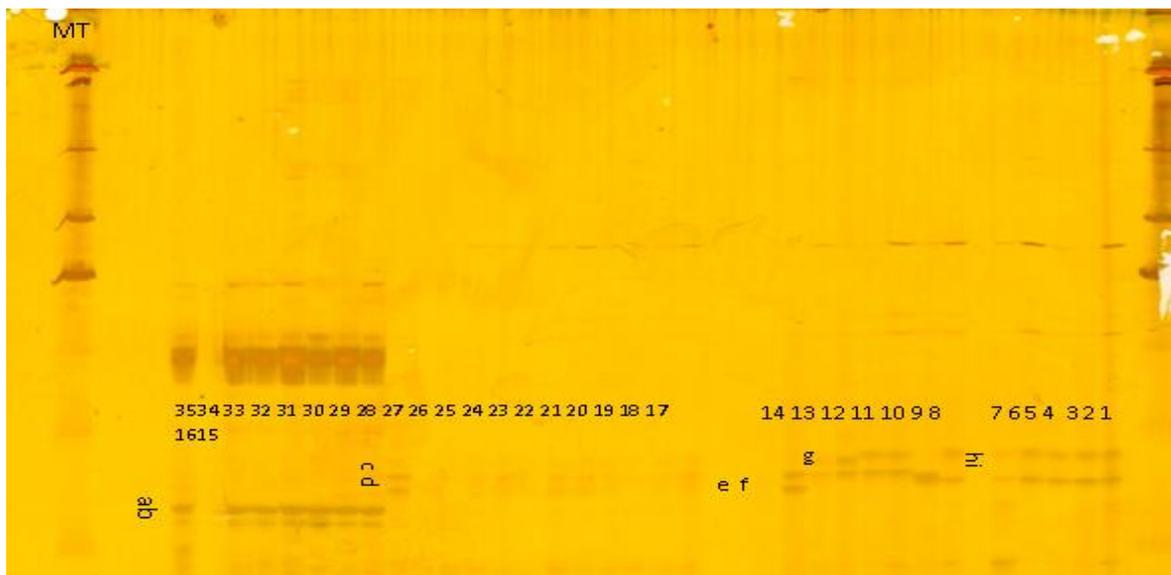
### 2. CARACTERISATION MOLECULAIRE PAR LES MICROSATELLITES

Pour la caractérisation des 35 génotypes étudiés, nous avons utilisé six locus SSR, ayant montré la présence de plusieurs allèles, visualisés et mesurés sur les gels d'acrylamide.

Parmi les six locus SSR étudiés, trois ont révélé des résultats interprétables : MFC<sub>3</sub>, TO<sub>6A</sub><sub>12</sub> et MFC<sub>11</sub>.

#### 2.1. Amplification par l'amorce MFC<sub>3</sub>

Le profil d'amplification de l'amorce MFC<sub>3</sub> (Figures 17) montre l'existence de neuf allèles différents avec une répartition déterminée chez les individus (Tableau 6).



**Figure 17 : Profils génomiques SSR générés par l’amorce MFC<sub>3</sub> sur 35 génotypes étudiés (le marqueur de taille -50kb leader plus- est déposé sur les extrémités).**

De 1 à 35 : Génotype du Tableau 2

De a à i : les allèles

**Tableau 6 : Résultats d’amplification de l’amorce MFC<sub>3</sub>**

Individus	Allèles	Variété
1 à 8/10 et 11	h et i	Naboute
9	i	
12	g et i	Ghoudane
13	e	
14	e et f	
De 15 à 27	c et d	El Quoti
De 28 à 35	a et b	Massari

- **La variété Naboute** présente deux formes de profils, neufs individus sont hétérozygotes [hi] et un seul homozygote [ii]. On conclut que cette variété peut avoir une diversité intra-clonale ou bien que le changement géographique a influencé sur certains individus. Le résultat d’amplification des deux autres amorces est nécessaire pour révéler le polymorphisme de Naboute.
- **La variété Ghoudane** : Trois formes alléliques ont été révélées [gi], [ee] et [ef]. Ces génotypes doivent aussi être testés comme la variété Naboute avec d’autres amorces.
- **La variété El Quoti** Tous les individus montrent le même profil [cd]. La répartition géographique n’a donc pas influencé sur le génome de cette variété.
- **La variété Massari** les individus présentent le même profil [ab]. Pour cette variété aussi, la répartition géographique n’a pas influencé sur le génome.

## 2.2. Amplification par l'amorce TO<sub>6</sub>A<sub>12</sub>

Tous les individus des quatre variétés montrent les deux mêmes allèles (Figure 18) sauf un seul individu, 13 de la variété Ghoudane, qui montre trois allèles.

Cette amorce est presque monomorphe pour tous les génotypes, elle ne donne pas d'informations supplémentaire que l'amorce MFC<sub>3</sub>. Elle permet juste de confirmer qu'il y a une variation intra-clonale chez la variété Ghoudane.

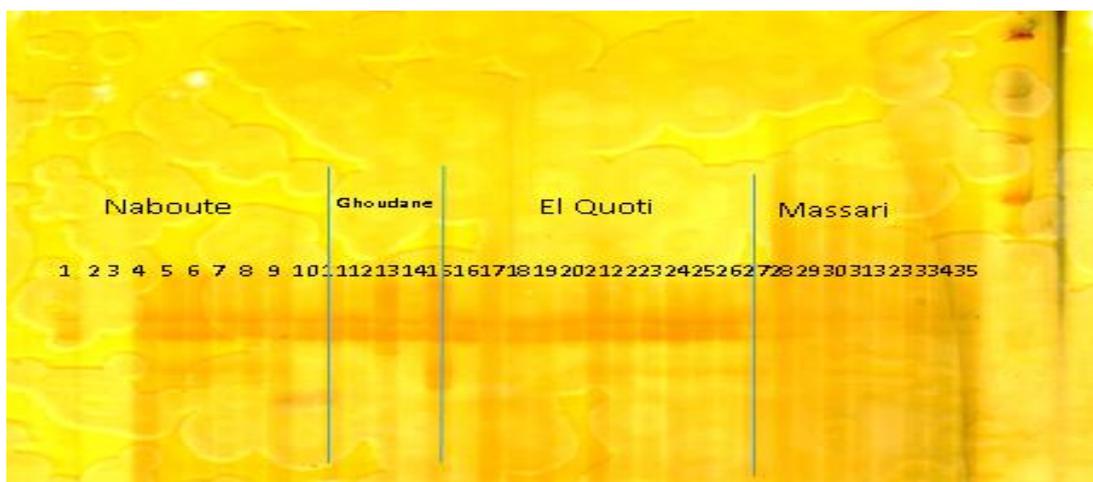


Figure 18 : Profils génomiques SSR générés par l'amorce TO<sub>6</sub>A<sub>12</sub>.

## 2.3. Amplification par l'amorce MFC<sub>11</sub>

L'analyse du gel de la Figure 19, permet de donner une information claire sur les individus de la variété Ghoudane, en confirmant le résultat des amorces précédente ; 11/12 et 14 présentent deux allèles alors que l'individu 13 en a trois. Cette variété montre une variabilité intra-clonale pour les trois amorces.

Les trois autres variétés présentent le même résultat de non variabilité observé avec l'amorce TO<sub>6</sub>A<sub>12</sub>.



Figure 19 : Profils génomiques SSR générés par l'amorce MFC<sub>11</sub> sur 35 génotypes

En rassemblant les résultats obtenues avec les trois amorces, on peut déduire que :

- La variété Ghoudane est une variété polyclonale. En effet sa forme pomologique confirme cette différence. Le fruit Ghoudane de l'ENAM est de forme globuleuse sphérique, par contre celui de Taoujdate est périforme.
- Les variétés Naboute, El Quoti et Massari sont des variétés monoclonales.

## **II. AUTHENTICITE D'UNE DESCENDANCE DE PLANTS DE FIGUIER**

### **1. TEST DE QUALITE DE L'ADN**

Avant l'amplification, un test de qualité d'ADN selon un gradient de température (Tableau 4) est effectué. Les résultats de la Figure 20, montrent que l'ADN est de bonne qualité et nous donnent idée sur la température idéale pour chaque amorce.

En se référant à la carte génétique, il est nécessaire de vérifier la validité de la population F1 issue du croisement entre P7 et P16. Le but étant d'analyser la fiabilité de F1 et de choisir un nombre suffisant d'individus à intégrer dans la carte génétique.

### **2. AMPLIFICATION DES AMORCES ISSR**

Parmi les 14 amorces qui révèlent un taux de polymorphisme intéressant entre les deux parents, sept sont utilisées pour le génotypage de tous les descendants (Tableau 5).

Les résultats de l'amplification des sept amorces (Annexe 5) ont permis de calculer la distance et la taille des bandes par le logiciel Mesorium. Une matrice binaire est établie, ensuite, sur la base de la présence (1) ou l'absence (0) des allèles afin de calculer les données.

D'après le tableau 7, un seul descendant illégitime a été démontré, dont le génotype est 308 pour le locus UBC 817. Cet individu présente une nouvelle bande (Figure 21) donc un nouvel allèle qui n'existe pas chez les parents. À part cette exception, les 54/49/51/52 et 53 individus analysés ont tous les mêmes allèles parentaux.

Ces données ont permis de présumer que les individus F1 sont les vrais descendants du croisement entre P7 et P16 sauf un seul individu. Cependant, un nombre limité d'amorces a été étudié, ce qui ne peut pas exclure la possibilité d'avoir d'autres individus illégitimes. Ces individus pourraient provenir de la contamination avec un autre pollen que celui des parents.

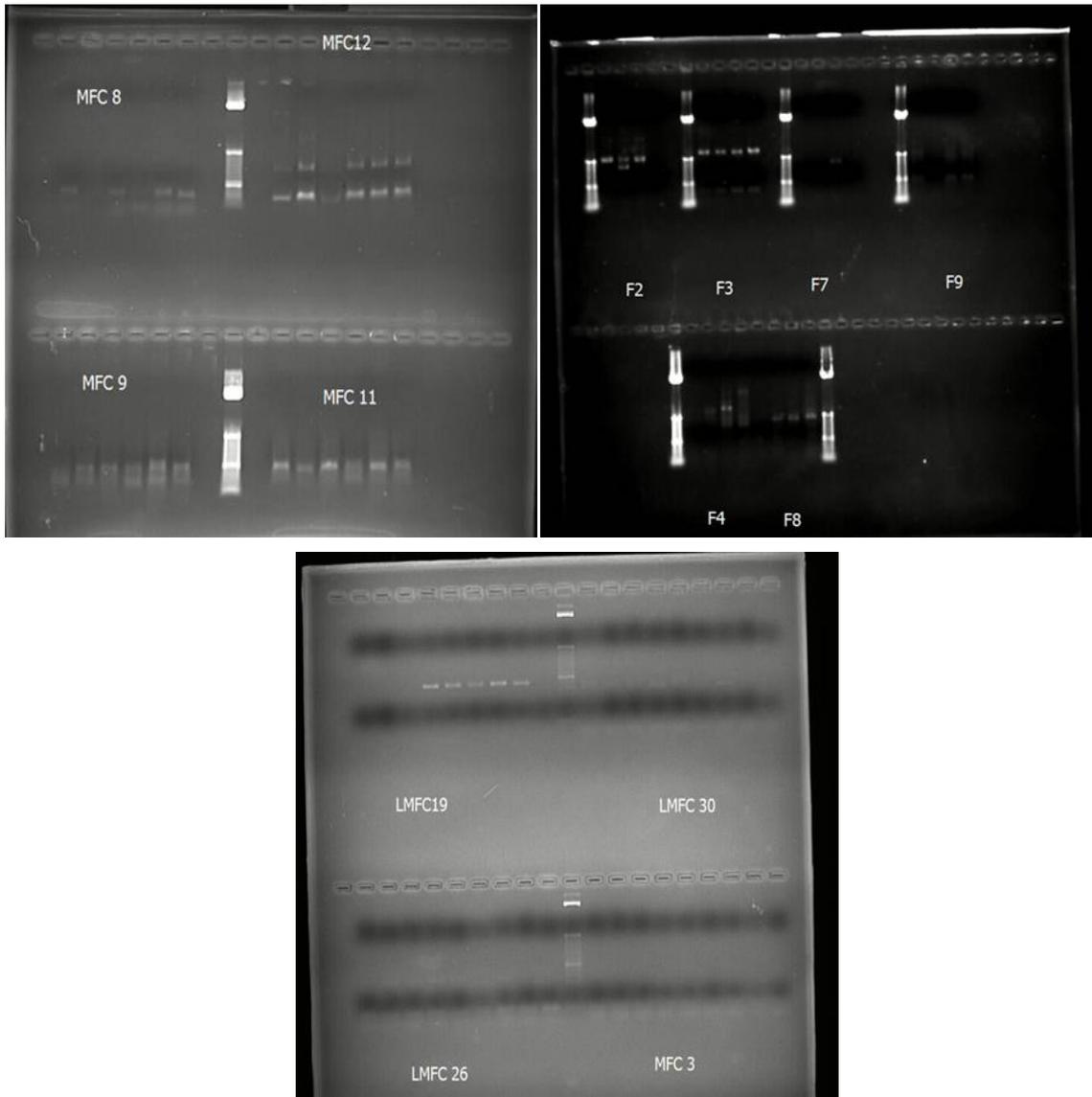


Figure 20 : Profils génomiques des tests de qualité d'ADN selon le gradient de température.

