

## ***ABREVIATIONS***

**ACP** : Analyse en Composantes Principales

**AFC** : Analyse Factorielle des Correspondances

**AFIDOL** : Association Française Interprofessionnelle des Olives

**AFLP** : Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés

**COI** : Conseil Oléicole International

**DDFP** : Direction de Développement des Filières de Production

**MAPM** : Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime

**ORMVA** : Office Régional de Mise en Valeur Agricole

**CTAB** : Cetyl TrimethylAmmonium Bromide

**dNTP** : Désoxyribonucleide triphosphate

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

**He** : hétérozygotie attendue

**H0** : hétérozygotie observée

**ISSR** : Inter- Simple Sequence Repeat

**Pb** : paire de bases

**PCR** : Réaction de Polymérisation en chaîne

**PM** : Picholine marocaine ; **H<sub>z</sub>** : Haouzia ; **MR** : Menara

**PVP** : Polyvinylpyrrolidone

**RAPD** : Polymorphisme de l'ADN Amplifié au Hasard

**SSR** : Séquence Simple Répétées ou Microsatellites

**UPGMA** : Unweighted Pair Group Method With Arithmetic mean

## ***RESUME***

La conservation des ressources génétiques arboricoles est essentielle pour tout programme d'amélioration génétique. Dans ce contexte, Cette étude a été réalisée sur 23 géotypes d'oliviers qui ont été sélectionnés et qui sont en état d'évaluation in-situ dans la région de Moulay Driss au plan agronomique et moléculaire.

L'utilisation des descripteurs pomologiques et 6 locus microsatellites dans cette caractérisation a montré l'existence d'une diversité génétique importante entre les géotypes d'olivier de Moulay Driss. Et aussi une grande variabilité dans les caractéristiques agronomique de chaque arbre, production par arbre, poids des fruits, teneur en huile et la période de floraison.

Sur le plan moléculaire chaque géotype à présent un profil distinct. Les 6 locus SSR ont révélé un nombre totale de 40 allèles avec une moyenne de 6 allèles par locus. La comparaison deux à deux entre les géotypes de la collection a montré que les plus proches sont distincts par 3 et 4 allèles, tandis que les plus éloignés différent par un maximum de 20 allèles.

La structuration génétique a montré que les géotypes d'olivier de Moulay Driss sont originaires de différents pools génétiques et qu'ils sont issus vraisemblablement de prospection dans le patrimoine oléicole locale de la zone de Moulay Driss.

**Mots clés :** olivier, *olea europaea*, caractérisation agronomique, marqueurs microsatellites,

## Liste des figures

Figure 1 : Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996).....	3
Figure 2 : Aire mondiale actuelle de culture de l'olivier (Afidol).....	4
Figure 3 : Evolution de la superficie consacrée à l'oléiculture (ha) au Maroc (DDFP, 2013).....	6
Figure 4 : répartition régionale de la production des olives (MAPM).....	7
Figure 5 : Evolution de la production nationale en huile d'olive et en conserve d'olive (DDFP, 2013).....	8
Figure 6 : Echanges commerciaux d'huile d'olive entre 2008-20012 (T) (MAPM).....	8
Figure 7.histoire de domestication d'olivier (Loussert et Bousse, 1978).....	9
Figure 8 : développement du système racinaire d'olivier : 1) germination du noyau d'olivier, 2) Evolution du système racinaire d'olivier de semis : A système racinaire à la plantation, B système racinaire secondaire, C nouvelle racine émise à partir des excroissances du collet (Loussert et Brousse, 1978).....	11
Figure 9: Section transversale d'olive (A. Monique, 2008).....	13
Figure 10 : cycle annuel de l'olivier (loussert et Brousse, 1978).....	14
Figure 11 : le cycle de vie d'olivier (Argenson et al ; 1999).....	15
Figure 12 : amplification aléatoire de l'ADN : RAPD.....	20
Figure 13 : Sources de polymorphisme d'ADN par le marqueur RFLP, A : dû à la disparition d'un site de restriction (mutations ponctuelles), B : dû à des mutations de type 'insertion-délétion'.....	21
Figure 14: principe de l'ISSR. Si les bases arbitraires de l'amorce sont du coté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du coté 3' le produit B (D. de Vienne, 1998).....	22
Figure 15 : principe de marqueurs moléculaire AFLP (Denis TAGU, 1999).....	24
Figure 16 : principe de marqueurs de type microsatellites (SSR) (D.de Vienne, 1998).....	25
Figure 17 : Teneur en huile moyenne (en % par rapport au poids frais) des 23 génotypes étudiés.....	32
Figure 18 : profils génomiques SSR générées par l'amorce DCA5 (A) et UDO12 (B) sur les génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun.....	39
Figure 19 : Distribution des fréquences de la dissemblance génétique pour toutes les combinaisons deux à deux entre les 23 génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun (A) et le profil de comparaison entre les 22 génotypes et la variété Picholine marocaine (B).....	41
Figure 20 : arbre phylogénétique entre les 23 individus d'olivier de Moulay Driss Zerhoun basée sur la méthode UPGMA et le calcul des distances.....	43

Figure 21 : Répartition des génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun dans le plan défini par les axes 1, 2 et 3 de l'AFC de l'analyse par les marqueurs SSR.....44

## *Liste des tableaux*

Tableau 1 : Production mondiale d'olives (COI, 2013).....	5
Tableau 2 : Géotypes suivis pour la présente étude.....	27
Tableau 3 : Six amorces SSR utilisées comme clé d'identification variétale d'olivier.....	29
Tableau 4: Production moyenne des trois dernières années des individus étudiés.....	31
Tableau 5: Poids moyen des olives des géotypes étudiés.....	34
Tableau 6: Périodes moyennes de floraison des géotypes étudiés.....	36
Tableau 7 : Nombre moyen et pourcentage de fleurs nouées en autopolinisation, en interpollinisation avec Haouzia et en pollinisation libre.....	38
Tableau 8 : Allèles observés et paramètres de diversité obtenus avec les 6 locus SSR chez les 23 individus d'olivier .....	40
Tableau 9 : fréquences alléliques obtenus dans les 23 individus d'olivier.....	40

# Sommaire

Introduction générale.....	1
Partie I : Revue bibliographique.....	3
Chapitre I : Généralité sur l'olivier.....	3
I. Répartition géographique et importance socio-économique de l'olivier.....	3
1. répartition géographique.....	3
2. Importance socio-économique de l'olivier dans le monde.....	4
II. Importance de l'olivier au Maroc .....	5
1. Profil variétal.....	6
2. La Production .....	6
2.1. L'huile d'olive .....	7
2.2. Les olives de table.....	7
III. La description biologique d'olivier.....	9
1. Origine géographique et génétique d'olivier.....	9
1.1. Origine géographique.....	9
1.2. Origine génétique .....	9
2. Taxonomie de l'olivier.....	10
3. Caractéristiques biologiques et morphologiques de l'olivier.....	10
3.1. Description générale.....	10
3.2. Système racinaire.....	11
3.3. Système aérien.....	11
i. Les feuilles.....	12
ii. La fleur.....	12
iii. Les fruits.....	12
3.4. Cycle végétatif de l'olivier.....	13
3.5. Les exigences agro-écologiques.....	16
i. La température.....	16
ii. La lumière.....	16
iii. La pluviométrie.....	16
iv. Le sol.....	17
3.6. La pollinisation et la multiplication chez l'olivier.....	17
Chapitre II : techniques de discrimination et d'identification des variétés d'olivier.....	18
I. Polymorphisme moléculaire.....	19
1. Les marqueurs RAPD.....	19
2. RFLP.....	20
3. ISSR.....	22
4. AFLP.....	23
5. Microsatellites ou SSR.....	24
Partie II : Matériel et Méthodes.....	26
I. La zone d'étude.....	26
II. Matériel végétale.....	26
III. Caractérisation agronomique des géotypes de Moulay Driss.....	27
1. Production par arbre.....	27

2. Teneur en huile.....	27
3. Poids des fruits.....	27
4. Période de floraison.....	27
5. pollinisation .....	27
IV. Caractérisation Moléculaire des géotypes de Moulay Driss.....	28
1. Extraction de l'ADN.....	28
2. Marqueurs moléculaire utilisés.....	28
3. Condition de la PCR et d'électrophorèse.....	29
4. Analyse des données.....	30
Partie III : Résultats et Discussion.....	31
I. Caractérisation agronomique des géotypes de Moulay Driss .....	31
1. Production en olive.....	31
2. Teneur en huile.....	32
3. Poids moyen des fruits.....	33
4. Période de floraison.....	34
5. Pollinisation.....	37
II. Caractérisation moléculaire des géotypes de Moulay Driss.....	39
Conclusion et perspectives .....	46
Références bibliographiques.....	47

## *Introduction générale*

L'olivier, *Olea Europaea* L. est l'une des plus anciennes cultures de la Méditerranée. Cette espèce, associée aux rites et coutumes religieuses, a influencé les mœurs et les civilisations des peuples méditerranéennes. La domestication de l'olivier se situe environ à 4500- 5000 ans avant notre ère et principalement à l'est de la Méditerranée. Résultats de migrations humaines essentiellement d'Est en Ouest (Besnard et *al.*, 2001a ; khadari, 2005 ; Breton et *al.*, 2006).

Au Maroc, la superficie oléicole a atteint 1.020.000 ha en 2013, soit plus de 55% des vergers fruitiers du Maroc. La production a été estimée à 1.114.000 tonnes (MAPM, 2013), ce qui lui donne un rôle socio-économique très important. Le patrimoine variétal national reste dominé à 80% par la variété population *Picholine marocaine* (MAPM, 2013) reconnue par sa rusticité et son adaptation aux conditions édapho-climatiques du pays. Les clones *Menara* et *Haouzia* ont gagnés du terrain ces dernières années grâce aux efforts de l'Etat. En plus, quelques variétés étrangères, ayant fait preuves dans d'autres pays méditerranéens telles que la *Picholine de Languedoc*, *Arbequine*, *Arbosana*, *Koroneiki* sont également plantées au niveau de diverses régions du pays.

Jusqu'à ces derniers temps, la distinction entre les cultivars d'olivier est difficile en raison des hautes similitudes dans les caractères morphologiques. Le COI (Conseil Oléicole International) avait mis au point une méthodologie de détermination variétale de l'olivier basée sur ces caractères morphologiques et ainsi plus de 1250 cultivars ont été décrits pour *Olea europaea* L. de part le monde. Ces caractères sont au nombre de 32 et concernent l'arbre, les feuilles, les inflorescences, les fruits et les endocarpes. Ces mesures fondées sur les caractères phénotypiques sont facilement disponibles et ne nécessitent pas de matériel sophistiqué.

Cependant, ces marqueurs morphologiques et phénologiques présentent l'inconvénient du petit nombre de polymorphisme détecté et de dépendre de l'environnement. En plus de cela, certains caractères ne sont disponibles et observables que pour une courte période, ou à un stade de maturité bien particulier, ce qui peut retarder l'identification correcte.

Ainsi, le recours à la caractérisation moléculaire est d'une grande importance dans l'identification variétal et la distinction entre génotypes différents. C'est un outil qui peut être utilisé à tous les stades de développement de l'arbre et même pour ceux non encore productifs ce qui permet une sélection précoce.



Dans notre étude qui se propose d'identifier un matériel végétal d'olivier local, présélectionnés pour ces performances de production dans la zone de Moulay Driss Zerhoun, nous avons eut recours aux marqueurs SSR.

Le présent travail comporte deux parties principales :

- première partie consacrée à une synthèse bibliographique sur l'olivier, leur importance socio-économique, généralité sur la biologie d'olivier et un aperçu sur les différents marqueurs moléculaires les plus utilisées.
- Une étude pratique comportant deux axes : l'un fondé sur la caractérisation agronomique des variétés d'olivier de la région de Moulay Driss Zerhoun, et l'autre focalisé sur l'étude de la diversité génétique de ces variétés via l'utilisation des marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) pour l'identification des génotypes qui composent cette collection.

# *Partie I : revue bibliographique*

## *Chapitre I : Généralités sur l'olivier*

### *1. Répartition géographique et importance socio-économique de l'olivier*

#### *1. Répartition géographique*

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 25<sup>ème</sup> et le 45<sup>ème</sup> degré de latitude nord et sud (figure 1). Toute fois, la méditerranée est la zone numéro un de l'olivier où il constitue un élément fondamental des civilisations de ces régions. Durant les dernières années, plusieurs pays non méditerranéens ont développé cette culture dans certaines régions spécifiques de leur territoire. Il a été introduit avec succès en chine, au Japon, aux Etats unis (Californie), et au Mexique pour l'hémisphère nord, en Australie, en Afrique du sud et dans divers pays de l'Amérique du sud (figure 2).