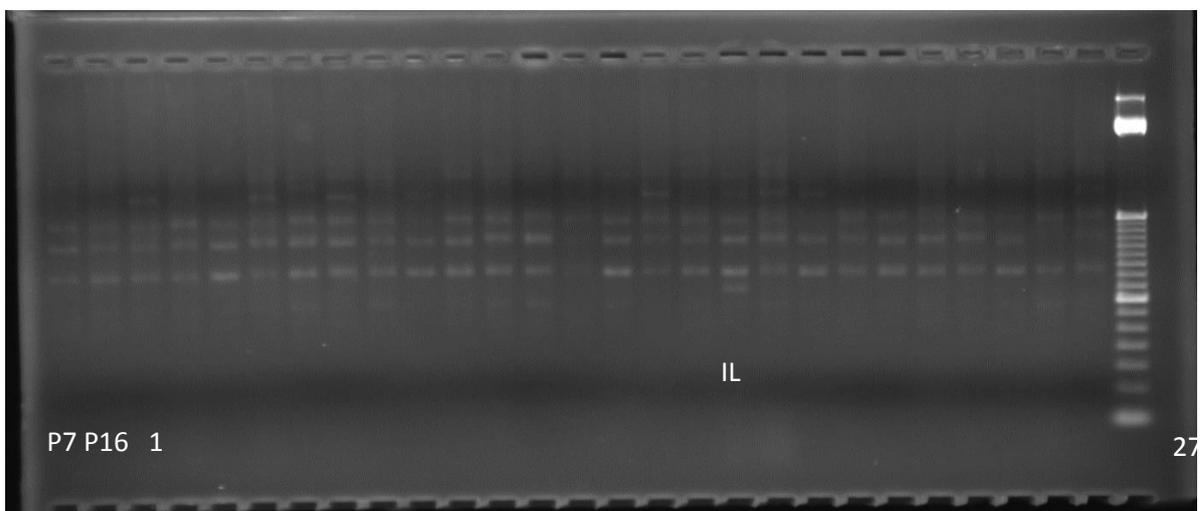


Figure 21 : Profil génomique ISSR du polymorphisme généré par l'amorce UBC817.  
Légende : IL : Individu illégitime avec la bande différente des parents. Descendants : de 1 à 27.

### 3. TEST DU $\chi^2$

D'après les résultats du (Annexe 6), tous les individus montrent des valeurs non significatives ; c'est-à-dire un  $\chi^2$  très inférieur à la théorie.

Exemple pour le premier individu :  $\chi^2 = 0.02$  avec un ddl = 53. Les valeurs théoriques de  $\chi^2$  présentées ci-dessous sont très éloignées du  $\chi^2$  calculés avec

$$\chi^2 = (\text{Observé} - \text{Théorique})^2 / \text{Théorique}$$

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
70.99	79.84	90.57

Ceci signifie qu'il n'y a pas de destruction de la ségrégation : la ségrégation allélique mendélienne est affichée chez tous les individus de ce croisement. Ces résultats confirment une autre fois que ces individus proviennent vraiment du croisement étudié (sauf un seul).

La matrice binaire réalisée a permis de calculer la similarité moyenne entre la population F1 qui peut être estimée de 67 %.

En général, le nombre de marqueurs ISSR générés, est corrélé positivement avec le nombre d'amorces utilisées. Cependant, ce nombre peut être plus influencé par l'espèce végétale analysée et par la nature du gel de migration utilisé (Nagaraju *et al.*, 2002; Wiesner et Wiesnerová, 2003).

### 4. TAUX DE POLYMORPHISME ET FREQUENCES ALLELIQUES

Le calcul du polymorphisme de chaque amorce étudiée (Tableau 8), a généré un total de 38 allèles ou bandes. Le polymorphisme moyen est ainsi calculé par le rapport fragments polymorphes/nombre total d'allèles. Ce taux de polymorphisme moyen est de l'ordre de 78 %.

**Tableau 8 : Polymorphisme d'ADN engendré par les ISSR**

Marqueur ISSR	Nombre total d'allèles	Allèles polymorphes	Pourcentage du polymorphisme (%)
UBC <sub>817</sub>	7	6	85,7
UBC <sub>818</sub>	7	5	71,43
F11	7	5	71,43
IMA <sub>5-3</sub>	4	4	100
IMA <sub>5-Z</sub>	7	6	85,7
ISSF1	4	3	75
UBC 841 <sub>Y-1</sub>	2	1	50
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>30</b>	<b>78</b>

**Tableau 7 : Nombre de descendants, ségrégation d'allèles et le test de destruction de ségrégation de sept amorces utilisées pour réduire la taille de la population**

Amorce	Génotype parents		Nbre de descendants	Nbre d'individus illégitime	Type de ségrégation	$\chi^2$
	P7	P16				
UBC 817 <sub>1633</sub>	0	1	54	1(308)	1 : 1	0.02*
UBC 817 <sub>1273</sub>	1	1	54	-----	3 : 1	0.09*
UBC 817 <sub>913</sub>	1	1	54	-----	3 : 1	5.17*
UBC 817 <sub>712</sub>	1	1	54	-----	3 : 1	7.72*
UBC 817 <sub>440</sub>	1	1	54	-----	3 : 1	13.72*
UBC 817 <sub>343</sub>	1	1	54	-----	3 : 1	1.524*
UBC 817 <sub>264</sub>	1	1	54	-----	3 : 1	2.39*
UBC 818 <sub>1924</sub>	1	1	49	-----	3 : 1	1.471*
UBC 818 <sub>1414</sub>	1	1	49	-----	3 : 1	6.28*
UBC 818 <sub>845</sub>	1	1	49	-----	1 : 1	1.59*
UBC 818 <sub>488</sub>	1	1	49	-----	1 : 1	0.23*
UBC 818 <sub>313</sub>	1	1	49	-----	3 : 1	0.059*
UBC 818 <sub>255</sub>	1	1	49	-----	3 : 1	0.059*
UBC 818 <sub>193</sub>	1	1	49	-----	3 : 1	0.654*
F 11 <sub>1451</sub>	1	1	51	-----	3 : 1	8.61*
F 11 <sub>1213</sub>	1	1	51	-----	3 : 1	1.07*
F 11 <sub>1032</sub>	1	1	51	-----	3 : 1	1.81*
F 11 <sub>770</sub>	1	1	51	-----	3 : 1	6.85*
F 11 <sub>622</sub>	0	1	51	-----	1 : 1	0.84*
F 11 <sub>526</sub>	0	1	51	-----	1 : 1	0.09*
F 11 <sub>400</sub>	1	1	51	-----	3 : 1	8.61*
IMA 5-3 <sub>613</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	0*
IMA 5-3 <sub>508</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	0*
IMA 5-3 <sub>388</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	1.2*
IMA 5-3 <sub>184</sub>	1	1	52	-----	1 : 1	0.61*
IMA 5-Z <sub>2548</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	0.025*
IMA 5-Z <sub>1125</sub>	0	1	52	-----	3 : 1	0*
IMA 5-Z <sub>640</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	8.9*2
IMA 5-Z <sub>504</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	2.99*
IMA 5-Z <sub>430</sub>	1	1	52	-----	1 : 1	15.46*
IMA 5-Z <sub>240</sub>	1	1	52	-----	3 : 1	2.99*
IMA 5-Z <sub>140</sub>	1	0	52	-----	1 : 1	3.29*
ISSF 1 <sub>1881</sub>	1	1	53	-----	3 : 1	1.03*
ISSF 1 <sub>1396</sub>	0	1	53	-----	1 : 1	0.68*
ISSF 1 <sub>958</sub>	1	1	53	-----	3 : 1	1.36*
ISSF 1 <sub>721</sub>	1	1	53	-----	3 : 1	4.42*
UBC 841 Y-1 <sub>597</sub>	0	1	53	-----	1 : 1	0.05*
UBC 841 Y-1 <sub>313</sub>	1	1	53	-----	3 : 1	5.83*

\* NS : Non significatif

En effet, ce pourcentage de bandes polymorphes mis en évidence par les amorces ISSR, chez le figuier se révèle moins important que chez *Asparagus acutifolius* L. (100 %) (Sica et al., 2005) et chez *Lupinus spp.* (99 %) (Talhinhas et al., 2003). Il est du même ordre que celui d'*Oryza sativa* (80.9 %) (Nagaraju et al., 2002), mais plus important que celui de *Bombyx mori* (64 %) (Pradeep et al., 2005).

En comparaison avec ces différents espèces, le figuier s'avère avoir un polymorphisme moyen relativement important.

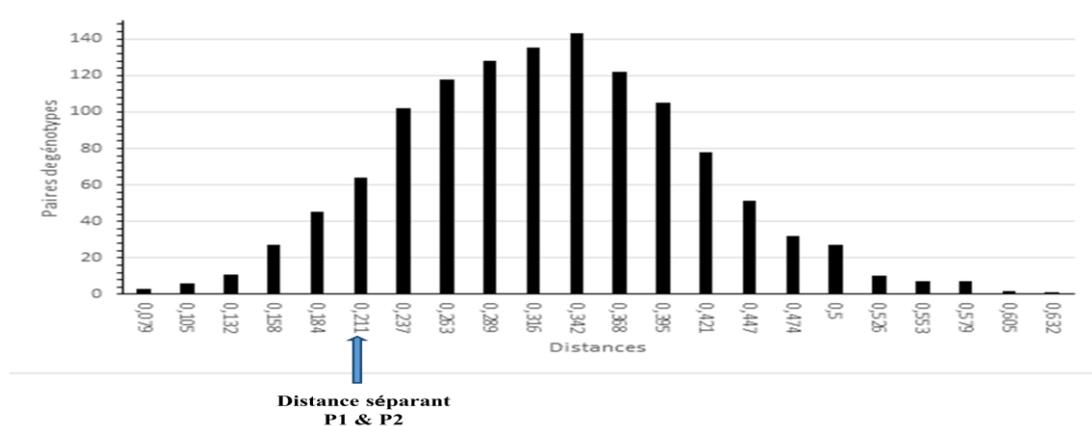
Les fréquences alléliques ont varié dans une fourchette de 0.079 et 0.632, avec une moyenne de 0.325.

Sur la base des résultats de l'amplification des différentes amorces ISSR et ceux du test du  $\chi^2$ , on peut déduire que :

- Il y a une diversité au sein des 54 descendants étudiés, déduite de la présence de différents types de bandes ;
- Une authenticité de la descendance est apparente puisque on a soupçonné un seul descendant illégitime ;
- Il n'y a pas de destruction de ségrégation d'après les résultats du test  $\chi^2$  ;
- Présence de diversité génétique large entre les différents descendants : provenant probablement de deux pools génétiques différents des deux parents correspondant à deux variétés différentes.

## 5. HISTOGRAMME DES DISTANCES

Une comparaison deux à deux des génotypes de la population hybride F1 sur la base des distances génétiques permet d'établir un histogramme (Figure 22). L'analyse de cet histogramme permet de constater que le croisement des parents hétérozygotes qui sont proches a élargi la diversité remarquée chez leurs descendants.



**Figure 22 : Histogramme présentant une diversité au sein de la population F1 par rapport aux distances en fonction des génotypes**

## 6. DENDROGRAMME UPGMA

Le dendrogramme résultant (Figure 23) a permis de distinguer deux grands groupes A et B ; qui incluent chacun 9 et 45 descendants respectivement. Chaque groupe rassemble les individus qui ont le plus grand nombre de bandes similaires donc une structure génétique plus proche. Les individus les plus proches sont rassemblés deux à deux dans cet arbre phylogénétique.