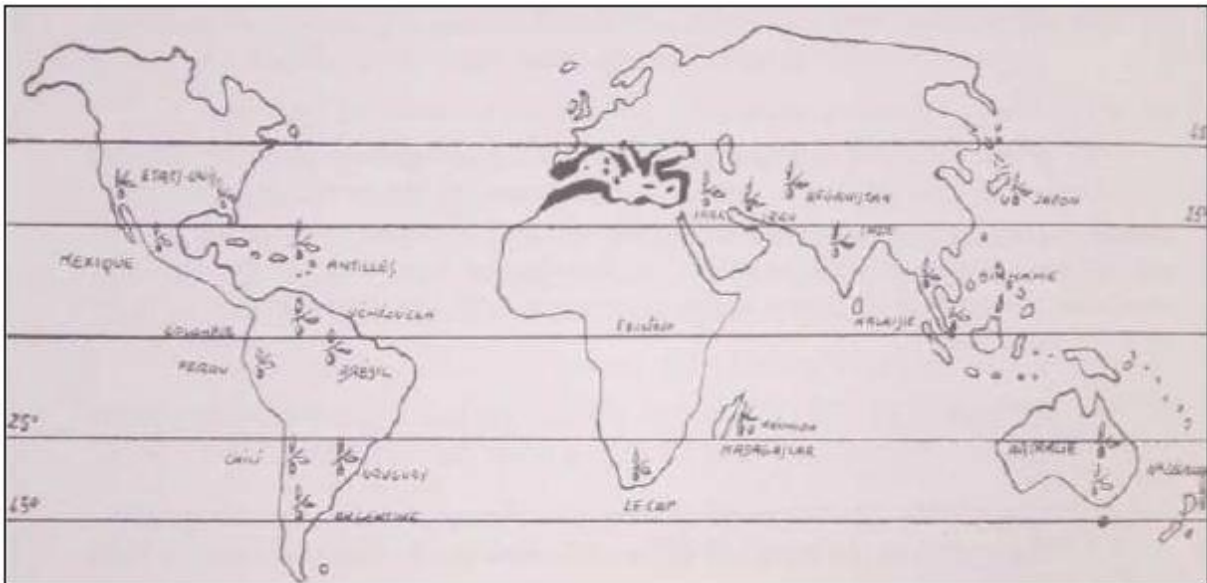


Figure 1 : Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996)

Toutefois, le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier (figure 2) grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau de l'hydrométrie.



Figure 2 : Aire mondiale actuelle de culture de l'olivier (Afidol)

## 2. Importance socio-économique de l'olivier dans le monde

Dans de nombreux pays, l'olivier représente la ressource principale des populations et occupe une des premières places dans le revenu agricole. Il est au 24<sup>ème</sup> rang des 35 espèces les plus répandues dans le monde.

La production mondiale d'huile d'olive représente 3% de toutes les huiles végétales. Pour la campagne 2013-2014 et selon les données du Conseil Oléicole International (COI), la production mondiale est estimée à 3,2 millions de tonnes, soit une augmentation d'environ 20% par rapport à la campagne précédente. L'Espagne se trouve à la tête des producteurs avec 1 500 000 tonnes, suivie de l'Italie (500 000 t) (tableau1).

Tableau1 : Production mondiale d'olives (COI, 2013)

<b>Pays</b>	<b>Production (en tonnes)</b>
Espagne	1 500 000
Italie	500 000
Grèce	230 000
Turquie	180 000
Maroc	120 000
Tunisie	80 000
Portugal	76 200
Algérie	62 000
Jordanne	25 000
Chypre	5 600
France	5000
Croatie	4000
Les autres pays	412200
Production mondiale	3 200 000

Les importations sont évaluées à près de 770 000 t tandis que les exportations ont atteint plus de 750 000t. Plus de 70% des exportations mondiales sont issues de l'Union européenne, principalement d'Espagne et d'Italie. La consommation mondiale est légèrement supérieure à 3000 000 t. (source : extrait de Newsletter d'octobre 2013 du COI).

## ***II. Importance de l'olivier au Maroc***

Au Maroc, l'oléiculture joue un rôle socio-économique très important. En effet, l'olivier occupe la première place parmi les espèces arboricoles cultivées, couvrant actuellement environ 1020 000 hectares. Cependant, les oliveraies occupent presque plus de la moitié (55%) de la superficie arboricole totale (DDFP, 2013).

Elle permet de générer plus de 15 Millions de journées de travail par an, soit l'équivalent de 70.000 emplois permanents. Sa production garantit l'approvisionnement des unités industrielles et traditionnelles de trituration et de conserverie d'olives.

L'oléiculture connaît actuellement une grande expansion, avec un essore de la surface consacrée aux oliviers qui est passée de 600 000 ha en 2005 à 840 000 ha en 2011(figure 3). Cet accroissement des superficies est dû premièrement aux programmes de mises en valeurs agricole et d'expansion de la culture déployés par l'Etat. La deuxième raison est liée à son adaptation à tous les étages bioclimatiques, ce qui lui a permis de valoriser les terrains pauvres et accidentés.

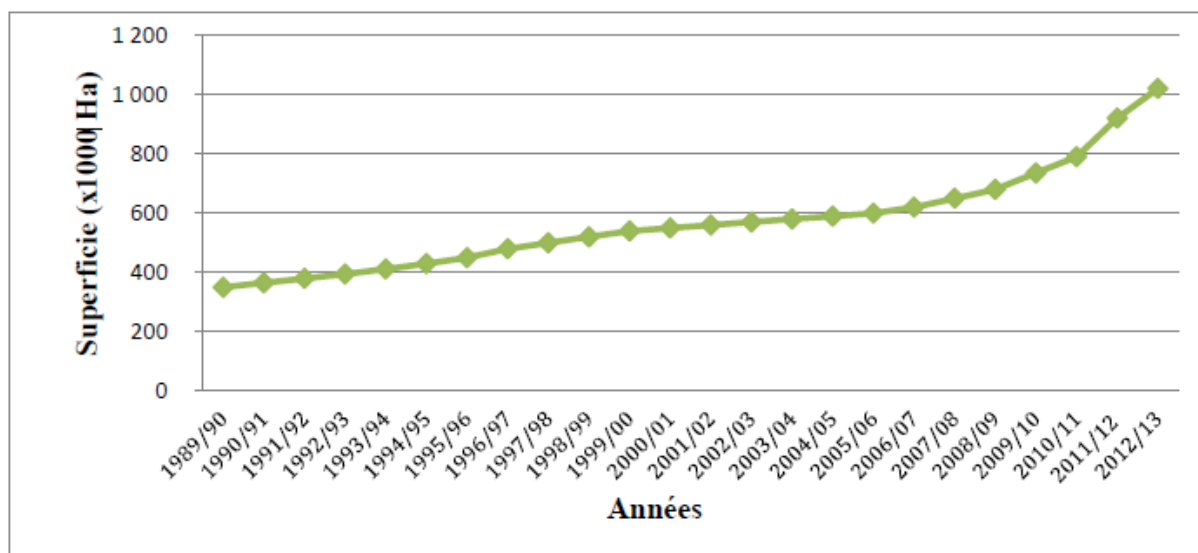


Figure 3 : Evolution de la superficie consacrée à l'oléiculture (ha) au Maroc (DDFP, 2013)

### 1. Profil variétal

La principale variété cultivée au Maroc est la *Picholine marocaine*, présente à plus de 80 % dans les plantations du pays. Le reste est constitué surtout de *Haouzia* et *Menara* qui ont connu un grand essor ces dernières années par les efforts de l'Etat, et de plusieurs variétés locales (*Dahbia*, et *Mesllala*, etc.) et étrangères (*Picholine du Languedoc*, *Picual*, *Frantoio*, *Manzanilla*, *Gordal Sévillane*, *Arbéquine*, *Arbosana*, *Koroneiki*) (MAPM, 2013).

Selon les directives de la stratégie de la filière oléicole, l'objectif escompté sur le plan variétal, étant de diminuer la part de la *Picholine marocaine*, de manière à ce qu'elle ne constitue à terme que 50% de la superficie totale des oliveraies au profit des clones *Haouzia* et *Menara* et des variétés étrangères ayant montré leur performance dans les études de comportement variétal.

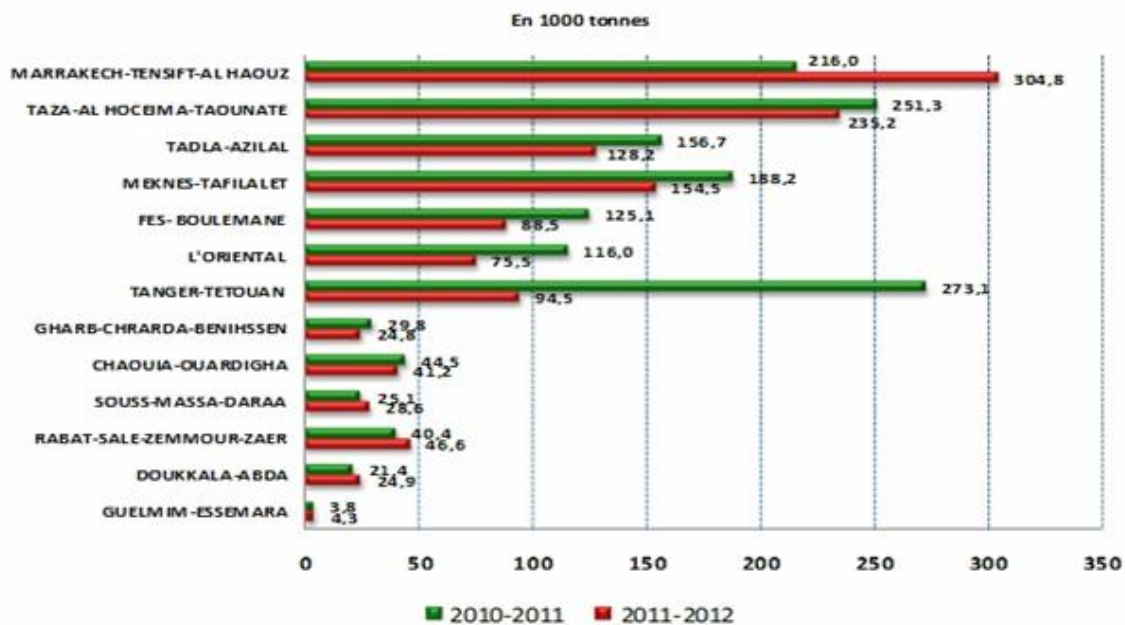
### 2. La production

En termes de production, la filière oléicole a connu une nette croissance entre 2007 et 2013 passant de 765.377 tonnes à 1,3 million de tonnes en 2013, avec un pic de 1,5 million de tonnes en 2010.

67% de la production marocaine d'olives est concentrée au niveau des régions de :

- Marrakech –Tensift-Al Haouz (24%);
- Taza-Taouate-Al Hoceima (19%);
- Tadla-Azilal (12%);
- Meknès-Tafilalt (12%)

L'analyse de l'évolution de la production par région montre que la production diffère d'une région à l'autre et aussi d'une année à l'autre (figure 4) selon les conditions climatiques et édaphiques et aussi l'intervention de l'homme (conduite des oliveraies).



Source : MAPM

Figure 4: répartition régionale de la production des olives (MAPM)

La filière oléicole se divise en deux branches d'importances inégales : huile d'olives et olives de table.

### 2.1.L'huile d'olive :

Environ 75% des olives produites au Maroc sont destinées à la production d'huile d'olive, principalement pour le marché nationale (cette filière contribue à combler le déficit du pays concernant les huiles alimentaires à hauteur de 16%). L'huile d'olive représente 60% des revenus et 30% des exportations du secteur.

La production des huiles d'olives au niveau national est caractérisée par des fluctuations interannuelles importantes. Au cours de la campagne 2009/2010, on constate que le Maroc a connu la plus forte production par rapport aux années précédentes qui a été 160000t soit une augmentation de 53,13% (figure 5).

### 2.2.Les olives de table :

La production des olives de table industrielles (120.000 tonnes par an en moyenne) (Figure 5), est orientée pour près de 60% à l'exportation. Les quantités commercialisées au niveau local

sont présentées en majorité en vrac avec seulement près de 3.000 tonnes commercialisées sous forme conditionnée. La consommation intérieure en olives de table évaluée actuellement à 1,5 kg/personne/an, demeure faible et la consommation totale du Maroc ne constitue que près de 3% de la demande mondiale.

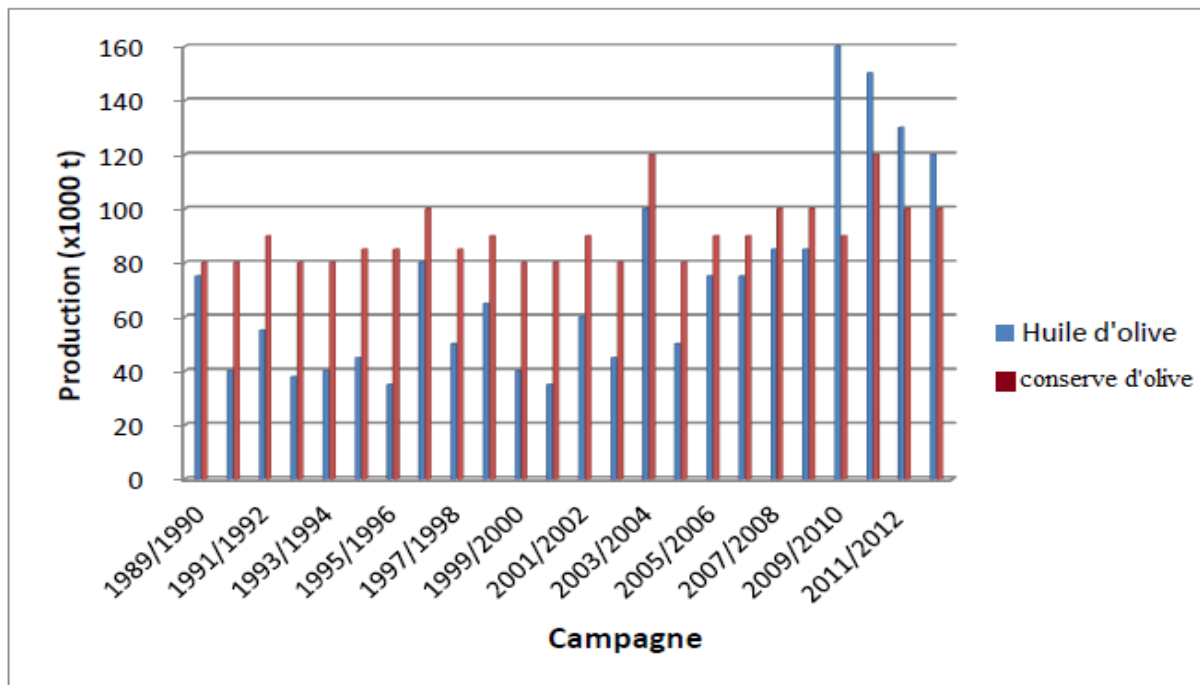


Figure 5 : Evolution de la production nationale en huile d'olive et en conserve d'olive (DDFP, 2013)

En termes de positionnement sur le marché international, les exportations d'huile d'olive marocaines restent concentrées sur deux principaux marchés à savoir l'Union Européenne et les Etats-Unis. Sous forme brute ou raffinée, ces exportations ont chuté au titre de la campagne 2012 s'établissant ainsi à 15640 tonnes contre 38 172 tonnes en 2011 (figure 6).