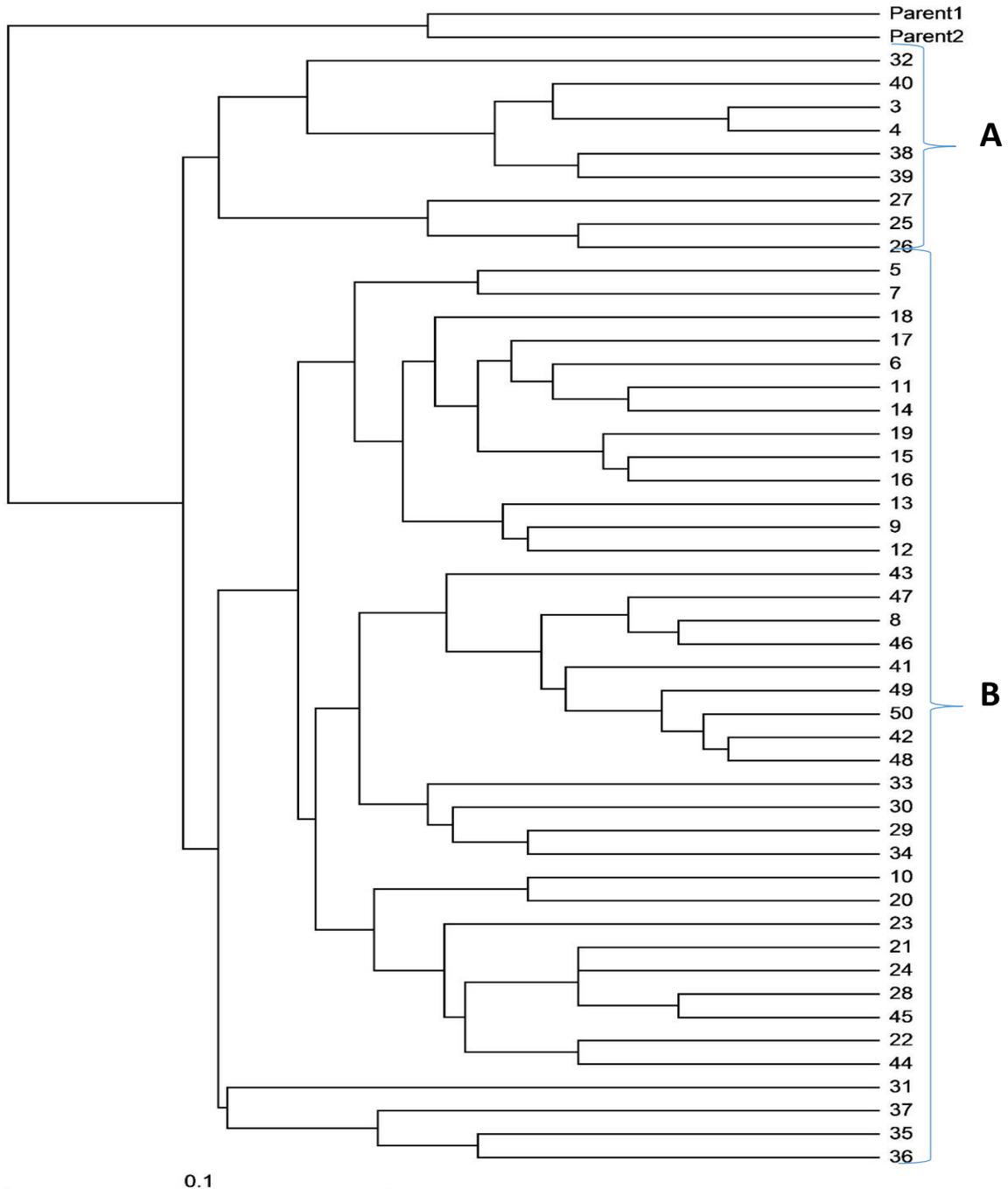


Figure 23 : Arbre phylogénétique basé sur la méthode UPGMA et le calcul de distance par Mesorium

La culture du figuier est toujours accompagnée d'une connaissance précise de variétés. En effet, la sélection variétale chez cette espèce s'effectue généralement dans les populations naturelles, et elle se base sur des caractères agronomiques (couleur des fruits, forme des figues, calibre, figues charnues, sucrée) et/ou technologique (aptitude au séchage, teneur en élevée en sucre ...). Dans les agro-écosystèmes des montagnes du nord marocain, le figuier représente une richesse variétale considérable en comparaison avec les autres arbres fruitiers comme l'olivier par exemple (Khadari et oukabli, 2005, Hmimsa et Ater, 2008). La diversité des conditions climatiques, les limites étroites entre le sauvage et le cultivé et la domestication locale ont permis au figuier d'acquérir cette richesse génétique.

Au Maroc, la culture du figuier est caractérisée par une conduite traditionnelle avec l'exploitation d'un matériel végétal hétérogène, constitué de variétés avec des dénominations locales attribuées selon les zones de culture ou relatives aux critères du fruit (couleur, forme, ...). Plusieurs variétés sont aisément reconnaissables par leurs caractéristiques pomologiques, alors que pour d'autres, la distinction reste confuse (Oukabli, 2003)

Cette présente étude montre que l'utilisation des marqueurs microsatellites et des ISSR est un outil fiable pour l'identification variétale du figuier en permettant la détection d'un niveau de diversité génétique large et une différenciation entre les génotypes des différentes régions de récolte. En effet, les deux types de marqueurs sont complémentaires entre eux.

L'identification moléculaire des 35 génotypes de différentes régions a permis de résoudre un problème très récurrent dans la culture du figuier, qui est lié à la synonymie et l'homonymie. Tout en s'assurant de la dénomination de chaque variété.

L'analyse moléculaire des descendants issus du croisement entre "Ksbat SKHIRAT" et "Ferqouch JMEL 2226" a démontré la fiabilité de la méthode de croisement utilisée chez le figuier, car les descendants obtenus ont le même pool génétique des parents. Ce qui élimine la possibilité de contamination de pollen étranger ou l'échec de la méthode du croisement.

D'après notre étude, la collection de Taoujdate possède un potentiel génétique important qui peut être considérée comme une richesse en matière de diversité génétique du figuier.

Les résultats obtenus au terme de ce travail nous poussent à recommander ce qui suit :

- Choisir un seul génotype des quatre variétés étudiées, qui est le plus représentant selon les résultats et approfondir l'étude par la caractérisation pomologique du fruit.
- Faire une étude de comparaison avec les collections de référence de l'INRA, pour s'assurer des dénominations différentes des variétés.
- Faire des études de caractérisation moléculaire à l'aide d'autres amorces, sur les descendants du croisement étudié et surtout de celui soupçonné être illégitime.

Rapport-Gratuit.com

- **Achtak H., M. Ater, A. Oukabli, S. Santoni, F. Kjellberg et B. Khadari (2009).** Microsatellites markers as reliable tools for fig cultivar identification. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 134: 624-631.
- **Achtak H., M. Ater, A. Oukabli, S. Santoni, F. Kjellberg et B. Khadari (2009).** Domestication et diversification variétale chez le figuier au Maroc : bases pour la conservation et la valorisation des ressources génétiques locales. *Thèse de doctorat, Centre International d'Etudes supérieures en Sciences Agronomiques. Sup-Agro, Montpellier, 146p.*
- **Achtak H., M. Ater, A. Oukabli, S. Santoni, F. Kjellberg et B. Khadari (2010).** Traditionalagro-ecosystems as conservatories andincubators of cultivated plant varietal diversity: the case of fig (*Ficus carica*L.) in Morocco.*BMC (Bio Med Central) Plant Biology*.
- **AitHaddou L., A. Blenzar, Z. Messaoudi, P. Van damme, F. Zindedine et A. Sakhaoui (2013).** Caractérisation pomologique de 22 génotypes du figuier (*Ficus carica L.*) au Maroc. *European journal of scientific research*, vol. N° 3, Pp 416-428.
- **Belkhir K., H. Santos, J. Rousselet, et C. Kerdelhué (1999).** Genetix. *Logiciel sous Windows pour la Génétique Analysis de la population. CNRS UPR 9060, Université de Montpellier, France.*
- **Bouche G. (1999).** Guides complets de la culture du figuier. *Edition de Vecchi. P. 121-125.*
- **Cabrita F.L., U. Aksoy, S. Hepaksoy, J. M Leito (2001).** Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica L.*) clones. *Scientia Hort.*, 87: 261-273.
- **Charafi J. (2011).** Caractérisation pomologique et moléculaire pour l'identification des génotypes en collection n°3 du figuier au domaine Ain Taoujdate (INRA-Meknès). *Mémoire de titularisation. INRA. Rabat 57p.*
- **Charafi J., A. Zine El Aabidine C. Grout, B. Rahioui, A. El Meziane, A. Moukhli, B. Boulouha, C. El Modafar & B. Khadari (2009).** A Genetic Linkage Map of *Olea europaea L.* Using a Pseudo-Test Cross- Mapping Strategy Based on SSR, AFLP, ISSR, RAPD and SCAR Markers. *Acta Hort.* 814 p.
- **Charafi J., B. Rahioui, A. El Meziane, A. Moukhli, B. Boulouha, C. El Modafar, B. Khadari (2007).** Diversité génétique de l'olivier au Maroc et cartographie génétique de la population hybride F Picholine marocaine x picholine de Languedoc : Base pour l'amélioration variétale.

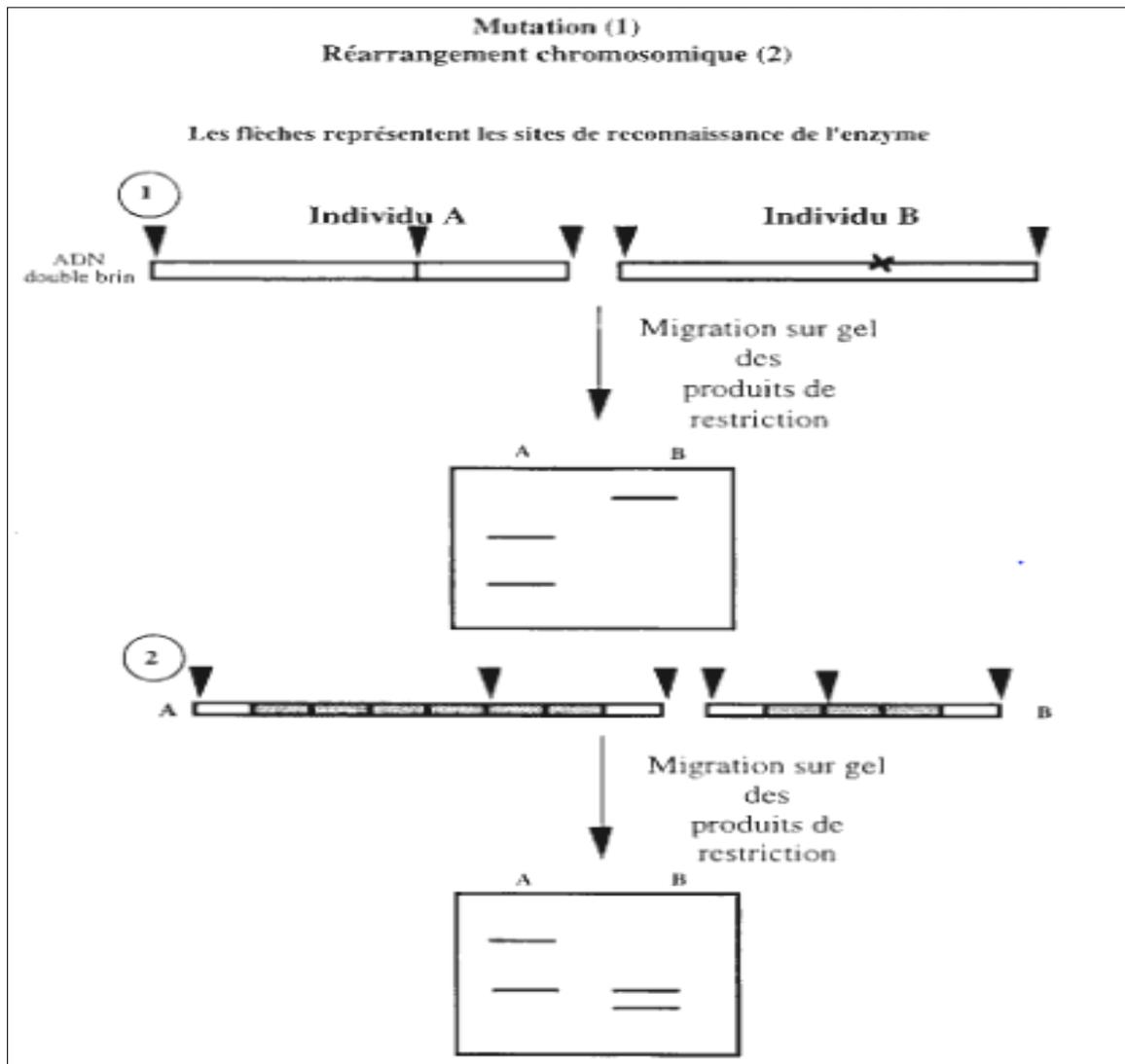
- **Charafi J., B. Rahioui, A. El Meziane, A. Moukhli, B. Boulouha, C. El Modafar, B. Khadari (2008).** Menara gardens: a Moroccan olive germ plasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. *Genetic Resource Crop Evolution* 55: 893–900.
- **Condit I.J. (1955).** Fig varieties: a monograph. *Ed. Hilgardia, a Journal of Agricultural Science, California Agricultural Experimental Station, 11: 323- 538.*
- **Culley T.M. et & A.D. Wolfe (2000).** Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola (Violaceae)*, as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity, 86:545-556.*
- **De vienne D. et Santoni (1998).** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales », INRA, ISBN : 2-7380-0776-7.
- **Hmimsa Y. et M. Ater (2008).** Agrodiversity in the traditional agro-systems of the Rif's mountains (North of Africa). *Biodiversity, 9: 78-81.*
- **Ikegami H., H. Nogota, K .Hirashima, M. Awamura et T. Nakahara (2009).** Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genetic Resources Crop Evolution.*
- **Khadari B, I. Hochu, S. Santoni, F. Kjellberg (1994).** Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.): Utilisation des marqueursRAPD. Quel avenir pour l'amélioration génétique .*Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Euro text. Paris O 1994, pp. 399-412.*
- **Khadari B. (2002).** Approche moléculaire de l'identification chez le figuier : bases pour la conservation et la certification. *Journée figuier, INRA, Meknès le 27 juin.*
- **Khadari B. et A. Oukabli (2002).** Actes de la journée du figuier : Potentialités et perspectives de développement de la figue sèche au Maroc, INRA Meknès.
- **Khadari B., P. Lashermes, F. Kjellberg (1995).** RAPD finger printing for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *Journal of Genetic Breeding, 49: 77-86.*
- **Khadari B., I. Hochu, S. Santoni, F. KJellberg (1995).** Etude de mutualisme figuier pollinisateur : réceptivité femelle, pollinisation et marqueurs génétiques. Thèse de doctorat, INA-PG. Paris. 123p.
- **Khadari B., I. Hochu, S. Santoni, F. KJellberg (2003).** The use of microsatellites markers for identification and genetic diversity evaluation of the fig collection in CBPNMP. *Act Hort, 605: 69-75.*

- **Khadari B., I. Hochu, S. Santoni, F. Kjellberg (2004).** Molecular characterization of Moroccan fig germ plasm using Inter Simple Sequence Repeat and Simple Sequence Repeat markers to establish a reference collection. *Hort Science*, 40:29-32.
- **Khadari B., S. Hochu, Santoni, A. Oukabli, M. Ater, J.P Roger, F. Kjellberg (2003).** Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. *Acta Horticulturae*.
- **Oukabli A., A. Mamouni, M. Laghezali, M. Ater, B. Khadari, J. P. Roger, F. Kjellberg (2003).** Genetical variability in Moroccan fig (*Ficus carica* L.) based on morphological and pomological data. *Acta Horticulturae*.
- **Oukabli A., A. Mamouni, M. Laghezali, B. Khadari, J.P. Roger, F. Kjellberg, M. Ater (2003).** Genetic Variability in Moroccan Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) Based on Morphological and Pomological Data. *Proc. IInd IS on Fig Eds. M. López Corrales & M.J. Bernalte García Acta Hort. 605, ISHS*.
- **Oukabli A. (2007).** Le figuier : Un patrimoine génétique diversifié à exploiter. INRA Meknès.
- **Oukabli A., S. Ahmed, D. A. Dawson, S. G. Compton, P. M. Gilmartin (2007).** Characterization of microsatellite loci in the African fig *Ficus sycomorus* L. (Moraceae). *Molecular Ecology Notes*: 1175–1177.
- **Oukabli A. et al. (2008).** Fiche Technique : Figuier, INRA Meknès.
- **Khaloui M. (2010).** Valorisation de la figue au Maroc. Transfert de technologies en agriculture, 186p.
- **Oukabli A. (2012).** Le figuier variétés performantes et techniques de conduite. INRA Meknès.
- **Roger J. P. (2000).** Identification variétale d'une espèce méconnue: Le Figuier. *Rapport interne, Conservatoire Botanique Nationale, France*.
- **Vidaud, J. 1997.** Le figuier, monographie. *Editions CTIFL, 263p*.
- [www.FAOSTAT.com](http://www.FAOSTAT.com), Juin, 2014.

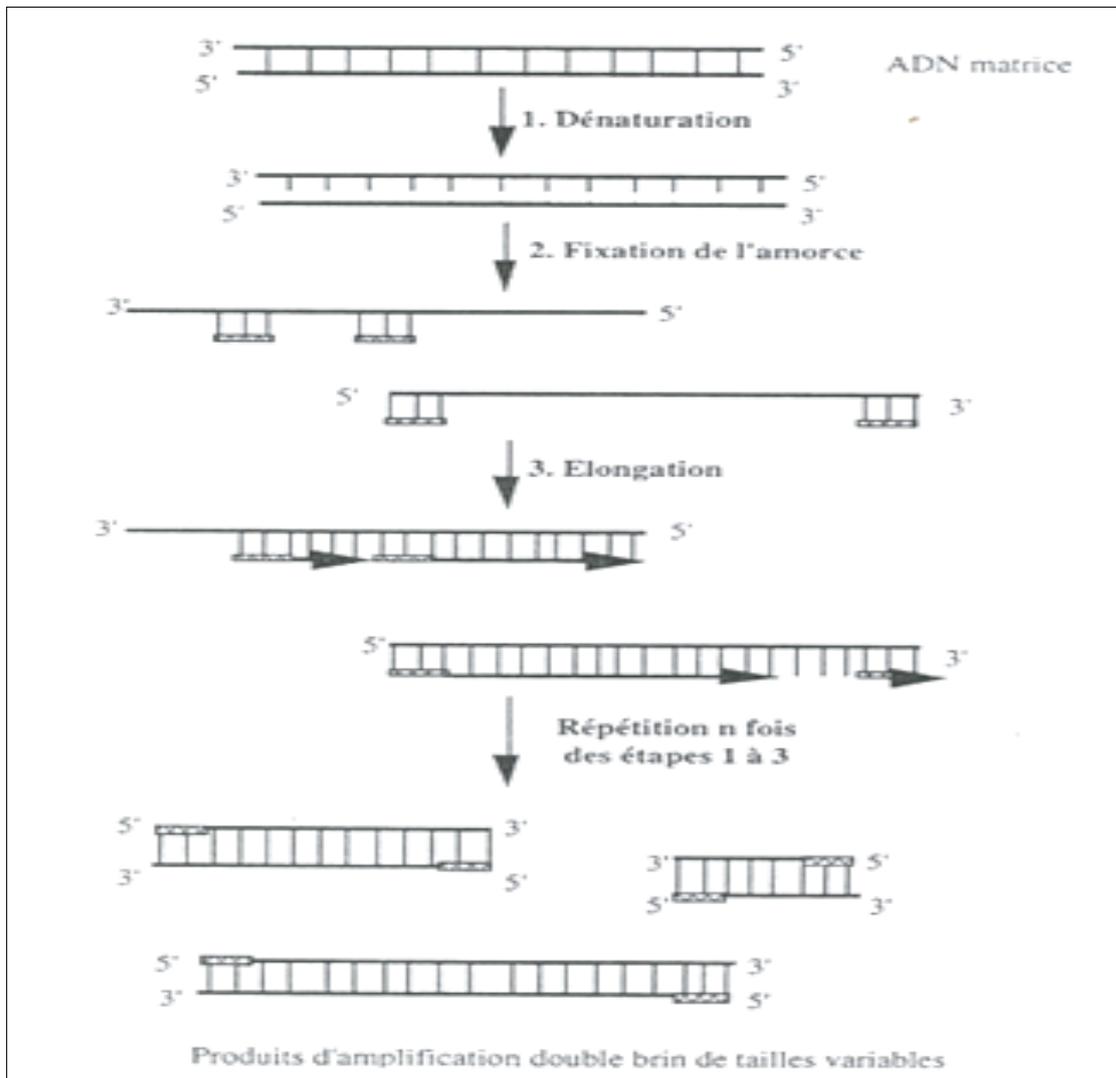
## Annexe 1

### Techniques de biologie moléculaire

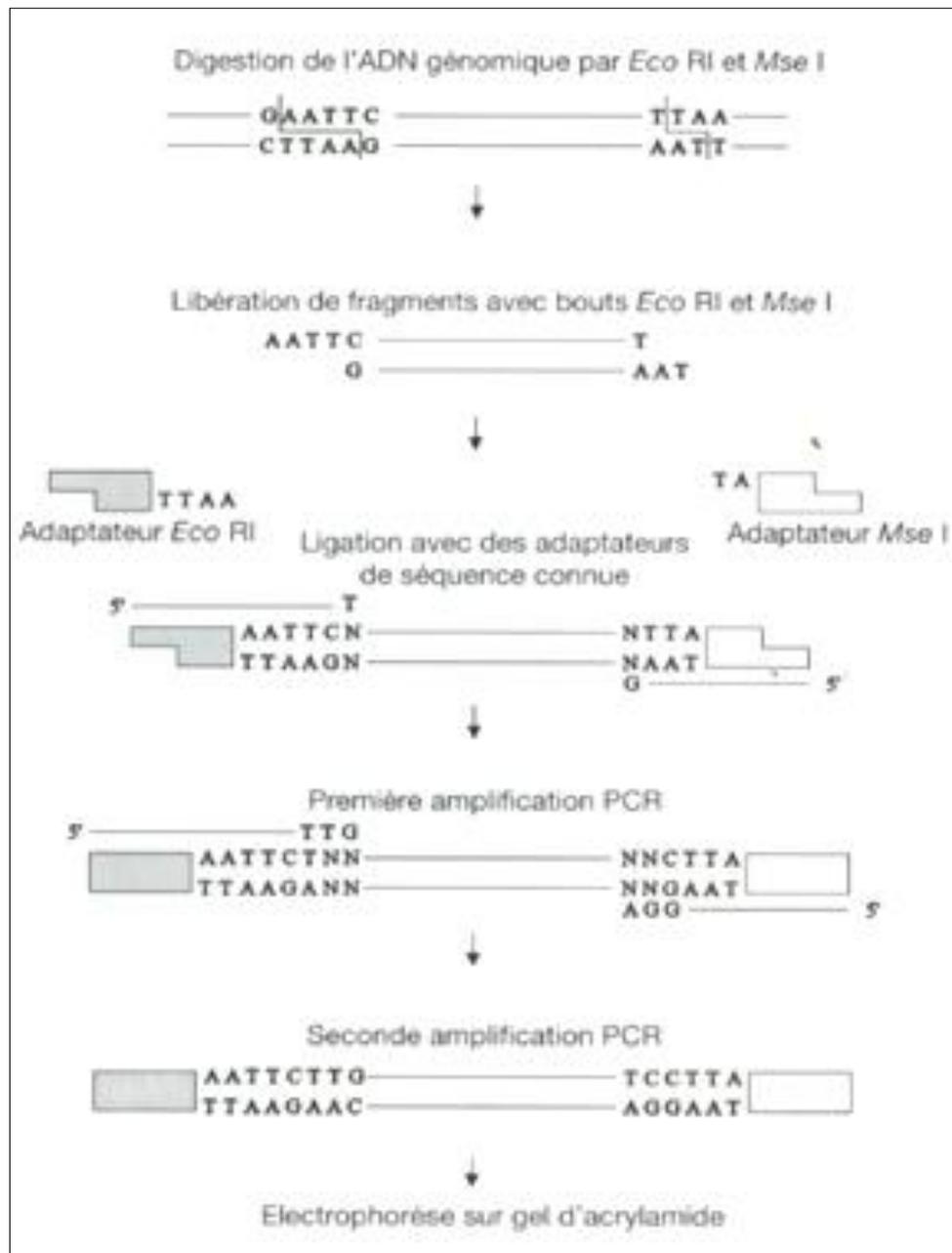
1a : Principe de la technique Polymorphisme de fragments de restriction (Tagu, 1999).



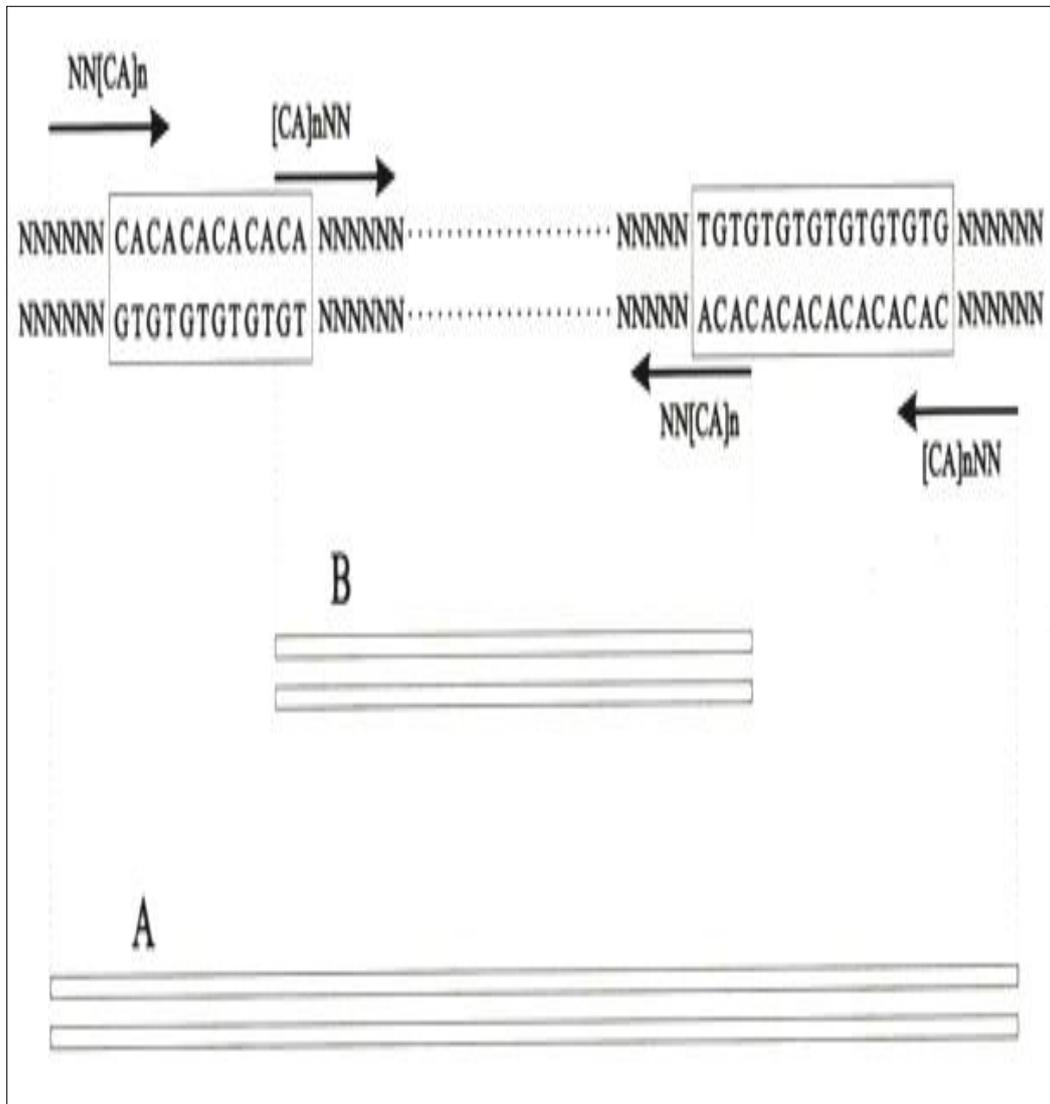
**1b : Principe du Polymorphisme de l'ADN par Amplification aléatoire**  
 (Tagu, 1999)