Figure 6 : Echanges commerciaux d'huile d'olive entre 2008-2012 (T) (MAPM)

### III. La description biologique de l'olivier

#### 1. Origine géographique et génétique d'olivier

##### 1.1. Origine géographique

L'origine géographique de l'olivier semble être le croissant fertile. Son introduction en méditerranée occidentale est à porter au crédit des phéniciens (Loussert et Brousse, 1978). Quelques historiens ont démontré que l'olivier était connu dans notre pays bien avant le VII<sup>e</sup> siècle avant J.C (figure 7).

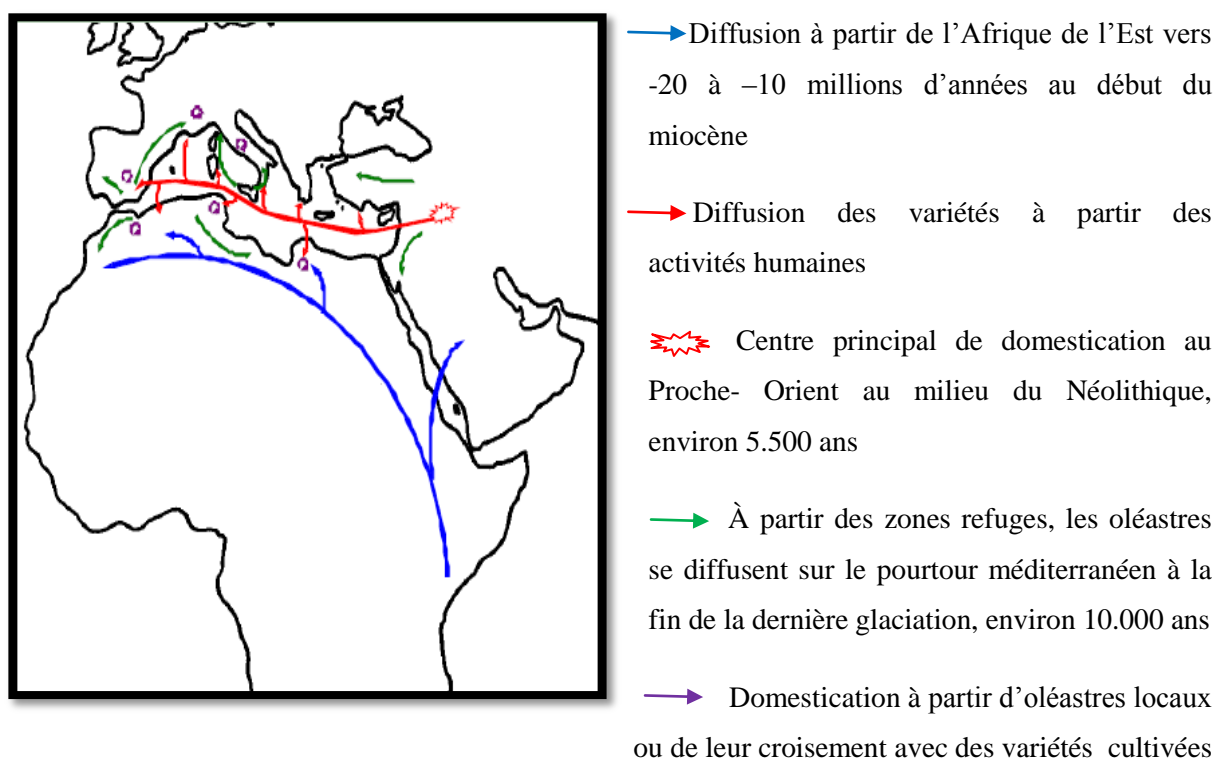


figure 7 : Histoire de domestication de l'olivier (Loussert et Brousse, 1978).

##### 1.2. Origine génétique

L'origine génétique de l'olivier est jusqu'à présent mal connue, l'oléastre a toujours été considéré comme l'ancêtre de l'olivier cultivé.

L'étude de la diversité moléculaire de cultivars et d'oléastres, a révélée que les cultivars s'apparentent aux oléastres (Breton et *al.*, 2006a; Breton et *al.*, 2006b; Besnard et *al.*, 2001).

Les relations entre l'olivier et l'oléastre sont discutées depuis l'Antiquité, les grecs dont Théophraste s'interrogeaient sur la façon de passer de l'un à l'autre (Amigues, 1993) et aussi l'olivier et l'oléastre sont considérés comme très proches botaniquement, les botanistes en ont



fait deux variétés de la même sous espèce *europaea* de l'espèce *Olea europaea* (Terral *et al.*, 2004), vu que l'olivier et l'oléastre sont génétiquement très proches.

## 2. Taxonomie de l'olivier

L'olivier est une espèce diploïde ayant 46 chromosomes ( $2n=46$ ). Il appartient à la famille des Oléacées et au genre **Olea** qui comprend une trentaine d'espèces différentes dans le monde. La seule espèce portant des fruits comestibles est l'*Olea europaea* (olivier), laquelle se divise en 2 sous espèces :

- *Olea europaea sylvestris* ou oléastre (l'olivier sauvage), se présente en forme spontanée comme un buisson épineux et à fruits ordinairement petits. Ces formes spontanées ou sub-spontanées sont répandues notamment en Espagne, au Portugal, en Afrique du Nord et en Syrie (Green, 2002).
- *Olea europaea sativa* ou l'olivier cultivé. Il est constitué par un grand nombre de variétés améliorées, multipliées par bouturage ou par greffage et non connus à l'état sauvage.

## 3. Caractéristiques biologiques et morphologiques de l'olivier

### 3.1. Description générale

L'olivier se distingue des autres espèces fruitières par sa très grande longévité pouvant donner des arbres plusieurs fois centenaires. Si le tronc disparaît par vieillissement, les rejets se développant à sa base assureront sa pérennité et redonneront un nouvel arbre.

L'olivier est sempervirent, c'est-à-dire qu'il est toujours vert : ses feuilles malgré l'apparence tombent avec un cycle de trois années. Comme elles ne tombent pas toutes en même temps, l'arbre donne l'impression d'être toujours vert (A. Monique, 2008).

L'olivier s'adapte bien à des conditions d'environnement extrêmes telles que la sécheresse et la chaleur. Bien qu'il exige un sol léger et aéré pour un bon développement, l'olivier tolère un large éventail de types de sols différents et résiste à de faibles températures. L'olivier est un arbre à fructification bisannuelle dans toutes les conditions de croissance (A. Monique, 2008). Il commence à produire à l'âge de 3 à 7 ans environ (selon les conditions), atteint sa maturité vers 35 ans et la pleine production dure jusqu'à ses 150 ans, ensuite seulement la production sera variable selon les années.

### 3.2. Système racinaire

Les racines de l'olivier ont une importante capacité d'exploitation du sol. Leur développement est étroitement lié aux caractéristiques physico-chimiques du sol, au climat et au mode de conduite de l'arbre (Loussert et Brousse, 1978).

Le plant d'olivier issu de bouturage présente normalement des racines fasciculées. Par contre celui issu de semis a une ou plusieurs racines pivotantes lui permettant une meilleure fixation et plus de tolérance au déficit hydrique (figure 8).

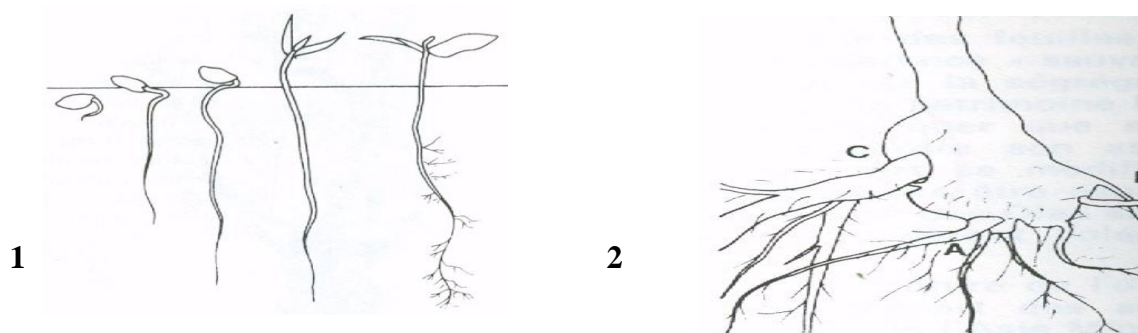


Figure 8 : développement du système racinaire de l'olivier : 1) germination du noyau d'olivier, 2) Evolution du système racinaire de semis : A système racinaire à la plantation, B système racinaire secondaire, C nouvelle racine émise à partir des excroissances du collet (Loussert et Brousse, 1978).

La distribution du système racinaire est fonction de la texture et de l'aération du sol. Dans les sols aérés, les racines peuvent atteindre une profondeur de 6 à 7 mètres ou même plus (Med faouzi kasraoui, 2014).

### 3.3. Système aérien

La structure du port de l'olivier varie avec la variété et les conditions du milieu. Le tronc de l'olivier perd avec l'âge sa section circulaire; certaines parties se développent plus que d'autres, formant des coudes en relief séparés par des dépressions et donnant au tronc un aspect plus ou moins tourmenté. Le tronc porte la frondaison, formée de charpentières, dont la disposition et le nombre donnent la forme de l'arbre. Ces charpentières se ramifient en sous-charpentières.

### *i. Les feuilles*

Les feuilles de l'olivier sont entières et lancéolées, en se disposant sur les branches avec un pétiole de courte taille. Comme dans toutes les Oléacées, elles sont opposées. Même si la forme générale est lancéolée, ses proportions varient dès ovales à presque linéales en dépendant de la variété.

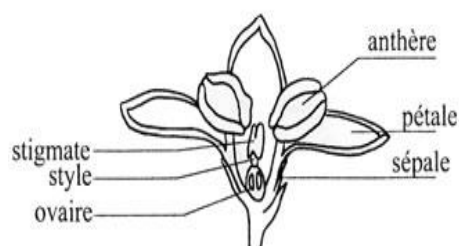
La couleur peut aussi varier, en observant des variétés avec des feuilles de couleur verte brillante et d'autres de tonalités plus foncées. Dans l'envers, sa couleur varie entre des tonalités grises argentées et d'autres plus châtain dû à la présence des poils étoilés dans cette face.

Ce sont des feuilles persistantes avec une durée moyenne de 2 à 3 ans. Sa taille varie entre 3 et 8 cm de longueur et 1 à 2,5 de largeur, en dépendant des variétés. Elles sont d'habitude très rigides et présentent le nerf central très marqué (Metzidatis ,1997).

### *ii. La fleur*

Les fleurs de l'olivier sont blanches et très petites et elles sont portées par des rameaux d'un an. Elles se présentent sous forme de grappes florales à l'aisselle des feuilles. Ces grappes portent 4 à 6 ramifications secondaires. Le nombre de fleurs par grappe est très variable selon les variétés. Il varie de 10 à 40 fleurs par grappes et atteint 200 000 à 400 000 par arbre.

Les fleurs comprennent : une corolle, deux étamines, un calice à quatre pétales, un ovaire de forme arrondie qui porte un style assez épais et terminé par un stigmate. Il contient deux ovules (Bernie et *al.*, 2006).



### *iii. Les fruits*

Le fruit est une drupe à épicarpe d'abord vert puis violet ou rouge et à maturité noirâtre, et à forme ovoïde ou ellipsoïde et de dimensions très variables selon les variétés.

Le jeune fruit multiplie ses cellules jusque fin juin, date à laquelle le noyau se durcit. Le fruit continue alors de grossir jusqu'à la véraison (c'est-à-dire le changement de couleur) par la biosynthèse des pigments, les anthocyanes) (A. Monique, 2008).

L'olive comprend :

- L'épicarpe qui est en fait la peau de l'olive. Elle est recouverte d'une matière cireuse, la cuticule, qui est imperméable à l'eau.