## 1c : Mécanisme du Polymorphisme de longueurs de fragments amplifiés (Tagu, 1999)



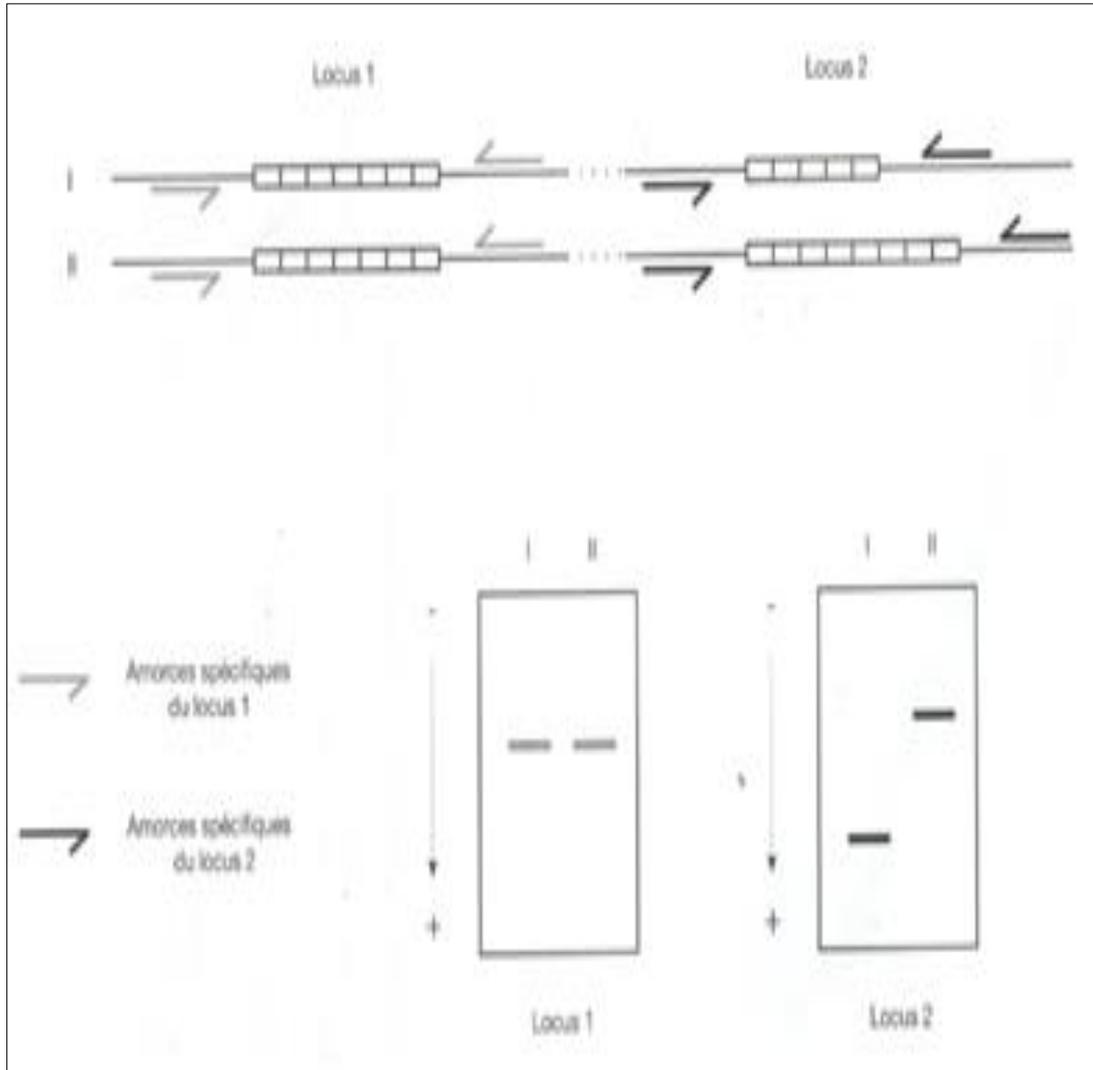
## 1d : Principe de la technique ISSR (Tagu, 1999)



Si les bases arbitraires de l'amorce sont du côté 5', on obtiendra le produit d'amplification A.

Si elles sont du côté 3', on obtiendra le produit d'amplification B

**1e : Révélation du polymorphisme des microsatellites par "PCR ciblée"**



## Annexe 2

### Préparations des solutions

#### 1-Préparation du tampon d'extraction CTAB (100ml)

1. Tris (1M) PH=8 : 10ml
2. EDTA (0.5M) PH=8 : 4ml
3. NaCl : 8.2g
4. CTAB : 2g
5. PVP 40000 (Poly-Vinylpirrolidone) : 0.5 g
6. Na-Bisulfate (Sodium di-sulfite) : 0.2g
7.  $\beta$ -mercaptoethanol (solution toxique) : 20 $\mu$ l  
dH<sub>2</sub>O : 86ml

} Ces 2 solutions doivent être ajoutées lors de l'utilisation

#### 2-Préparation de la solution chloroforme/iso-amylque (24/1)

Pour 100ml il faut additionner 96ml de la solution chloroforme à 4ml de la solution iso-amylque. C'est deux solutions sont toxiques.

Ensuite, on réalise une dilution des échantillons d'ADN préalablement extrait, afin d'estimer la quantité d'ADN par lecture au spectrophotomètre.

**Annexe 3**  
**Les conditions d'amplification par Ahtak 2009**

**1-Mixte réactionnel des SSR : (quantités pour un seul échantillon en  $\mu$ l)**

1. Eau ultra pure : 13.07
2. Tampon (x10) : 2.5
3. MgCl<sub>2</sub> : 1.5
4. dNTP : 2
5. Amorce : 2.5
6. Taq polymérase : 0.3
7. ADN : 2.5

**2-Mixte réactionnel des ISSR : (quantités pour un seul échantillon en  $\mu$ l) :**

1. Eau ultra pure : 14.55
2. Tampon (x10) : 2.5
3. MgCl<sub>2</sub> : 0.75
4. dNTP: 2
5. Amorce: 2.5
6. Taqpolymérase : 0.2
7. ADN : 2.5

## Annexe 4 Protocole d'utilisation du gel acrylamide

### GEL D'ACRYLAMIDE 6%

#### I PREPARATION DES PLAQUES

##### 1 Préparation de la plaque à encoches

Faire tremper la plaque où se trouve fixé le gel dans une solution de NaOH 2 N (le gel doit se détacher de la plaque sans intervenir)

Laver au détergent, rincer

Laver à l'alcool

Mettre la plaque sous la hotte

Faire la solution de liaison dans un microtube de 1,5 ml

Bind Silane	3 µl	} 2 tubes
Alcool 95°	1 ml	
Acide Acétique 100%	5 µl	

Mélanger

Répartir ce mélange sur la plaque essuyer avec un papier Kimwipes

Laisser sécher 5 minutes

Laver 3 fois avec de l'éthanol à 95° et changer de sens à chaque lavage, essuyer.

Laisser sécher 15 minutes

##### 2 Préparation de la plaque longue

Laver la plaque siliconée à l'eau puis à l'alcool à 95°

Vérifier qu'elle est bien siliconée (sinon appliquer 2 ml de Signacote de Sigma) laisser sécher 5 min sous la hotte et rincer à l'eau et à l'alcool

Placer les espaceurs

Positionner la plaque à oreillette face traitée au Bind Silane sur les espaceurs

Mettre les 6 pinces pour fixer les plaques et vérifier le niveau

#### II PREPARATION DE LA SOLUTION DE GEL D'ACRYLAMIDE 6 % (20:1 acrylamide : bis, 7,5 M urée ; Tampon TBE 1X)

URÉE	45 g	125	x3	135 g
ACRYLAMIDE	15 ml de solution à 40%	75		45 ml
TBE 5 X	20 ml	100		60 ml
H <sub>2</sub> O distillée	qsp 100 ml	500		300 ml

Mélanger

Filter avec un filtre de 0,22 µm

Mettre au froid pendant 15 minutes environ pour éviter une polymérisation trop rapide (on peut en faire une plus grande quantité et la conserver au froid)

#### III COULAGE DU GEL

75 ml	Gel d'acrylamide 6 %	100 ml	80 ml	100 ml	1,5
60 µl	TEMED	80 µl	80	11 µl	20 ml
300 µl	Persulfate ammonium 10 %	600 µl	400	pl	20 µl

Mélanger sans faire de bulles

On coule en ayant incliné légèrement les plaques, verser le gel de façon homogène sur la partie supérieure de la plaque longue, jusqu'à ce qu'il arrive à la partie inférieure de la plaque, remettre les plaques à niveau et mettre le peigne de coulage (mettre un masque pour éviter les éventuelles projections). Mettre des pinces au niveau de la ligne de base et laisser polymériser 1 heure. On laisse le reste de gel polymériser dans le bécher pour témoin.

(Si on n'utilise pas le gel le jour même, envelopper les plaques de saran wrap et mettre au réfrigérateur ou laisser sur la paille si la pièce est chloroformée)

#### IV INSTALLATION DU GEL SUR LA CUVE

Les plaques sont bien nettoyées à l'eau osmosée. On enlève le peigne de coulage et on élimine l'acrylamide polymérisée qui peut rester à l'emplacement du peigne de coulage. Positionner les plaques sur la cuve, plaque à encoches à l'intérieur, les fixer avec des pinces, mettre la barre en plexiglas et visser légèrement (si fuite, visser plus fort).

Verser 1,5 litres de TBE 1X dans le bac supérieur (attendre quelques minutes pour voir s'il n'y a pas de fuite dans le bac inférieur) et 0,5 litres dans le bac inférieur (le volume varie suivant les cuves)

Pour les AFLP on ajoutera dans la solution du bac inférieur 34 g d'acétate de sodium.

Éliminer avec une seringue l'urée ainsi que les bulles. Mettre les couvercles et relier au générateur.

#### V PRE-RUN

Rentrer les valeurs limites du générateur 3000V et 300mA.

Mettre sous tension à 60 W puissance constante afin d'atteindre la température de 50° au niveau des plaques environ 1 heure

#### V PREPARATION DES ÉCHANTILLONS

20 µl	amplification		
20 µl	( Load Sequencing Blue )	Formamide	50 ml
		Xylène Cyanol	50 mg
		Bromophénol	50 mg
		EDTA 0,5 M PH 8.0	1 ml

- Dénaturer les échantillons 5 minutes à 95 ° ainsi que le marqueur de taille et mettre dans la glace

#### VI DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS

Une fois le pré run terminé nettoyer la ligne de base avec une seringue remplie de tampon, placer le peigne à dents de requin d'un millimètre environ dans le gel.

Pour un peigne de 68 dents : dépôt maxi de 4 µl

Pour un peigne de 46 dents : dépôt maxi de 6 µl

#### VII MIGRATION

La migration se fait à 60 W, le temps de migration dépend du marqueur utilisé

#### VIII SOLUTIONS DE COLORATION À L'ARGENT

Solution de fixation (Acide acétique glacial à 10 %)

200 ml	Acide acétique
1800 ml	H <sub>2</sub> O ultra pure

Mélanger

Solution de coloration (Nitrate argent)

2g (1 sachet)	Nitrate argent
2000 ml	H <sub>2</sub> O ultra pure

Agiter et mettre le récipient au réfrigérateur

Au dernier moment ajouter une ampoule de Formaldéhyde à 37 % et agiter.

Solution de révélation

60g (1 sachet)	Carbonate de sodium
2000 ml	H <sub>2</sub> O ultra pure

Agiter et mettre le récipient au réfrigérateur.

Au dernier moment ajouter une ampoule de formaldéhyde à 37 % et 400 µl de thio sulfate de sodium (10 mg/ml)

Agiter



## IX COLORATION A L'ARGENT

### Fixation du gel

Une fois la migration terminée, enlever les plaques du support et décoller la plaque courte avec le gel de la plaque longue

Mettre le gel (plaque) dans un bac en plastique avec la solution de fixation à l'abri de la lumière

Agiter pendant 30 minutes, garder la solution de fixation pour l'arrêt de la coloration

Rincer 3 fois pendant 2 minutes dans 3 bacs contenant chacun 2 L d'eau ultra pure froide

A chaque sortie de bac laisser égoutter 5 à 10 secondes

### Coloration du gel

Mettre le gel ( plaque ) dans un bac en plastique avec la solution de nitrate d'argent à l'abri de la lumière

Agiter pendant 30 minutes

Rincer le gel dans un bac contenant 2 L d'eau ultra pure froide pendant 5 à 10 secondes maximum .Ce temps est très important .

### Révélation du gel

Répartir le carbonate de sodium dans 2 bacs en plastique

Mettre le gel dans le premier bain en agitant jusqu'à l'apparition des premières bandes

Mettre le gel dans le deuxième bain de bicarbonate de sodium, jusqu'à la révélation complète des bandes

Ajouter la solution d'acide acétique pour arrêter la révélation

Rincer dans un bac d'eau ultra pure et faire sécher le gel

### PRODUITS

Acrylamide-bisacryl solution 19-1 40%	Ref: BIAC1902	Qbiogene
Urée	Ref: UREA01KG	Qbiogene
Kit Silver sequence Staining Reagent	Ref: 4132	Proméga
Temed	Ref: T 9281	Sigma
Signacote	Ref: SL-2	Sigma
Sodium carbonate	Ref: S 1641	Sigma
Sodium thiosulfate	Ref: S 7143	Sigma
Formaldéhyde 37%	Ref: 104003	Merck
Acide acétique	Ref: 401422	Carlo Erba
Acétate de sodium-3-hydrate	Ref: 25022	Riedel-de-Haën

### SOLUTIONS

TBE 5X	210g 137,5g 100 ml 5 litres	trisma base acide borique EDTA 0,5M pH8 H2O mQ qsp
TBE 1X	400 ml 2 litres	TBE 5X H2OmQ qsp

APS 10 %	100 mg 1 ml	Ammonium persulfate H2O mQ qsp
(se conserve à 4 ° C, 15 jours max)		
NaOH 2 N	160 g 2 litres	Sodium hydroxide H2O osmosée qsp
Marqueur 30-330	10 µl 60 µl	30-330 pb AFLP DNA Ladder LSB
(se conserve à - 20 °)		
H2O mQ	10 litres à 4 ° C	

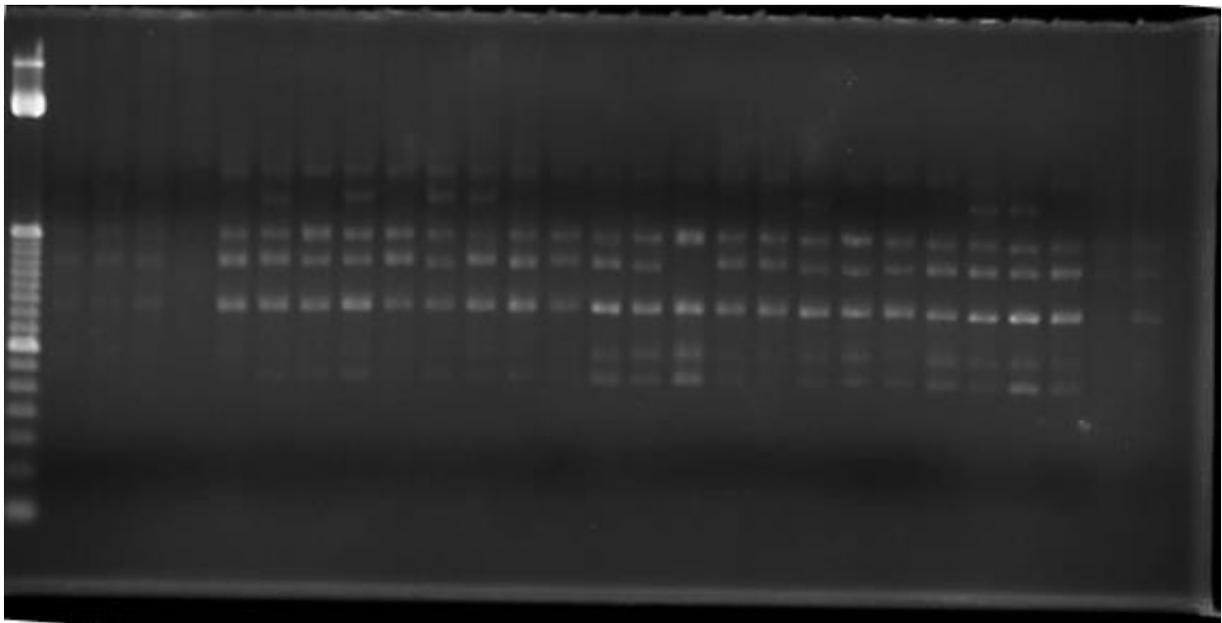
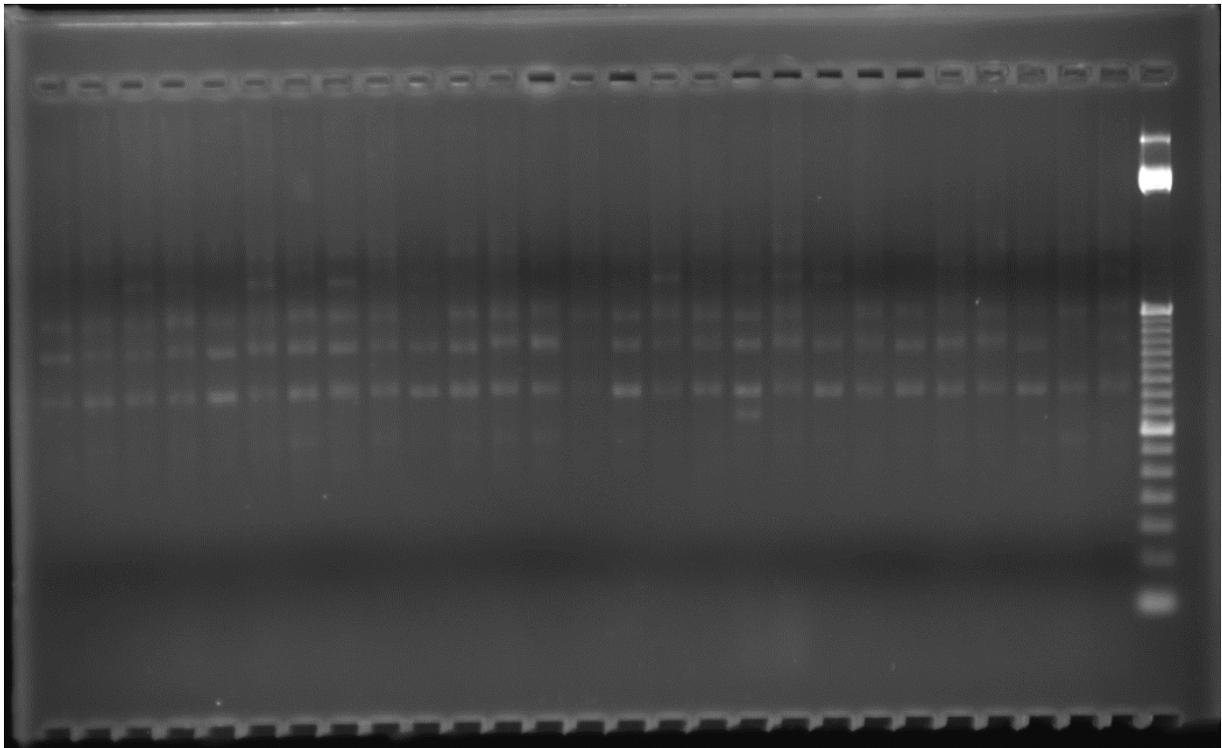
### NITRATE D'ARGENT plus utilisable

La solution de nitrate d'argent peut être utilisée 4-5 fois (conserver au réfrigérateur). Quand elle n'est plus utilisable, ajouter une spatule de NaCl pour faire précipiter l'argent. Laisser décanter, puis filtrer cette solution (jeter l'eau et mettre le papier filtre dans le récipient de déchets prévu pour l'argent).

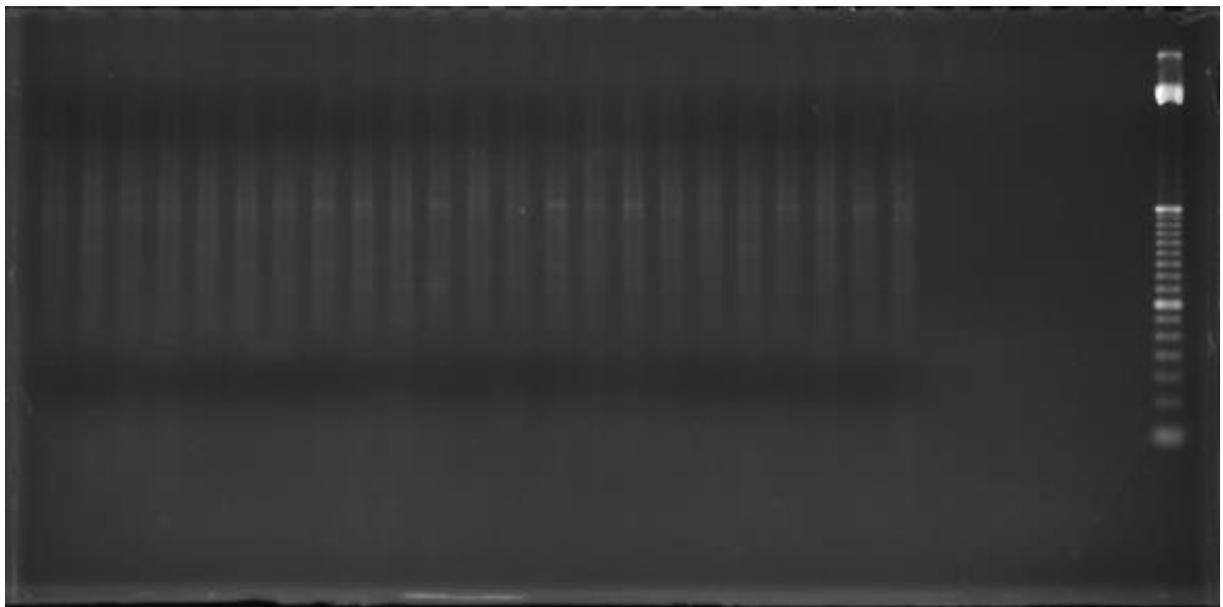
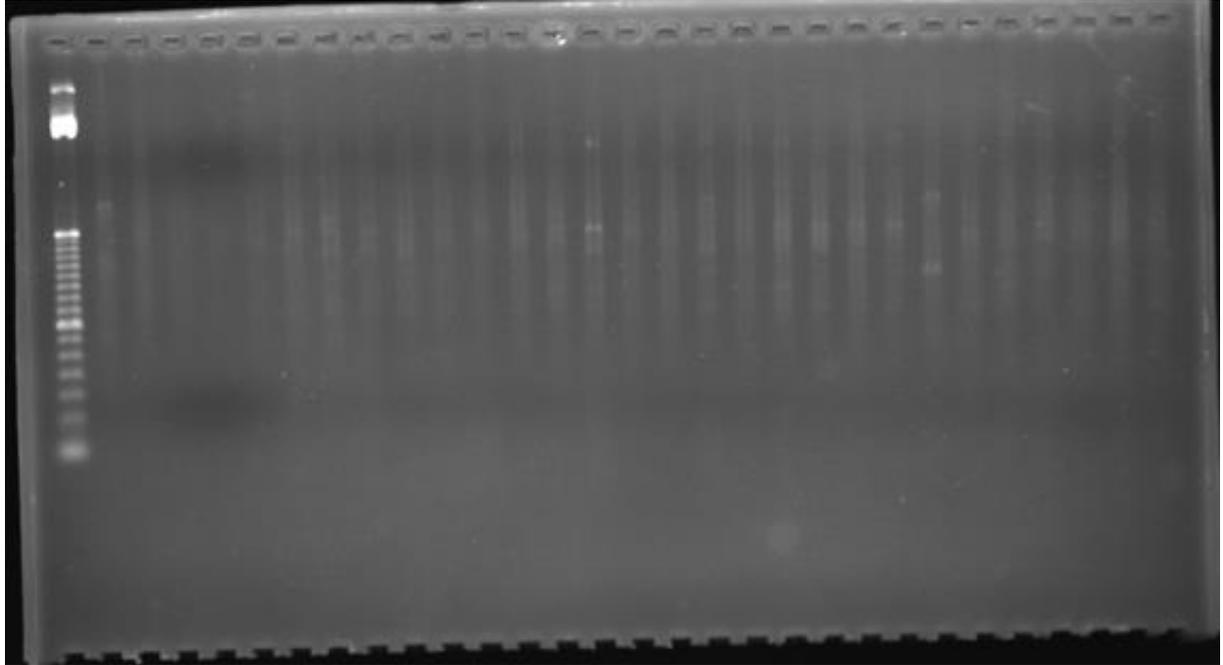
### C.Borries