- Le mésocarpe ou la pulpe du fruit. Elle est constituée de cellule dans lesquelles vont être stockées les gouttes de graisses qui formeront l'huile d'olive, durant la "lipogenèse" qui dure de la fin août jusqu'à la véraison.
- L'endocarpe qui est le noyau est formé de deux sortes de cellules :
  - L'enveloppe qui se sclérifie l'été à partir de fin juillet.
  - L'amande à l'intérieur du noyau qui contient deux ovaires dont l'un n'est pas fonctionnel et donc stérile. Le deuxième produit un embryon (figure 9).

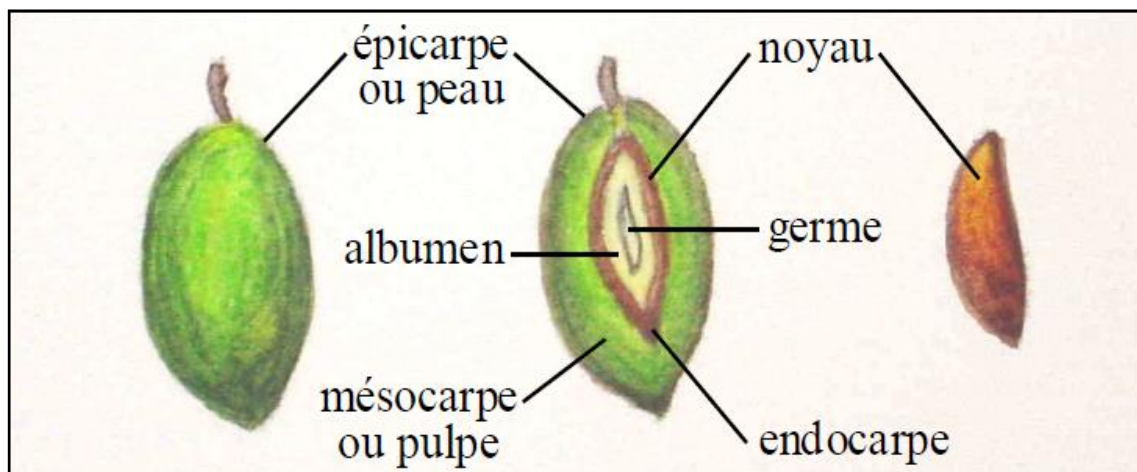


Figure 9 : Section transversale d'olive (A. Monique, 2008)

### ***3.4. Cycle végétatif de l'olivier***

Le déroulement annuel du cycle végétatif de l'olivier est en étroite relation avec les conditions climatiques de son aire d'adaptation, caractérisée essentiellement par le climat méditerranéen.

Après le repos hivernal de novembre à février, la végétation démarre à partir de mars - avril, les pousses terminales s'allongent, les bourgeons axillaires se développent après s'être différenciés en boutons floraux ou en yeux à bois. Les bourgeons végétatifs débourent vers la fin du mois de mars un peu après les bourgeons floraux.

La floraison se déroule entre mai et juin, l'endocarpe (noyau) se sclérifie (durcissement du noyau) en juillet - août. La pousse de printemps la plus importante dans la croissance annuelle, dure jusqu'à mi-juillet environ, une deuxième pousse peut avoir lieu entre Septembre et mi-octobre (figure 10), si les conditions le permettent. Les fruits grossissent pour atteindre leur taille normale fin septembre-octobre. Suivant les variétés, la maturation est plus ou moins rapide.

# Cycle annuel de l'olivier

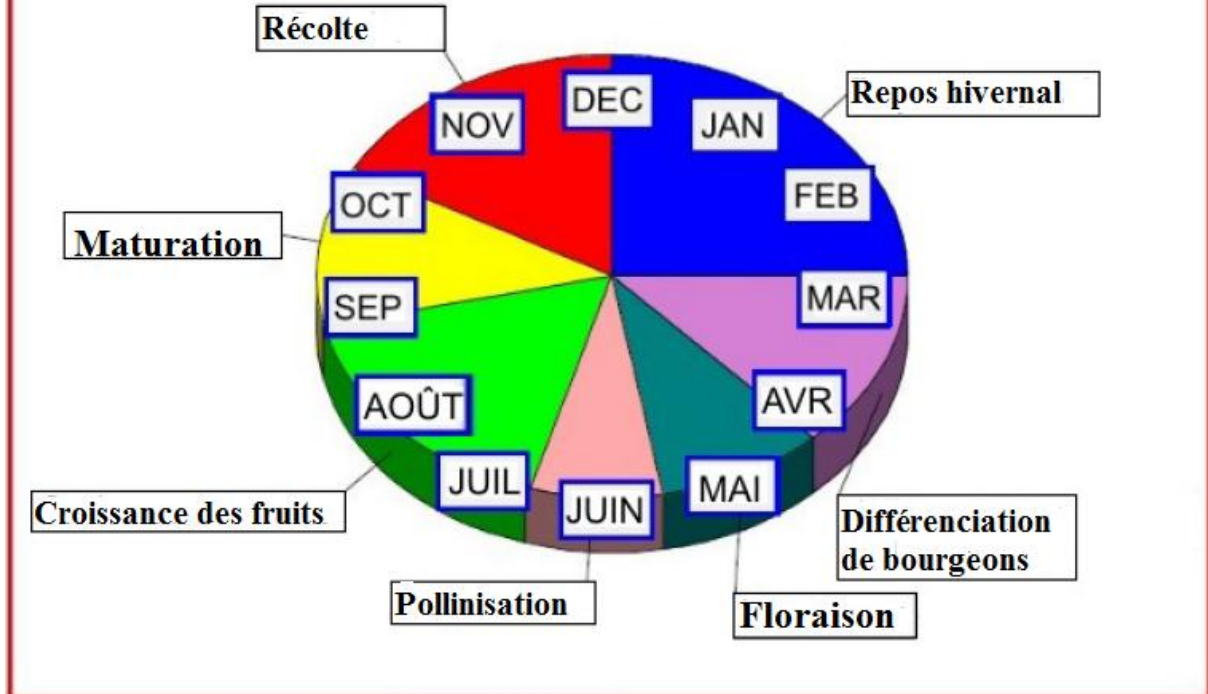


Figure 10 : cycle annuel de l'olivier (loussert et Brousse, 1978)

La floraison s'effectue sur la pousse de l'année précédente. La production interviendra donc sur du bois en deuxième année de croissance.

La différenciation florale achevée, la grappe florale continuera sa croissance et son développement. Sous l'action des températures de plus en plus clémentes de printemps, les fleurs achèvent leur évolution en préparant la floraison (Argenson et *al.*, 1999)

La différenciation florale chez l'olivier passe par des stades successives de changement et d'évolution de la fleur jusqu'à la fructification (figure 11).

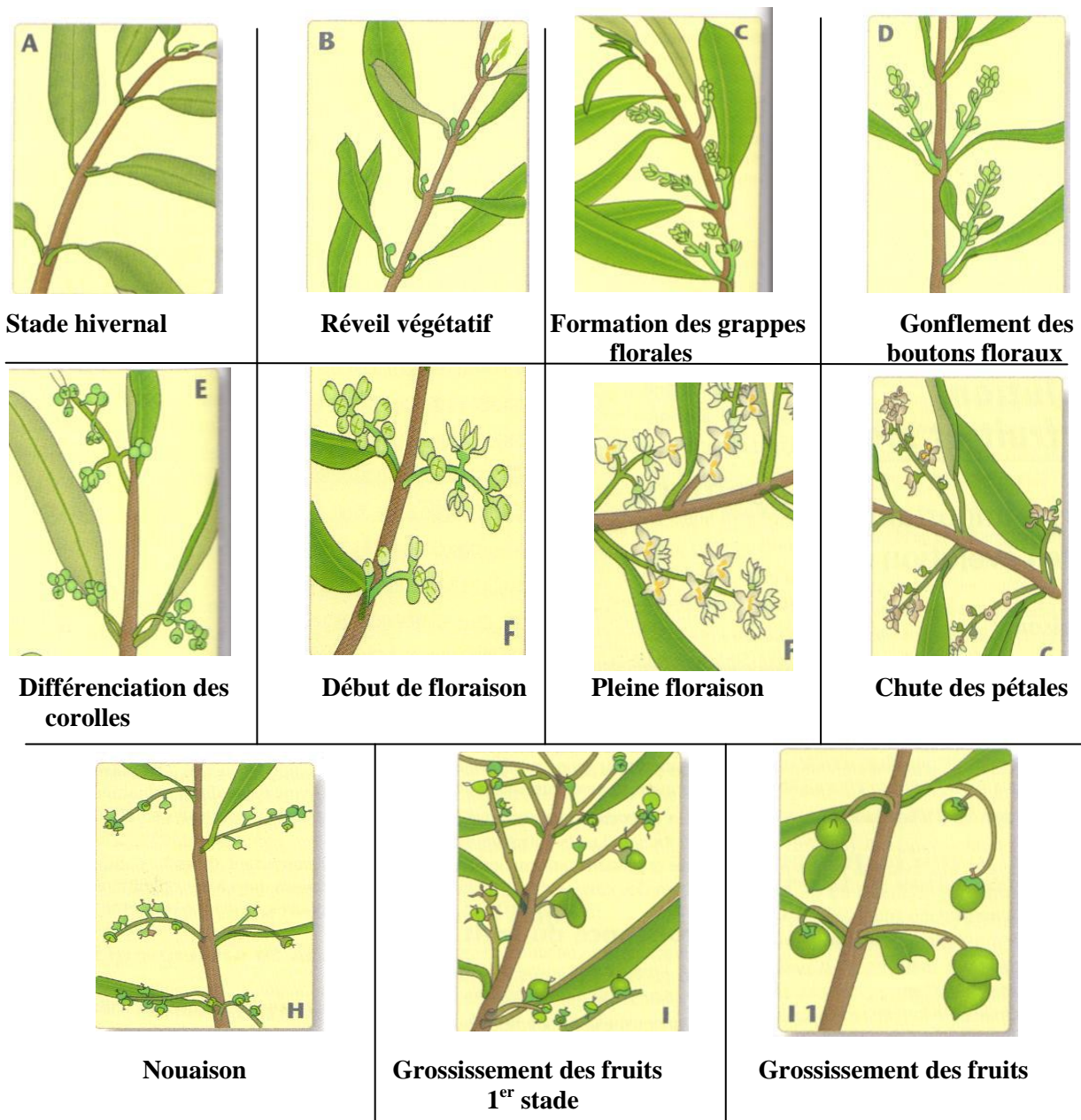


Figure 11 : le cycle de vie de l'olivier (Argenson et al., 1999)

Cette évolution est sous la dépendance de facteurs génétiques liés à la variété (précocité ou tardivité de la floraison) et de facteurs climatiques (influence des basses températures hivernales sur l'évolution de l'apex végétatif en apex floral et influence des températures printanières sur la vitesse d'évolution de la différenciation florale, de la floraison).

### **3.5. Les exigences agro-écologiques**

#### ***i. La température***

L'exposition journalière de l'olivier à de différentes températures joue un rôle décisif dans son accroissement surtout dans sa phase de floraison où se forment ses bourgeons floraux en période de fin d'hiver (deux mois environ avant la pleine floraison). Une étude a été effectuée en exposant l'olivier à des températures élevées a montré que les températures élevées réduisent fortement la formation des fleurs. Ainsi, pour obtenir la meilleur floraison, l'olivier a besoin d'une exposition de 10 semaines au moins à une température de 12 à 13 °C. (Boulouha et *al.*, 2006).

Les basses températures jouent aussi un rôle primordial dans l'initiation floral de l'arbre qui se produit généralement en fin été et début automne.

L'olivier, même si c'est une espèce rustique, craint les températures extrêmes surtout durant certains stades de développement. En effet, une forte baisse de température (0 à -1°C) peut causer des dégâts très important sur la floraison. Aussi, une forte augmentation de température est néfaste pour l'olivier vu qu'à 35-38°C on observe un arrêt de croissance végétative, tandis que si la valeur dépasse 40°C des brûlures endommageront les feuilles et peuvent faire chuter les fruits surtout s'il y a manque d'irrigation (Walali, 2003).

#### ***ii. La lumière***

L'olivier ne nécessite pas un photopériodisme important mais la lumière reste un facteur de production de qualité (Boulouha et *al.*, 2006) car un manque d'éclaircissement et d'enseillement affecte la formation des fruits et augmente la probabilité d'infection des oliviers par des parasites tels que la fumagine et les cochenilles. (Walali, 2003).

#### ***iii. La pluviométrie***

Pour une fructification normale, propice et régulière, l'olivier exige une alimentation en eau suffisante pour un bon accomplissement de son cycle. Ainsi la pluviométrie constitue l'une des facteurs primordiale de production.

- Avec 600 mm de pluie bien répartie, l'olivier végète et produit normalement ;
- Entre 450 et 600 mm, la production est possible à condition que les capacités de rétention en eau du sol soient suffisantes (sol profond argilo limoneux). Des irrigations d'appoint seront bénéfiques.

- Avec une pluviométrie inférieure à 200 mm, l'oléiculture est économiquement non rentable (Walali , 2003). L'irrigation est essentielle.

#### *iv. Le sol*

Le sol doit être profond, perméable, bien équilibré en éléments fins (50% d'argile + limons) et 50% en éléments grossiers (sables moyens et grossiers). Le pH peut aller jusqu'à 8 à 8,5 avec, cependant des risques d'induction de carence en fer et en magnésie (cas de sols trop calcaires), (Boulouha et *al.*, 2006).