**Annexe 5**  
**Résultats d'amplification des sept amorces sur gel d'agarose**

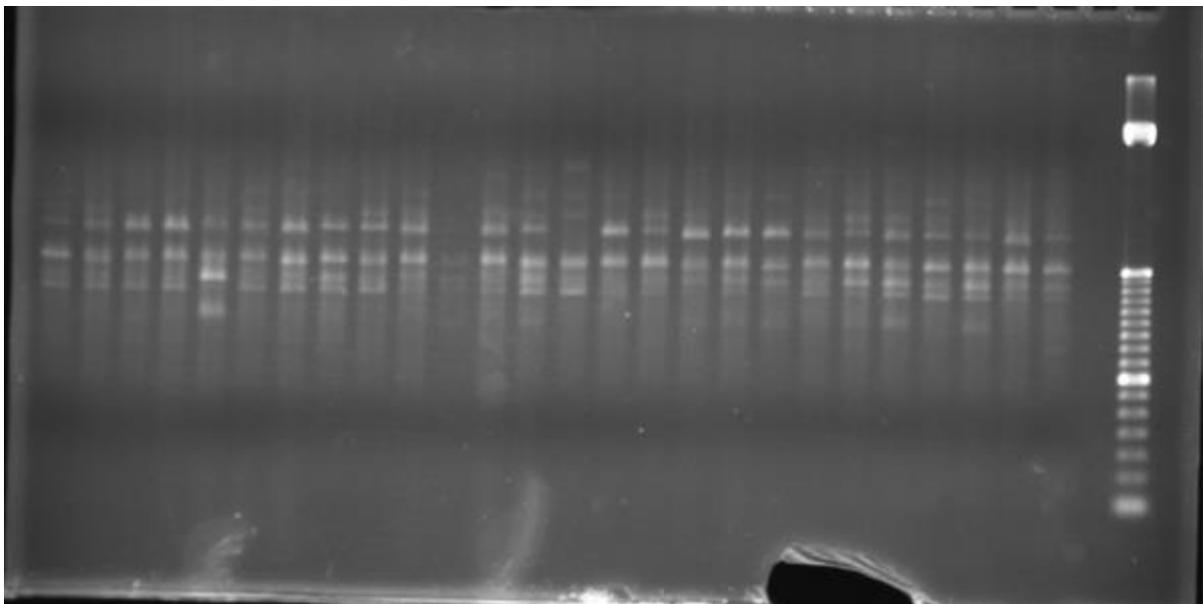
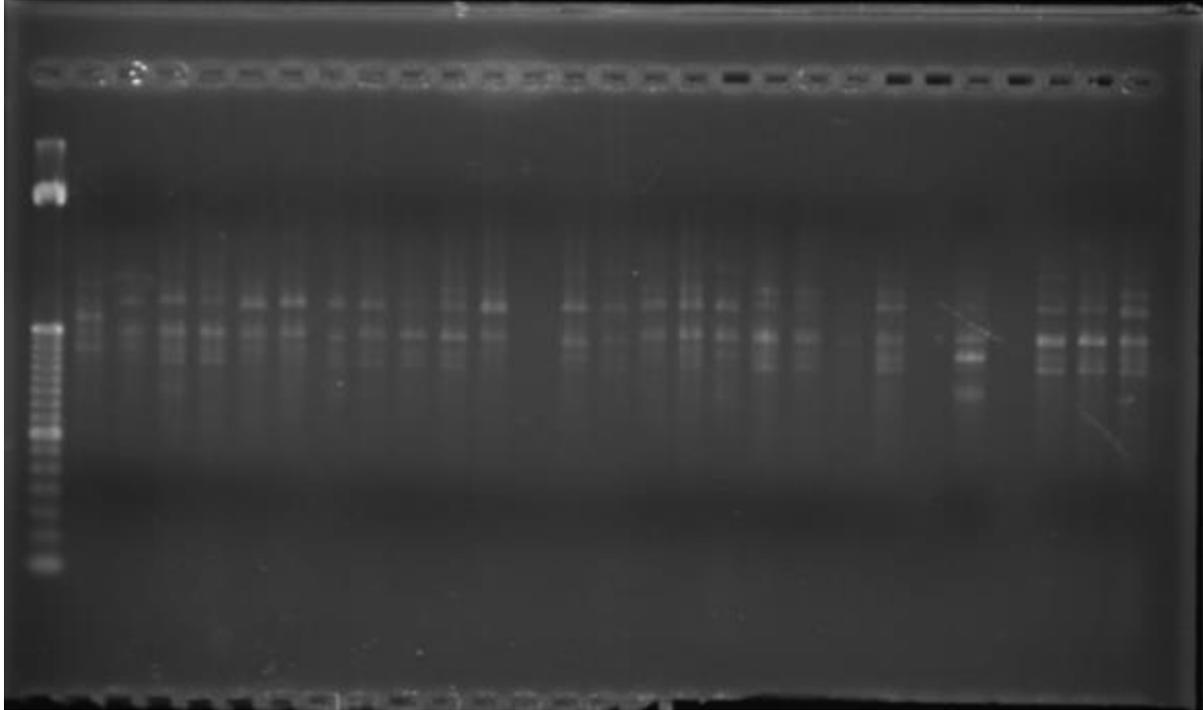
**1- Gel d'amplification de l'amorce UBC 817**



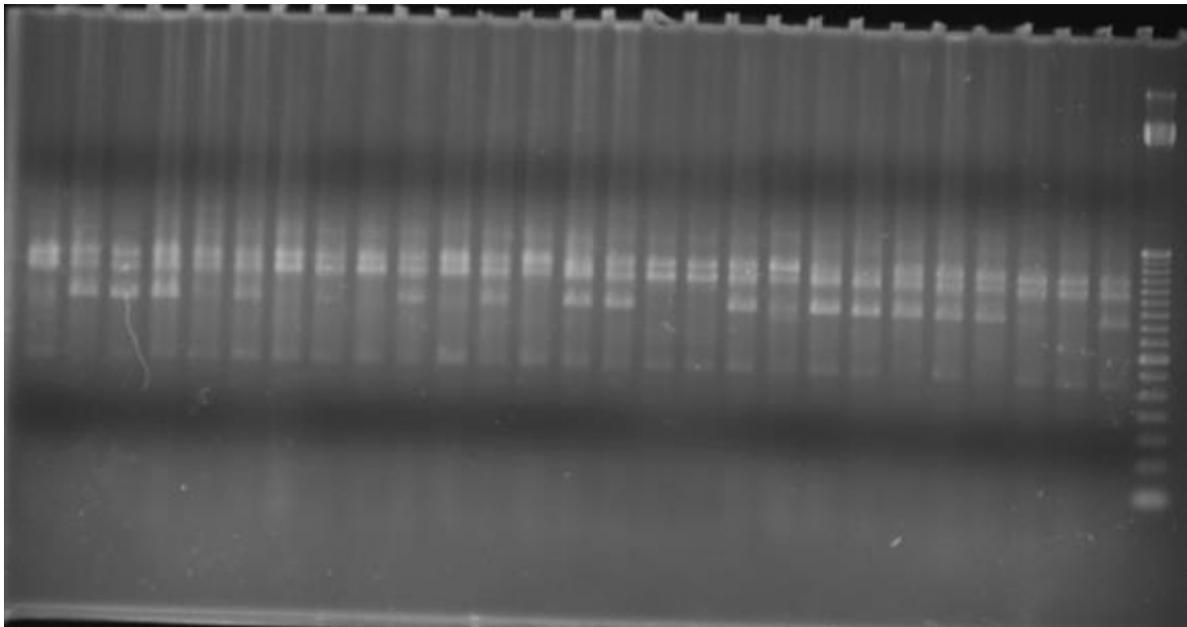
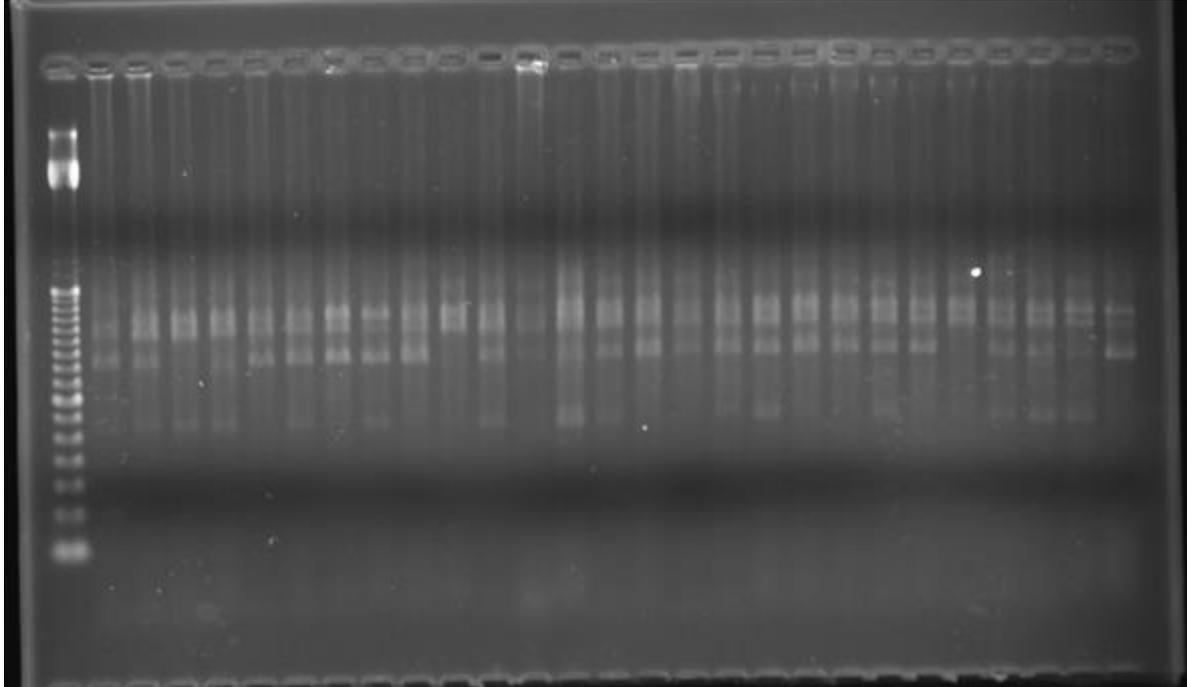
**2- Gel d'amplification de l'amorce UBC 818**



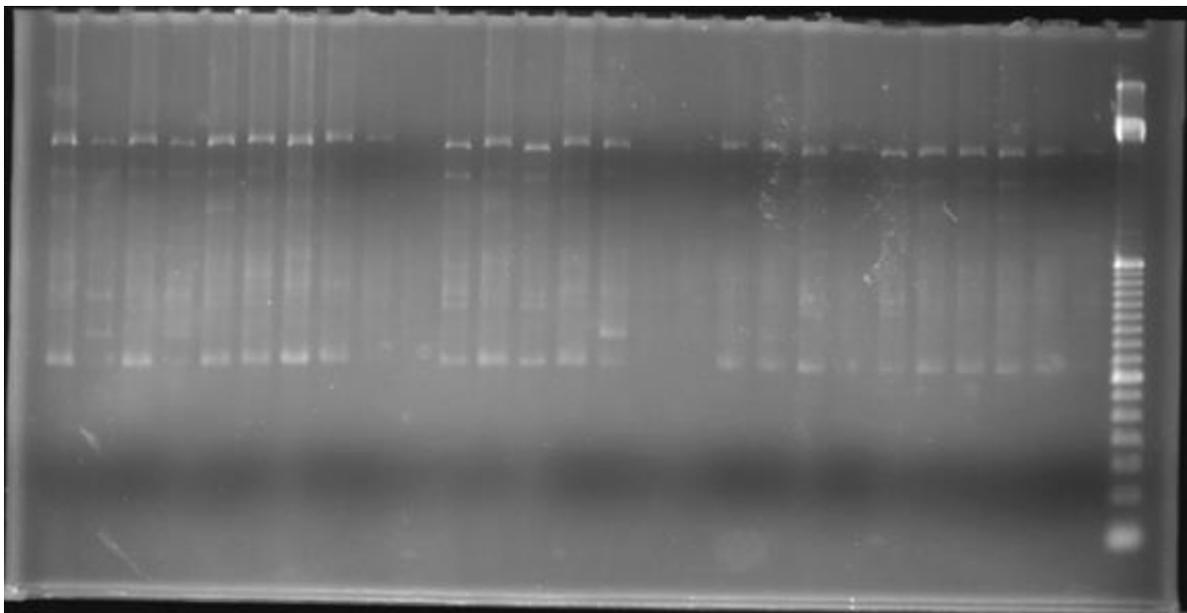
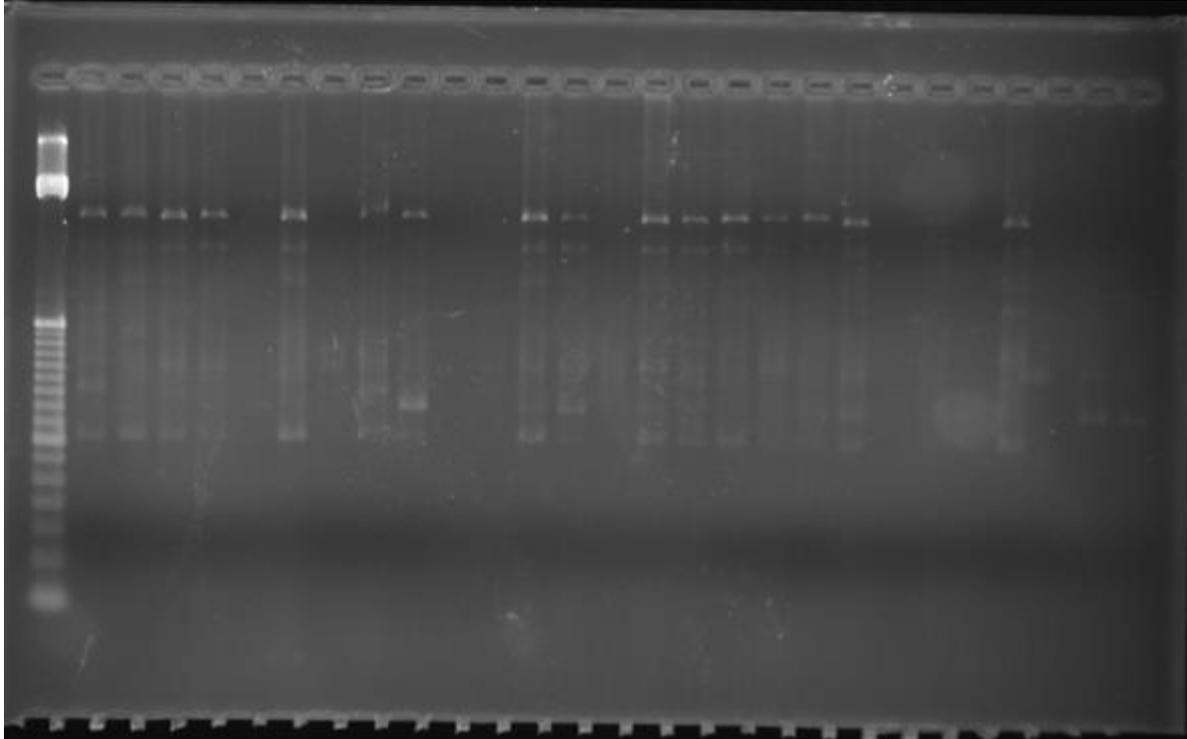
**3- Gel d'amplification de l'amorce F11**