#### **3.6. La pollinisation et la multiplication chez l'olivier**

Les inflorescences de cette espèce comprennent des fleurs parfaites (hermaphrodites) et d'autres imparfaites dont le pistil est atrophié. Le taux de fleurs parfaites varie selon les cultivars (50 à 60 % pour la *Picholine marocaine*) et l'autofertilité n'est pas totale.

La pollinisation de l'olivier est assez strictement anémophile. Le vent étant le principal agent pollinisateur et pour assurer une bonne fructification il est recommandé d'associer d'autres variétés pour l'interpollinisation. Les variétés *Haouzia* et *Ménara* peuvent être associées à la *Picholine de languedoc*. (Oukabli , 2008)

L'olivier est multiplié essentiellement par voie végétative par bouturage semi-ligneux. Les méthodes de multiplication sont simples et facile et permettent une propagation à grande échelle en gardant la conformité des cultivars (Charafi, 2007)



## *Chapitre II : Techniques de discrimination et d'identification des variétés d'olivier*

L'olivier compte de nombreuses variétés qui se distinguent entre eux par des caractères morphologiques (formes olives, noyaux, feuilles,...), agronomiques et chimiques différents ainsi que par leur adaptation à des conditions climatiques différentes.

Chez l'olivier, Les premiers travaux de classification et d'identification des variétés remontent aux travaux de De Candolle(1886). Mais au début de XIXème siècle, Ruby (1917) a été le premier à utiliser les différents organes de l'olivier (feuille, fruit et endocarpe) pour caractériser et classer les variétés de cette espèce.

Depuis, divers travaux d'identification variétale ont été élaborés à partir de la combinaison des caractères morphologiques, agronomiques et phénologiques relatifs à l'arbre, au rameau fructifère, au fruit, à l'inflorescence, à la feuille et à l'endocarpe. Ces travaux ont montré la grande utilité des caractères utilisés pour l'inventaire des variétés des différentes régions oléicoles. Ils ont permis aussi de résoudre divers cas d'homonymie et de synonymie.

L'utilisation systématique de caractères morphologiques descriptifs de l'arbre et de ses différents organes a permis la caractérisation primaire et l'identification discriminante des variétés. Outre la caractérisation primaire, le conseil oléicole international (COI) a adopté une méthodologie commune pour la caractérisation secondaire. L'objectif de cette caractérisation (agronomique, phénologique, pomologique et relative à la qualité de l'huile) des variétés d'olivier est de mieux connaître les ressources génétiques en vue d'une utilisation correcte des cultivars dans des conditions pédoclimatiques adaptées qui se traduira par une amélioration de la qualité des produits oléicoles.

La caractérisation secondaire permet à la communauté scientifique de disposer d'informations fiables sur la manière de classer les cultivars selon différentes caractéristiques agronomiques essentielles : productivité, adaptation aux conditions pédoclimatiques, résistance ou tolérance aux maladies et parasites, etc. (Miliani, 1932). Ces informations sont extrêmement utiles pour les travaux d'amélioration génétique et de sélection variétale.

Les marqueurs morphologiques restent peu déterminants dans l'identification variétale car ils peuvent être influencés par l'environnement. Il est difficile de distinguer la part génétique dans la variation du caractère étudié (Charafi, 2007).

Les caractères morphologiques sont donc généralement influencés par les conditions environnementales. La nécessité de surmonter les difficultés rencontrées dans la caractérisation morphologique a mené certains chercheurs à entreprendre de nouvelles études d'identification variétale basées sur les marqueurs génétiques (marqueurs enzymatiques et moléculaires).

Les marqueurs moléculaires (RFLP, RAPD, AFLP, ISSR...) ne sont pas influencés par l'effet du milieu. Mais ces marqueurs ont montré leurs limites pour l'identification de variétés étroitement apparentées (Ouazzani et *al.*, 1995).

Le caractère dominant et le problème de reproductibilité des résultats caractérisant les marqueurs RAPD justifient le recours récent des chercheurs à l'utilisation des marqueurs microsatellites SSR (simple sequence repeats) (Rallo et *al.* 2000) pour étudier et identifier les variétés d'olivier.

## **I. Polymorphisme moléculaire**

L'amélioration des plantes est basée sur une large utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiables de cette diversité dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent à la fois un diagnostic extrêmement fin de la variabilité et la mise en place de stratégies très rapides de création et sélection variétale (Adam et Dron, 1993). Ces marqueurs constitués des acides nucléiques sont utilisés il y a une vingtaine d'années dans le domaine de la connaissance des génomes végétaux et leur application à l'amélioration des plantes (De Vienne, 1990).

Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires, mais ce chapitre sera consacré aux RFLP, RAPD, Microsatellites ou SSR, ISSR et AFLP.

### ***1. Les marqueurs RAPD : Random Amplified Polymorphic ADN***

Le polymorphisme d'ADN amplifié au hasard ou RAPD est produit par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction; Réaction de Polymérisation en Chaîne), utilisant d'ADN

génomique, d'une amorce aléatoire courte d'environ 10 nucléotides et d'enzyme *Taq* polymérase (Welsh et McClelland, 1990; Williams et al, 1990).

Les fragments générés en nombre quasiment illimité, sont répartis dans tout le génome, non spécifiques de locus et dominants qui ne peuvent donc mettre en évidence l'état hétérozygote. Le polymorphisme observé se traduit par la présence ou l'absence de bande chez les différents génotypes (figure 12), En effet, l'amplification avec les marqueurs RAPD obéit à la loi de «tout ou rien» mettant en jeu des amorces très spécifiques (Adam et Dron, 1993). Les variations de séquences nucléotidiques entre les génomes, révélées par ces marqueurs, sont le résultat d'une modification (mutation ou insertion) au niveau de site de fixation de l'amorce (Park et al, 1991).

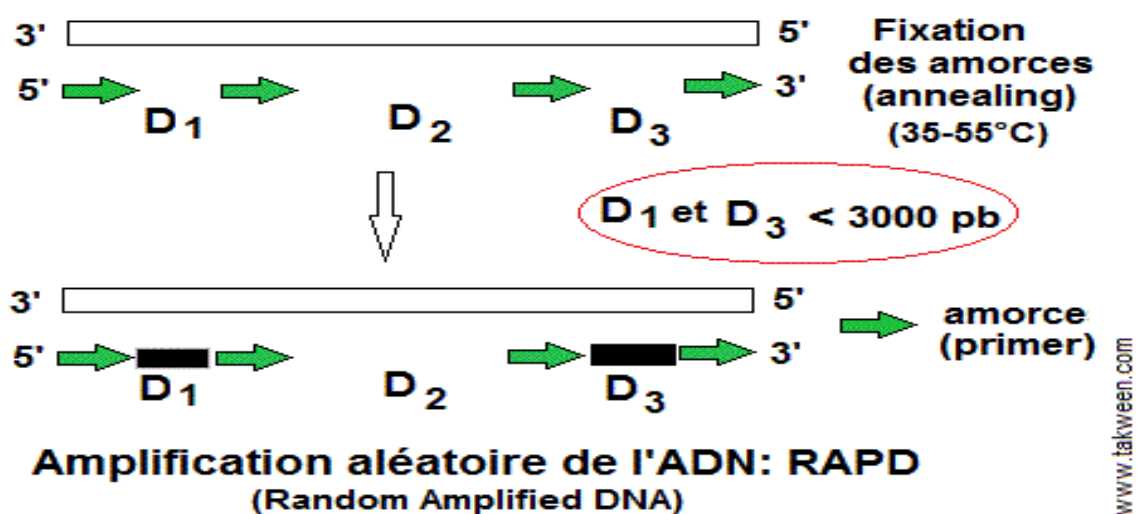


Figure 12 : amplification aléatoire de l'ADN : RAPD

La technique RAPD a été largement utilisée dans les études de diversité entre les différents cultivars d'oliviers. La première analyse a été effectuée sur onze cultivars par Bogani et al. (1994) en utilisant cinq amorces arbitraires riches en bases G et C. L'étude montre l'existence d'une diversité génétique entre les cultivars (J. Charafi, 2007).

## 2. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

La technique RFLP repose sur la digestion d'un DNA cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par le DNA. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un DNA sonde, provenant souvent de banques de DNA génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier (sonde hétérologue).

Cette technique a pour base l'utilisation des enzymes de restriction (endonucléase) sur des ADN en vue de détecter des séquences courtes spécifiques. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et ensuite transférés sur une membrane selon la procédure de southern blot (Southern, 1975). La taille des fragments est déterminée par hybridation des membranes avec des sondes (fragment d'ADN) marquées.

**Origines du polymorphisme de restriction (RFLP) :**

- Perte ou gain d'un site de restriction
- Mutation de type insertion-délétion

Dans les deux cas les locus sont généralement bialléliques et l'expression des allèles est codominances (figure 13).

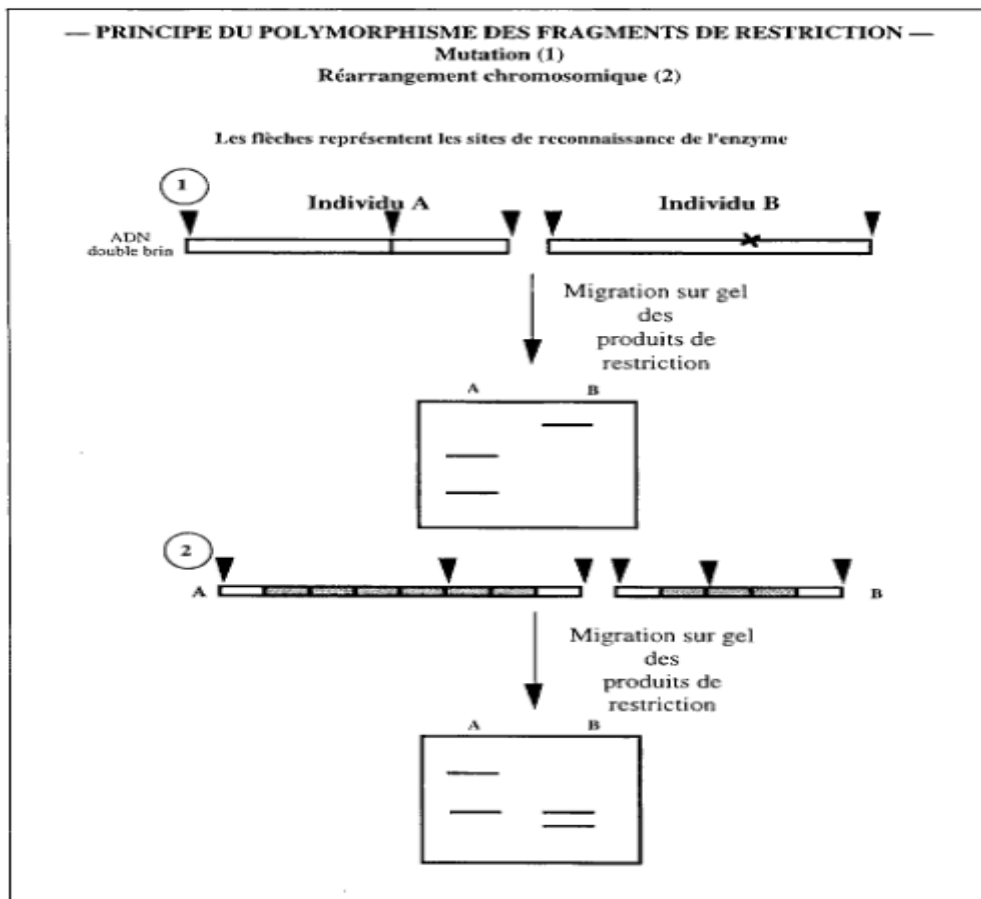


Figure 13 : Sources de polymorphisme d'ADN par le marqueur RFLP, 1 : dû à la disparition d'un site de restriction (mutations ponctuelles), 2 : dû à des mutations de type 'insertion-délétion'.

De nombreuses études génétiques ont été menées grâce à ce type de marqueur surtout chez plusieurs espèces de plantes, comme *Brassica* spp., par Song et al., (1990) et par Förster et Knaak (1995), la tomate par Miller et Tranksley (1990), le blé (*Triticum, Aegilops*) par Gill et

*al.*, (1992), Dubcovsky *et al.*, (1996) et par Mingeot et Jacquimin (1999), le tremble (*Populus* spp.) par Liu et Furnier (1993), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par Cornique et Mercier (1994), et l'olivier (*Olea europaea*) par Khadari *et al.*, (2003). (KONATE, 2007).

### 3. ISSR: Inter-Simple Sequence Repeat

Les marqueurs ISSR, liés aux séquences ou nucléotides de l'espace présent entre les séquences simples répétées (SSRs) dans le génome, sont basés sur le polymorphisme de taille de 200 à 2500pb le long de ces espaces inter-microsatellites (figure 14) amplifiables par une seule amorce PCR (Zietkiewicz *et al.*, 1994). En générale, les locus microsatellites sont régulièrement distribués en grand nombre à travers le génome d'eucaryote, fournissant ainsi un pool riche en potentiels marqueurs ISSR convenables pour révéler la diversité génétique.

En effet, cette amplification ISSR est définie par variation des PCR qui utilisent des amorces à simple séquence répétée comme  $[AC]_n$ , pour amplifier les régions situées entre les séquences microsatellites, le polymorphisme dépend ici du nombre d'unités de répétitions. L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissances particulières des séquences d'ADN (Charafi, 2007).

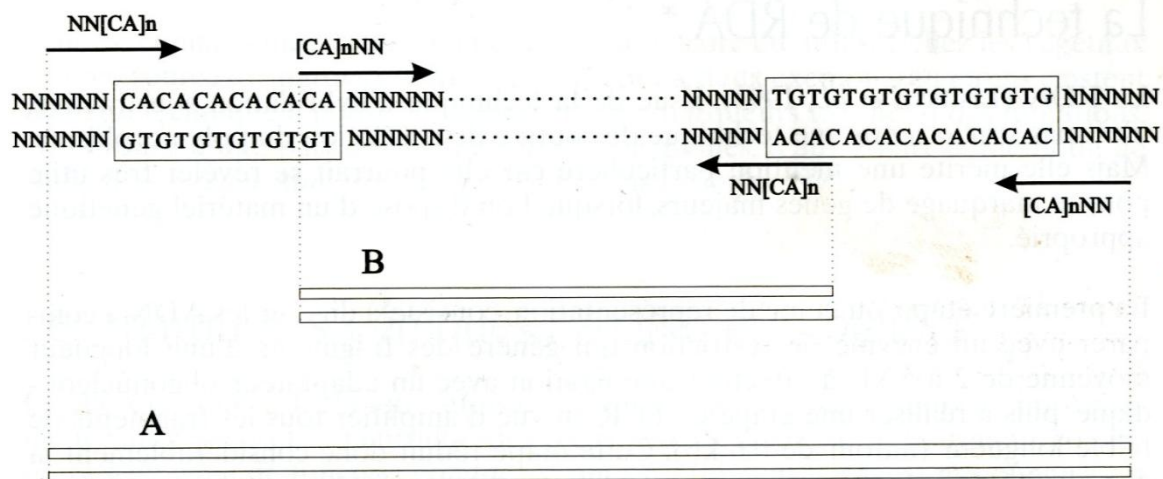


Figure 14: principe de l'ISSR. Si les bases arbitraires de l'amorce sont du côté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du côté 3' le produit B (D. de Vienne, 1998)

Cette technique de marquage moléculaire est utilisée dans les études sur les processus de domestication, d'introduction dans l'île de canaries et aussi pour montrer les relations génétiques étroites entre les sous-espèces d'*olea europaea* et aussi pour étudier les relations phylogénétiques entre l'olivier et l'oléastre, Ce type de marquage de marquage a été

également utilisé dans l'évaluation de la diversité génétique de la variété clonale « *Galega Vulgar* » largement cultivée au Portugal (Charafi, 2007).

#### **4. AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism**

La technique **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. On distingue les étapes suivantes :

- ❖ L'ADN génomique est coupé par deux enzymes de restriction.
- ❖ Des adaptateurs de séquences connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées, sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification.
- ❖ Une première amplification (pré-amplification) est réalisée à l'aide d'amorces de séquences complémentaires à la séquence des adaptateurs et des sites de restriction.
- ❖ La deuxième amplification (amplification sélective) utilise des amorces identiques aux premières mais prolongées à l'extrémité 3' de quelques nucléotides arbitraires (de 1 à 3 nucléotides). Ainsi, seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine.
- ❖ Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de l'amplification sélective.

C'est la combinaison enzyme de restriction/amorce qui permet de révéler le polymorphisme entre les individus. Elle constitue donc le marquage de type AFLP (figure 15).



Figure 15 : principe de marqueurs moléculaire AFLP (Denis TAGU, 1999)

Les AFLP ont été largement utilisés dans l'étude de plusieurs plantes cultivées, comme l'orge (Becker *et al.*, 1995), le riz (Mackill *et al.*, 1996). Ces marqueurs ont permis de révéler quatre fois plus de polymorphisme que les marqueurs RAPD et ISSR et aussi de séparer les espèces du nouveau monde et ceux de l'ancien monde.

### 5. *Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats)*

Les **microsatellites** ou **SSR** (Morgante, Olivieri, 1993). Ils sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem. Les plus courants sont (A)<sub>n</sub>, (TC)<sub>n</sub>, (TAT)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite (figure 16). Les séquences flanquant ces éléments répétés permettent de définir les amorces qui seront utilisées pour l'amplification PCR. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel

d'acrylamide. C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur (D.de Vienne, 1998).

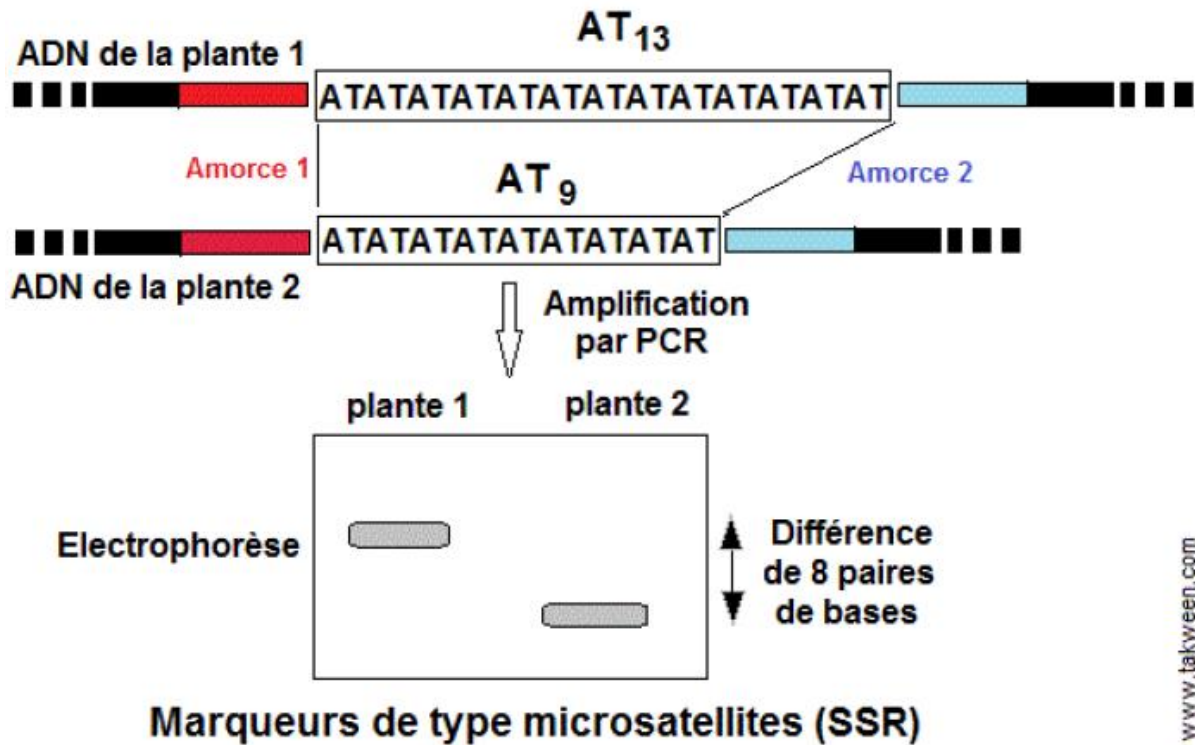


Figure 16 : principe de marqueurs de type microsatellites (SSR) (D.de Vienne, 1998).

Les marqueurs microsatellites sont fréquemment utilisés en génétique des populations pour des études portant sur la diversité ou la gestion des ressources naturelles et aussi la cartographie génétique.

Comme pour de nombreuses espèces, des microsatellites ont été développés chez l'olivier. Les travaux axés sur le développement des microsatellites chez cette espèce sont relativement limités, ceci peut être expliqué par la complexité du génome de l'olivier (J. Charafi, 2007).



## *Partie II : Matériel et Méthodes*

### **I. La zone d'étude**

La zone de Zerhoun est connue par ses oliveraies ancestrales. En effet, des oliviers plusieurs fois centenaires sont présents dans la région et les vestiges de Volubilis regorgent de traces d'activités liés à l'oléiculture et l'oléotechnie. Dans ce patrimoine, des travaux, dont ceux de Lansari et Tahiri (1996) ont révélés l'existence d'une variabilité importante.

### **II. Matériel végétal**

L'étude concerne des arbres d'olivier qui ont été présélectionnés après une prospection dans le patrimoine oléicole locale de la zone de Moulay Driss. La prospection a été entamée en 2005 par l'équipe olivier du Centre Régional de la Recherche Agronomique de Meknès. Le but était de sélectionner des géotypes locaux performants d'olivier pour chaque zone agro-climatique du Maroc. Ainsi et avec l'appui des agents de développement et du savoir faire locale, des arbres intéressants pour la culture (production importante et assez constante, teneur en huile élevée, tolérance à la sécheresse) ont été repérés et suivis in situ durant plusieurs années.

Les arbres concernés par la présente étude sont au nombre de 20 (tableau 2), répartis dans toute la zone de Zerhoun de Oued Khoumane à Zeggouta. Pour avoir une base de comparaison, nous avons utilisé les variétés marocaines Picholine marocaine, Haouzia et Menara. Les données présentées concernent les trois dernières campagnes (2011-12, 2012-13 et 2013-14).

Tableau 2 : Génotypes suivis pour la présente étude

Génotypes	Conduite	Greffé	Génotypes	Conduite	Greffé
ATIR1	Pluviale	Non	AS-4	Pluviale	Non
ATIR2	irriguée	Non	AS-5	Pluviale	Oui
ATIR3	Pluviale	Non	AS-6	Pluviale	Non
ATIR4	Pluviale	oui	A-1	Pluviale	Non
ATIR5	Pluviale	Non	A-2	Pluviale	Non
OH 6	Pluviale	Non	A-3	Pluviale	Non
OH 7	Pluviale	Non	A-4	Pluviale	Oui
OH 8	Pluviale	Non	A.O.1	Pluviale	Non
OH 8'	Pluviale	Non	PM	Pluviale	Non
AS-1	Irriguée	Non	HZ	Pluviale	Non
AS-2	Irriguée	Non	MR	Pluviale	Non
AS-3	Irriguée	Non			

### *III. Caractérisation agronomique des génotypes de Moulay Driss*

**III.1. Production par arbre :** Chaque année, la production en olives des arbres est pesée juste après la récolte.

**III.2. Teneur en huile :** des échantillons d'olives sont prélevés à pleine maturité chaque année pour déterminer la teneur en huile par RMN.

**III.3. Poids des fruits :** les fruits prélevés sont pesés

**III.4. Période de floraison :** sont notés les dates de début, pleine et fin floraison pour chaque individus.

**III.5. Pollinisation :** Pour évaluer les pourcentages de nouaison de chaque génotype, des rameaux, au stade croix, ont été marqués et les fleurs qu'ils portent sont comptées :

- **Autopollinisation :** le taux d'autopollinisation a été évalué. Quatre rameaux par arbres ont été ensachés avant l'ouverture des fleurs. A la nouaison, le nombre de fleurs nouées est compté.
- **Interpollinisation :** Quatre rameaux de chaque arbre ont été ensachés au stade croix.

Avant l'ouverture des fleurs, du pollen de *Haouzia* est introduit dans les sachets. A la nouaison, le nombre de fruits formés est observé.

- **Pollinisation libre** : les rameaux marqués sont suivis sans être ensachés

#### ***IV. Caractérisation moléculaire des génotypes de Moulay Driss***

##### ***1. Extraction de l'ADN***

L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant la méthode **CTAB** (CetylTrimethyl Ammonium Bromide) de Saghai-Marroof *et al.* (1984) modifiée. En effet, 40 mg de feuilles lyophilisées sont finement broyées dans 1,250 ml du tampon de lyse (2% CTAB ; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) ; 25 mM EDTA ; 1,5 M NaCl ; 10 mM  $\beta$  mercaptoéthanol ; 1 % (v / v) PVP 40000). Le broyat est ensuite transféré dans un tube de 2 ml puis incubé à 65°C pendant 60 min en passant par le vortex toute les 15 min. La préparation a subi deux lavages avec 500 $\mu$ l de la solution de chloroforme/alcool-isoamylique (24/1 v / v). Chaque étape de lavage est suivie d'une centrifugation à 13000 tour/min pendant 15 et 10 min respectivement à 25°C. Dans le tube de 1,5 ml où le dernier surnageant est récupéré, un volume de 500 $\mu$ l d'isopropanol froid est additionné puis incubé dans la glace pendant 30 min. Après centrifugation à 13000 Tours/min pendants 10 min à 4°C, le culot d'ADN est lavé avec l'éthanol froid (70%) puis séché sous vide. Il est ensuite ré-suspendu dans 100  $\mu$ l de TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA). La quantité d'ADN génomique est estimée par spectrophotométrie et un teste avec le gel d'agarose a été effectué pour vérifier la présence d'ADN dans les échantillons.

##### **2. Marqueurs moléculaires utilisés**

La caractérisation moléculaire a été faite au laboratoire de l'Unité de Recherche : Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto- Génétiques (UR-APCRG) de l'INRA-Meknès à l'aide de 6 locus microsatellites (tableau 3) qui ont été choisis parmi 15 locus utilisés dans les travaux de Charafi 2007, Khadari *et al.* (2008) et Charafi *et al.* (2008).