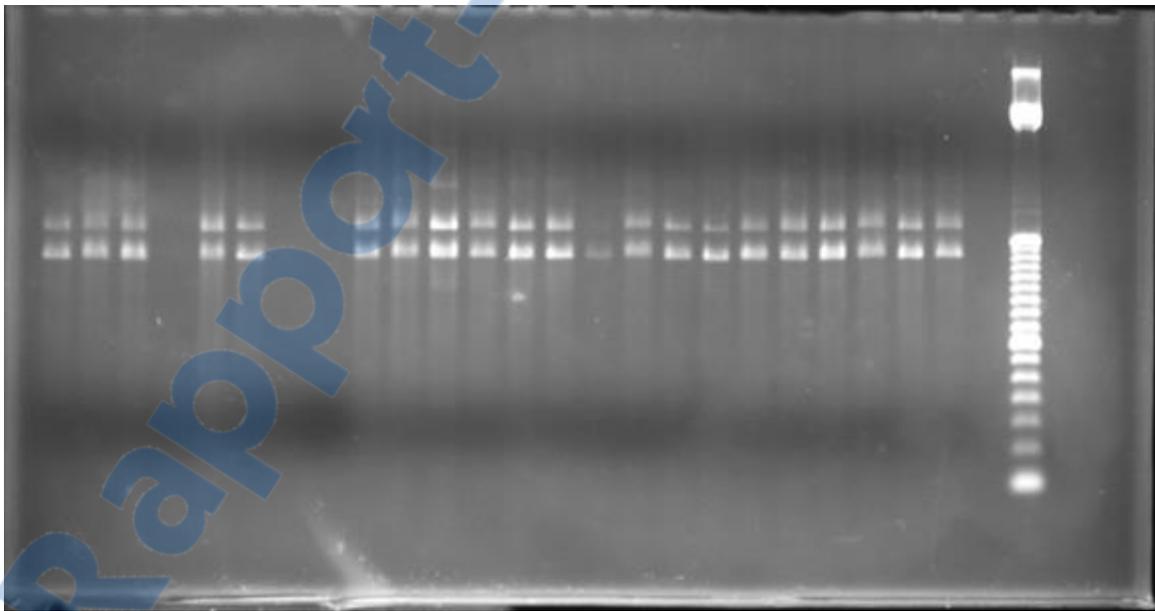
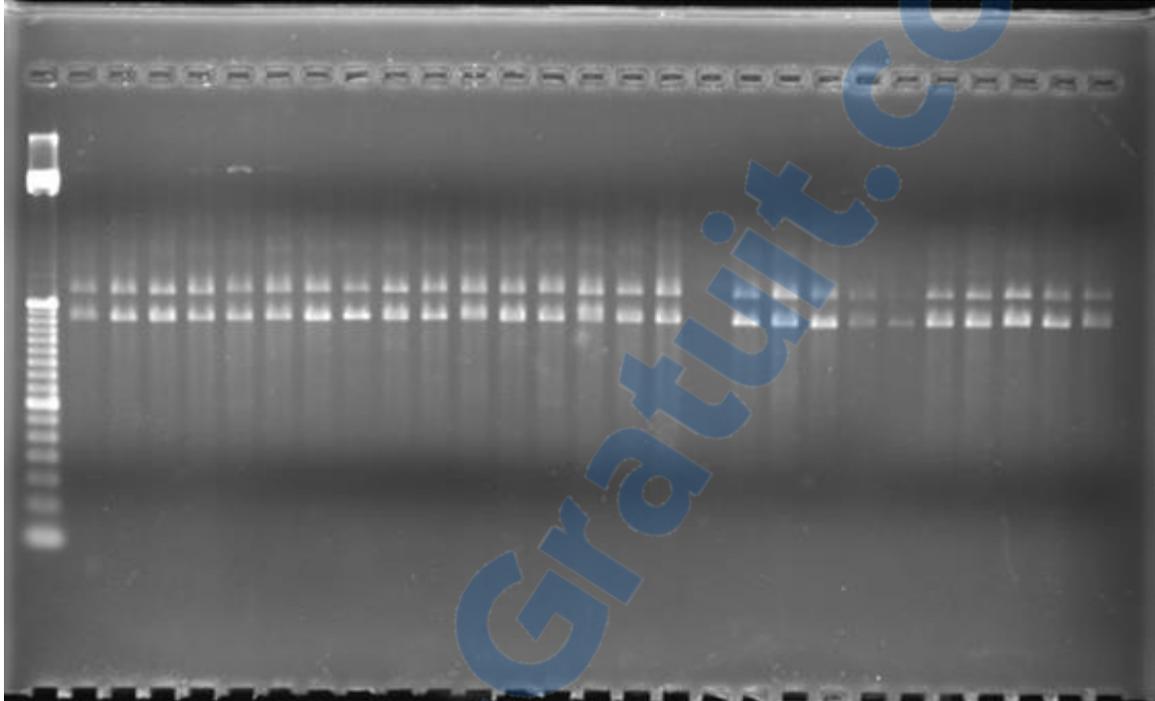
**4- Gel d'amplification de l'amorce IMA 5-3**



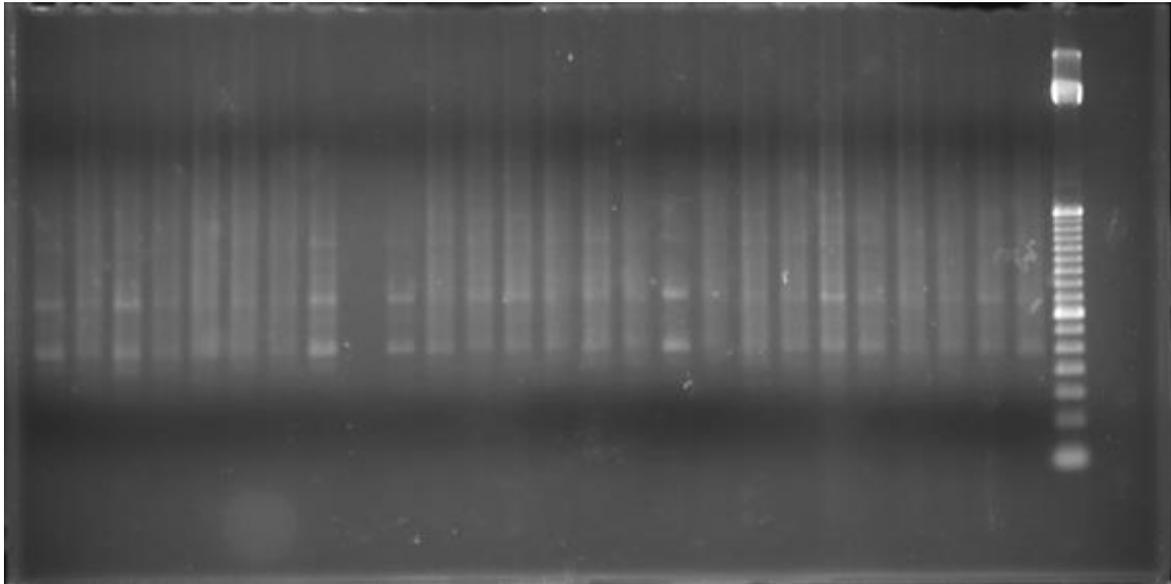
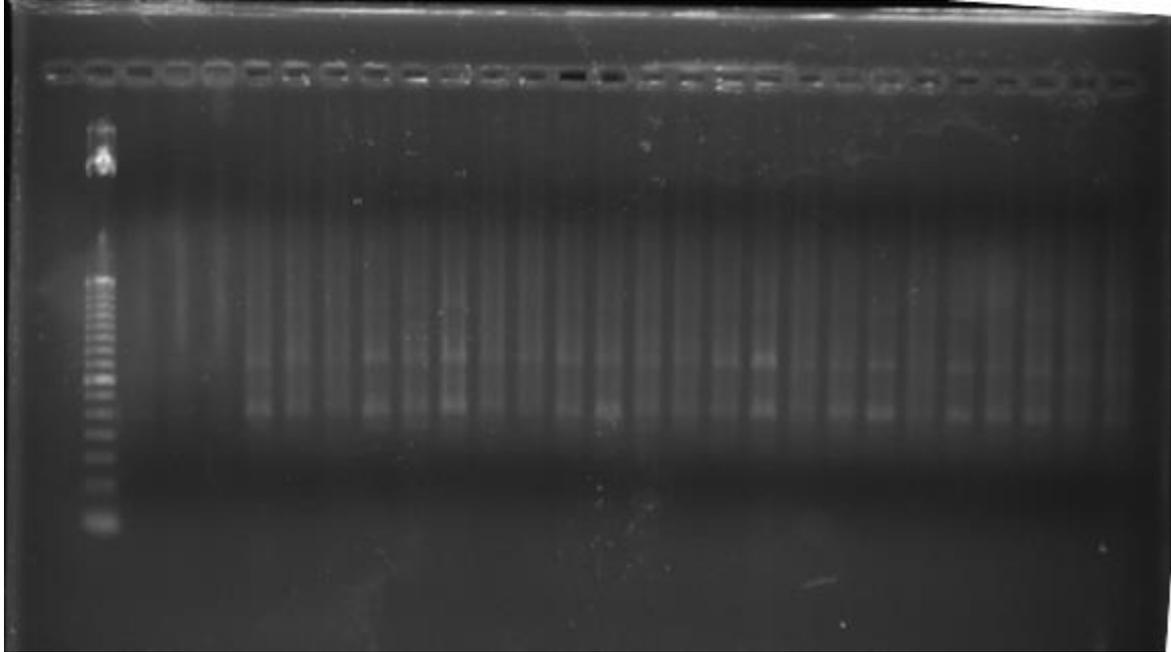
**5- Gel d'amplification de l'amorce IMA 5-Z**



**6- Gel d'amplification de l'amorce ISSF1**



**7- Gel d'amplification de l'amorce UBC 841 Y-1**



Annexe 6 :  $\chi^2$ **1- Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce UBC 817 :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
1633	26	30	0,02
1273	15	41	0,09
913	49	7	5,17
712	51	5	7,72
440	54	2	13,72
343	10	46	1,524
264	19	37	2,39
Ensemble	224	168	<b>30,634</b>

Nombre d'individus=54  
ddl=53  
 $X^2$  théorique (d'après la table  $X^2$ ) selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
70.99	79.84	90.57

**2-Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce UBC 818 :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
1924	9	42	1,471
1414	46	5	6,28
845	21	30	1,59
488	29	22	0,23
313	39	12	0,059
255	39	12	0,059
193	13	38	0,654
Ensemble	196	161	<b>10,343</b>

Nombre d'individus=50  
ddl=49  
 $X^2$  théorique selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
66.34	74.92	85.35

**3-Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce F11 :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
1451	4	49	8,61
1213	10	43	1,07
1032	44	9	1,81
770	48	5	6,85
622	22	28	0,84
526	27	24	0,09
400	4	49	8,61
Ensemble	159	207	<b>27,88</b>

Nombre d'individus=51  
ddl=50  
 $X^2$  théorique selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
67.51	76.15	86.66

**4-Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce IMA 5-3 :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
613	54	0	0
508	54	0	0
388	37	17	1,2
184	38	16	0,61
Ensemble	216	33	<b>1,81</b>

Nombre d'individus=52  
ddl=51  
 $X^2$  théorique selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
68.67	77.39	87.97

**5-Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce IMA 5-Z :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
2548	41	13	0,025
1125	27	27	0
640	4	50	8,92
504	8	46	2,99
430	1	53	15,46
240	8	46	2,99
140	34	20	3,29
Ensemble	123	255	<b>33,675</b>

Nombre d'individus=52  
ddl=51  
 $X^2$  théorique selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
68.67	77.39	87.97

**6-Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce IFFS1 :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
1881	17	38	1,03
1396	30	25	0,68
958	45	10	1,36
721	48	7	4,42
Ensemble	140	80	<b>7,49</b>

Nombre d'individus=53  
ddl=52  
 $X^2$  théorique selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
69.83	78.62	89.27

**7-Calcul du paramètre statistique  $\chi^2$  de l'amorce UBC 841 Y-1 :**

Marqueur	Nombre de 1	Nombre de 0	$X^2$ calculée
597	25	30	0,05
313	49	6	5,83
Ensemble	74	36	<b>5,88</b>

Nombre d'individus=53  
ddl=52  
 $X^2$  théorique selon le risque d'erreur ( $\alpha$ )

$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$	$\alpha = 0.001$
69.83	78.62	89.27