Tableau 3 : Six amorces SSR utilisées comme clé d'identification variétale d'olivier

locus	séquences	Température d'hybridation(C°)
DCA3	F : 5'-CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC-3' R : 5'-TGCTTTTGTCTGTGTTTGAGATGTTG-3'	50
DCA5	F : 5'-AACAAATCCCATACGAACTGCC-3' R : 5'-GTGTTGCTGTGAAGAAAATCG-3'	50
UDO12	F : 5'-TCACCATTCTTAACTTCACACCA-3' R : 5'-TCAAGCAATTCCACGCTATG-3'	57
GAPU59	F : 5'-CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA-3' R : 5'-CAAAGGTGCACTTTCTCTCG-3'	57
GAPU71A	F : 5'-GATCATTTAAAATATTAGAGAGAGAGA-3' R : 5'-TCCATCCATGCTGAACTT-3'	57
GAPU71B	F : 5'-GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA-3' R : 5'-ACAACAAATCCGTACGCTTG-3'	57

### 3. Conditions de la PCR et d'électrophorèse

Les conditions d'amplification sont les suivantes : une première dénaturation à 94 °C pendant 5 min suivie de 35 cycles successifs. Chaque cycle comprend une succession de trois phases : une dénaturation à 94 °C pendant 1min, une phase d'hybridation à la température optimale 55 ou 57 °C selon l'amorce (Tableau 3) pendant 1min et une élongation à 72 °C pendant 1 min. Enfin, une dernière étape d'élongation à 72 °C pendant 5 min est programmée et une phase de refroidissement à 4 °C. Le volume réactionnel utilisé pour chaque échantillon de 25µl contient 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, 1 U de la Taq polymérase, 15ng/µl d'ADN et 2,5 µl de Tampon 10X.

L'électrophorèse a été effectuée sur gel de polyacrylamide. Cette technique permet de séparer des fragments d'ADN même avec une seule base nucléotidique de différence, tel le cas des marqueurs microsatellites (Morgante&Olivieri, 1993). La solution de polyacrylamide à 6 % a été préparée à partir d'une solution à 40 % d'acrylamide : bisacrylamide (19 :1), q, 7,5 M d'urée et de TBE 5X. Ces trois solutions sont mélangées et chauffées jusqu'à la dissolution complète de l'urée. La réaction de polymérisation proprement dite s'est faite grâce à l'ajout de

deux substances réactives : le TEMED et le persulfate d'ammonium. La migration a été faite pendant 2 h sous une puissance de 60 W. La coloration s'est faite selon les étapes signalées par Benbouza et *al.* (2006).

#### 4. *Analyses des données*

A partir des allèles obtenus, pour chaque locus, l'hétérozygotie observée et l'indice de fixation ( $F_{is}$ ) ont été calculés en utilisant le logiciel de génétique GENETX 4.0 (Belkhir, 1999).

Avec l'étude des distances génétiques (Nei et Li, 1979) un histogramme de comparaison des individus en fonction des nombres d'allèles qui les distinct a été établi. Un autre histogramme qui compare la variété Picholine marocaine aux autres génotypes a été aussi établi. Un dendrogramme de classification ascendante hiérarchique a été construit sur la base de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic mean) et le coefficient de similarité de jacquard. La construction a été faite par le programme Clustering Calculator. Une analyse factorielle de correspondances (AFC) a été effectuée à l'aide de logiciel GENETX 4.0.

$$\diamond F_{is} = (H_e - H_o) / H_e$$

## *Partie III : Résultats et discussion*

### *I. Caractérisation agronomique des géotypes de Moulay Driss*

#### **1. Production en olives**

La production en olives des arbres suivis était très importante, c'est d'ailleurs l'un des critères de leur sélection. Toutefois, il est incorrect de les comparer les uns aux autres vue la différence de milieu, de conduite, d'âge et de taille des arbres. Ce critère servira juste à donner une indication sur les potentialités de chaque individu (tableau 4).

Tableau 4: Production moyenne des trois dernières années des individus étudiés

Géotypes	Production des arbres (kg)			
	2013-14	2012-13	2011-12	Moyenne
ATIR1	150	130	100	126,7
ATIR2	120	150	95	121,7
ATIR3	80	100	70	83,3
ATIR4	70	85	80	78,3
ATIR5	150	130	100	126,7
OH 6	180	150	125	151,7
OH 7	65	85	60	70
OH 8	75	75	65	71,7
OH 8'	80	120	85	95
AS-1	100	125	95	106,7
AS-2	120	120	115	118,3
AS-3	120	135	105	120
AS-4	125	135	100	120
AS-5	130	140	105	125
AS-6	125	150	100	125
A-1	130	125	110	121,7
A-2	145	130	120	131,7
A-3	90	105	85	93,3
A-4	85	100	65	83,3
A.O.1	90	110	85	95
PM	120	110	95	108,3
HZ	80	95	75	83,3
MR	125	135	100	120

## 2. Teneur en huile

Les analyses d'huile des 23 génotypes ont permis de relever des différences entre les individus durant les trois années de suivi (figure 18).

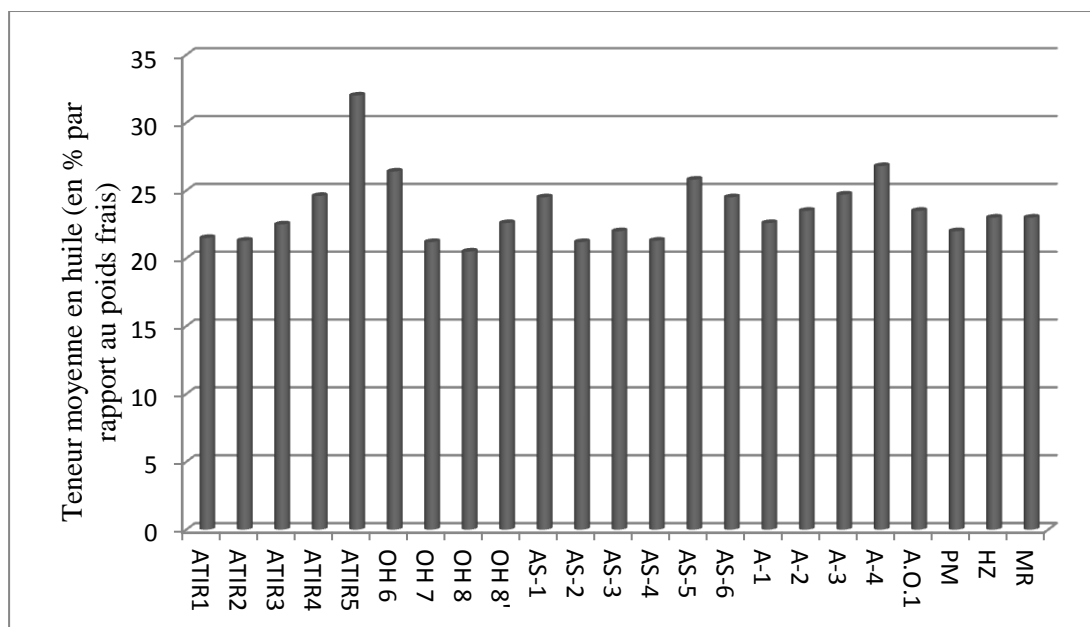


Figure 17 : Teneur moyenne en huile (en % par rapport au poids frais) des 23 génotypes étudiés.

L'analyse statistique a permis de dégager trois groupes. Le premier renferme les génotypes (ATIR1, ATIR2, ATIR3, OH 7, OH 8, OH 8', AS-2, AS-3, AS-4, A-1 et PM). Ces individus ont une teneur moyenne en huile de l'ordre des valeurs de la *Picholine marocaine* (PM) (20,5 à 22,6%).

Le deuxième groupe est composé des individus (ATIR4, AS-1, AS-6, A-2, A-3, A.O.1, HZ, et MR) qui ont des teneurs moyennes similaires à celles de Haouzia et Menara (23 et 24,6%).

Le troisième groupe (ATIR5, OH 6, AS-5 et A-4) est celui des individus qui ont des teneurs moyennes en huile supérieures à celles des trois témoins. Ces teneurs ont varié de 25,8 à 32%. Dans ce groupe, se trouvent les deux individus greffés sur oléastre (A4 et AS-5) ce qui pourrait indiquer que le porte greffe, dans ce cas, a un effet bénéfique sur la production d'huile.

Deux des individus irrigués (AS-2 et AS-3) sont dans le premier groupe et dans le deuxième groupe (AS-1). Toutefois, il est difficile de déduire l'effet de l'irrigation sur ce

facteur avec le protocole de l'essai puisque ATIR2 qui est une variété irriguée, possède une teneur moyenne en huile faible.

### **3. Poids moyen des fruits**

Le poids moyen des fruits (tableau 5) a varié entre les individus et entre les années. En effet, en plus du côté génétique, les conditions climatiques et la charge des arbres a aussi une influence sur le grossissement des olives. Tous ont un poids égal ou supérieur à celui de la PM. L'analyse statistique a permis de distinguer cinq groupes (tableau 5).

- Le premier contenant : ATIR3 avec 4,6g par fruit en moyenne
- Le deuxième : ATIR4, OH6, OH7, OH8, AS-4, AS-5, AS-6, A-4 et AO1 avec des valeurs de 3,9g à 4,3g.
- Le troisième : ATIR2, AS-1 et A-3 avec une moyenne de 3,7g.
- Le quatrième : AS-2, AS-3, A-1, A-2, HZ et MR dont la moyenne est de 3,4g à 3,6g.
- Le dernier : PM, OH8', ATIR5 et ATIR1 avec 3,2g.



Tableau 5: Poids moyen des olives des génotypes étudiés

Génotypes	Poids moyen des fruits (g)
ATIR1	3,2 d
ATIR2	3,7 bc
ATIR3	4,6 a
ATIR4	3,9 b
ATIR5	3,2 d
OH 6	4,1 b
OH 7	3,9 b
OH 8	4,3 b
OH 8'	3,2 d
AS-1	3,7 bc
AS-2	3,6 c
AS-3	3,5 c
AS-4	3,9 b
AS-5	3,9 b
AS-6	4,2 b
A-1	3,6 c
A-2	3,5 c
A-3	3,7 bc
A-4	4,2 b
A.O.1	3,9 b
PM	3,2 d
HZ	3,4 c
MR	3,4 c

a, b, c et d : représentent les groupes de classification

Le génotype ATIR 3, conduit en pluvial, a les fruits les plus gros (4,6g). Les autres individus irrigués ont aussi des fruits assez gros mais non supérieurs au reste.

#### 4. Période de floraison

La floraison a lieu en général entre avril et mai (tableau 6). Le chevauchement des périodes a été noté durant toutes les années de suivi. Ceci est intéressant pour assurer une bonne

pollinisation surtout que l'olivier est allogame. La longueur des périodes de floraison est différente selon le génotype. Les génotypes qui ont enregistré les périodes les plus étendues sont la PM et AS-6 avec presque un mois, suivis d'OH7 et AO1 avec 27 et 26j respectivement. Les périodes les plus courtes sont celles de MR avec seulement 14j suivi de OH8 avec 15j et Haouzia et ATIR1 avec 16j. Des périodes de floraison courtes conduisent à une maturation regroupée sur tout l'arbre et facilitent ainsi la récolte des olives aux stades de maturité optimum. Les floraisons étalées dans le temps conduisent à une maturation échelonnée, mais en revanche sont louables certaines années lors d'accidents climatiques tels le chergui ou des temps pluvieux ou brumeux lors de la floraison. Ces accidents rendent difficile ou même impossible la pollinisation, mais si la floraison est échelonnée, les fleurs encore fermées sont protégées et permettraient de sauver la production.

Tableau 6: Périodes moyennes de floraison des géotypes étudiés

<b>Géotypes</b>	<b>Début</b>	<b>Pleine</b>	<b>Fin</b>	<b>Nbre Jours</b>
ATIR1	19-avr	30-avr	05-mai	16 d
ATIR2	12-avr	25-avr	30-avr	19 d
ATIR3	15-avr	25-avr	05-mai	20 c
ATIR4	20-avr	30-avr	12-mai	22 c
ATIR5	25-avr	05-mai	15-mai	20 c
OH 6	15-avr	25-avr	02-mai	17 d
OH 7	05-avr	20-avr	02-mai	27 b
OH 8	20-avr	30-avr	05-mai	15 d
OH 8'	14-avr	26-avr	05-mai	21 c
AS-1	16-avr	25-avr	10-mai	25 b
AS-2	20-avr	28-avr	10-mai	21 c
AS-3	16-avr	25-avr	05-mai	20 c
AS-4	12-avr	25-avr	05-mai	24 b
AS-5	10-avr	20-avr	02-mai	23 c
AS-6	10-avr	25-avr	10-mai	31 a
A-1	12-avr	25-avr	02-mai	21 c
A-2	15-avr	28-avr	10-mai	26 b
A-3	12-avr	22-avr	5-mai	24 b
A-4	18-avr	25-avr	10-mai	23 c
A.O.1	10-avr	22-avr	5-mai	26 b
PM	10-avr	25-avr	10-mai	31 a
HZ	15-avr	20-avr	30-avr	16 d
MR	18-avr	22-avr	2-mai	14 d

A, b, c et d : représentent les groupes de classification

## 5. Pollinisation :

Le pourcentage de fleurs nouées (tableau 7), même en autopolinisation a été supérieur à 5%, seuil pour une production satisfaisante surtout pour les olives de trituration. Pour les olives de table un pourcentage de 1% est suffisant pour avoir de gros fruits. Les individus avérés autocompatibles et qui ont donné les plus grands pourcentages de nouaison en autopolinisation, sont couronnés par A-4 qui a enregistré 15% de fleurs nouées. Un chiffre presque trop important qui pourrait conduire à une très forte charge de l'arbre et donc à des fruits de petits calibres. Mais durant les trois dernières années la moyenne du poids du fruit était satisfaisante avec 4,2g. Les individus OH7, AS-1 et AS-3 ont aussi un pourcentage élevé en autopolinisation (12%). Les arbres qui ont les plus faibles pourcentages sont AS-5 (5%) et ATIR2 (6%). Ces données sont à vérifier en fin de campagne par le taux de fertilité (% fruits murs par rapport au nombre initial de fleurs).

La pollinisation a été très améliorée avec l'apport du pollen de Haouzia surtout pour les arbres OH8' (11% de plus qu'en autopolinisation), AS-5 (10%) et A-2 et ATIR 3 (9%). Quelques individus ont marqués une plus grande amélioration de la pollinisation en conditions libres par rapport à l'autopolinisation, ce qui indiquerait qu'ils sont entourés par des pollinisateurs avec lesquels ils auraient développé plus d'affinité. Dans ce groupe s'identifie AS-6 qui gagne 10% par rapport à l'autopolinisation et 2% par rapport à Haouzia, A-3 a enregistré une hausse de 9% par rapport à l'autopolinisation et 10% avec Haouzia, AS-5 et OH8' ont gagné 7% par rapport à l'autopolinisation.

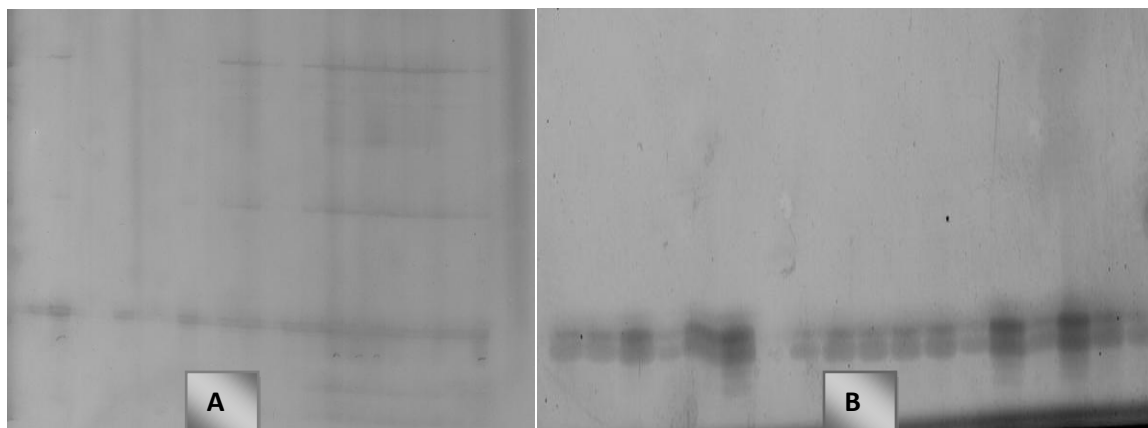
Cette étude sera révérifié sur plusieurs années *in situ* et en collection et au Domaine Expérimental de Ain Taoujdate, en tenant compte de tous les facteurs de production ainsi que des facteurs climatiques pour plus de précision et ainsi sortir avec des combinaisons de pollinisation pour chaque arbre.

Tableau 7 : Nombre moyen et pourcentage de fleurs nouées en autopolinisation, en interpollinisation avec Haouzia et en pollinisation libre

Géno- types	Autopolinisation			Inter Pollinisation avec Haouzia			Pollinisation libre		
	Nbr initial fleurs	Fleurs nouées	%	Nbr initial fleurs	Fleurs nouées	%	Nbr initial fleurs	Fleurs nouées	%
ATIR1	56	4	8	65	8	12	46	4	8
ATIR2	76	5	6	74	10	14	76	6	8
ATIR3	53	4	7	54	9	16	56	6	10
ATIR4	45	4	9	86	10	12	87	8	9
ATIR5	39	4	10	63	7	11	65	9	14
OH 6	78	7	9	92	15	16	47	6	12
OH 7	67	8	12	76	13	17	64	9	14
OH 8	83	7	9	63	8	12	76	11	14
OH 8'	56	4	8	59	11	19	54	8	15
AS-1	67	8	12	68	8	12	65	10	15
AS-2	45	4	9	59	9	15	76	10	13
AS-3	56	7	12	78	13	17	87	12	14
AS-4	67	5	8	73	10	14	65	8	13
AS-5	87	6	7	59	10	17	54	8	14
AS-6	45	2	5	68	8	12	84	13	15
A-1	67	8	12	74	10	13	65	8	12
A-2	89	8	9	83	15	18	76	11	14
A-3	65	5	8	70	5	7	59	10	17
A-4	78	12	15	68	10	15	76	10	13
A.O.1	84	7	8	86	8	9	79	10	13

## *II. Caractérisation moléculaire des génotypes de Moulay Driss*

L'utilisation de 6 locus SSR dans la caractérisation des génotypes locaux d'olivier de Moulay Driss Zerhoun montre la présence de 40 allèles (exemples de gels d'acrylamides obtenus : figure 19).



*Figure 18 : profils génomiques SSR générées par l'amorce DCA5 (A) et UDO12 (B) sur les génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun.*

Le nombre d'allèles obtenus varie de 5 allèles (GAPU59) à 8 (UDO12 et GAPU71B) par locus avec une moyenne de 6 allèles par locus. La taille des allèles varie de 119 pb chez le locus GAPU71B jusque 226 pb chez DCA5 (Tableau 1)

Les fréquences alléliques varient de 0,0217 à 0,478 avec une moyenne de 0,151 (Tableau 9). L'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) a varié de 0,695 pour le locus UDO12 à 0,810 pour le locus GAPU71B. L'hétérozygotie observée ( $H_0$ ) s'est situé entre 0,174 pour le locus DCA5 et 1,000 pour DCA3, GAPU59 et GAPU71B avec une moyenne de 0,717 (tableau 1). Pour les locus GAPU59, DCA3 et GAPU 71B le coefficient de fixation  $F_{is}$  est négatif ce qui montre que les génotypes de la collection présentent un excès d'hétérozygotie pour ces locus. Tandis-que pour les trois autres locus le coefficient  $F_{is}$  est positif avec une probabilité significative de la déficience d'hétérozygotes (Tableau 8).

Tableau 8 : Allèles observés et paramètres de diversité obtenus avec les 6 locus SSR chez les 23 individus d'olivier

Locus	Classe de taille	N	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>is</sub>
DCA3	228-259	7	1,0000	0,7344	-0,342
GAPU59	211-227	5	1,0000	0,7599	-0,296
GAPU71A	209-245	6	0,6957	0,7921	0,144
DCA5	191-213	6	0,1739	0,7628	0,781
UDO12	154-164	8	0,4348	0,6947	0,393
GAPU71B	119-141	8	1,0000	0,8100	-0,213

N : nombre d'allèles ; H<sub>0</sub> : hétérozygoties observés ; H<sub>e</sub> : hétérozygotie attendues ; F<sub>is</sub> : indice de fixation

Tableau 9 : fréquences alléliques obtenus dans les 23 individus d'olivier

Locus	Allèles (pb)	Fréquences	Locus	Allèles	Fréquences
DCA3	178	0,0435	GAPU71A	200	0,0435
	184	0,3478		204	0,1087
	187	0,1087		207	0,2391
	196	0,0435		210	0,2391
	202	0,0217		214	0,2609
	206	0,3478		217	0,1087
	208	0,0870			
GAPU59	207	0,0870	DCA5	192	0,0217
	210	0,1739		196	0,0652
	214	0,3043		210	0,1304
	217	0,3043		214	0,2174
	221	0,1304		218	0,2174
UDO12	150	0,0217	GAPU71B	226	0,3478
	152	0,0435		119	0,0870
	154	0,4783		122	0,3261
	156	0,2391		124	0,0435
	158	0,1087		126	0,0435
	160	0,0652		133	0,1739
	162	0,0217		135	0,1522
	164	0,0217		137	0,1304
		140	0,0435		

L'utilisation des 6 locus SSR a permis de distinguer entre les 23 individus qui représentent chacun un génotype distinct. La comparaison deux à deux entre les génotypes de la collection

a montré que les plus proches sont distincts par 3 et 4 allèles, tandis que les plus éloignés diffèrent par un maximum de 20 allèles (figure 20).

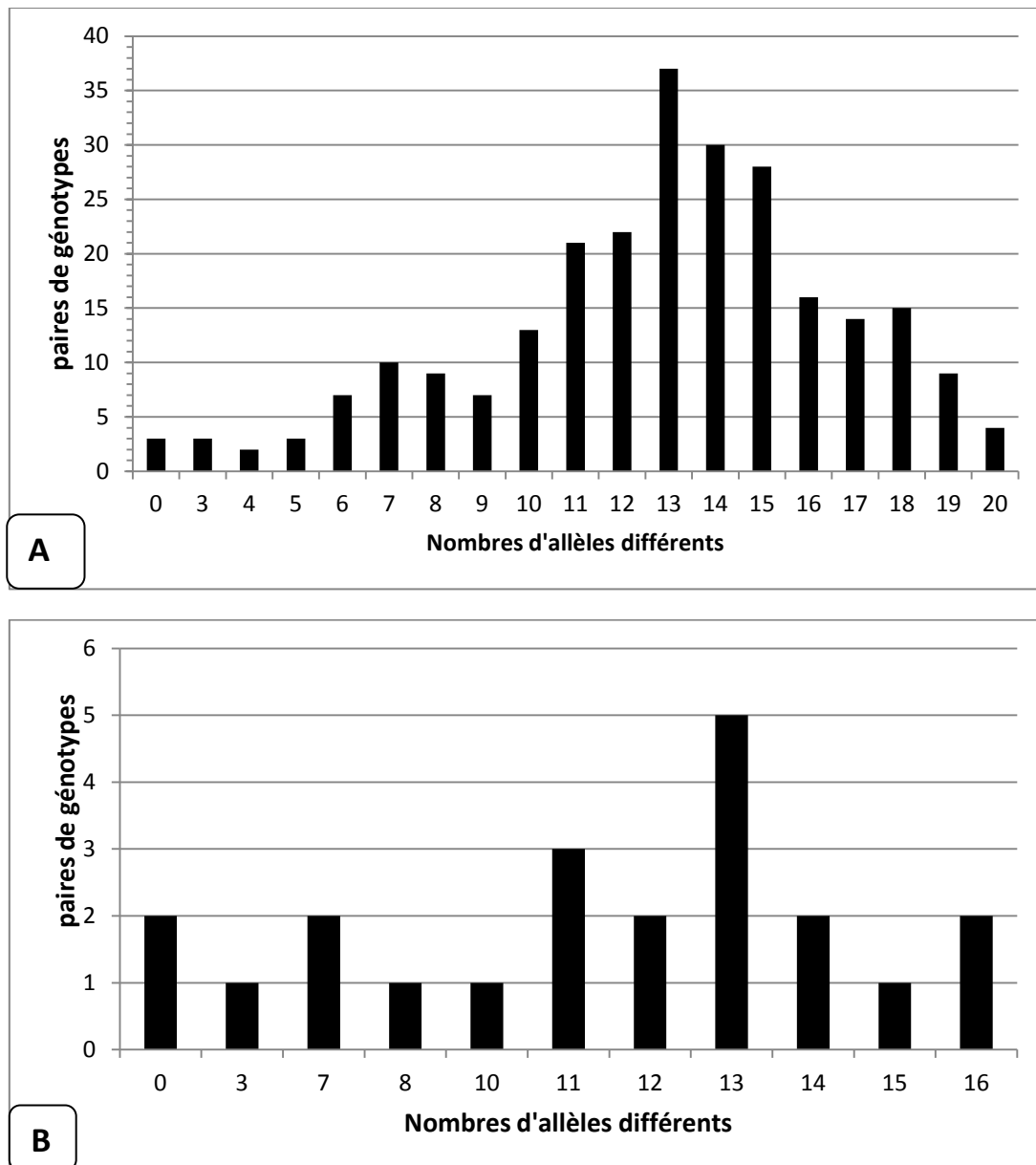


Figure 19 : Distribution des fréquences de la dissemblance génétique pour toutes les combinaisons deux à deux entre les 23 génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun (A) et le profil de comparaison entre les 22 génotypes et la variété Picholine marocaine (B)

Parmi les 250 comparaisons par paires, seulement 30 ont été différenciés par moins de 8 allèles, les autres paires ont été distingués par 9 à 20 allèles.

La comparaison entre la variété *Picholine marocaine* et les autres 22 génotypes montrent que les génotypes les plus proches à cette variété diffèrent par 3 à 8 allèles, ces génotypes



présentent des similarités avec la variété *Picholine marocaine*. *Haouzia et Menara*, clones de la *picholine marocaine*, sont dans ce groupe. Les génotypes qui ont 10 à 16 allèles différents du témoin sont des génotypes plus éloignés de cette variété.

La similarité moyenne entre les 23 génotypes étudiés est de 25,3%. En effet, le dendrogramme engendré par l'analyse statistique basée sur la méthode UPGMA, montre une diversité génétique entre les 23 individus (figure 21). Le dendrogramme a permis de distinguer entre deux grands groupes (A et B) qui incluent chacun 10 et 9 génotypes respectivement.

Une analyse factorielle de correspondances nous a donné une structure similaire à celle du dendrogramme. Le graphe de l'AFC représenté par les axes 1, 2 et 3 (18,97%, 14,43% et 10,68%) de la variance respectivement, présente deux groupes (figure 22). Cette distinction de deux groupes montre que les 23 génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun appartiennent à des pools génétiques différents.

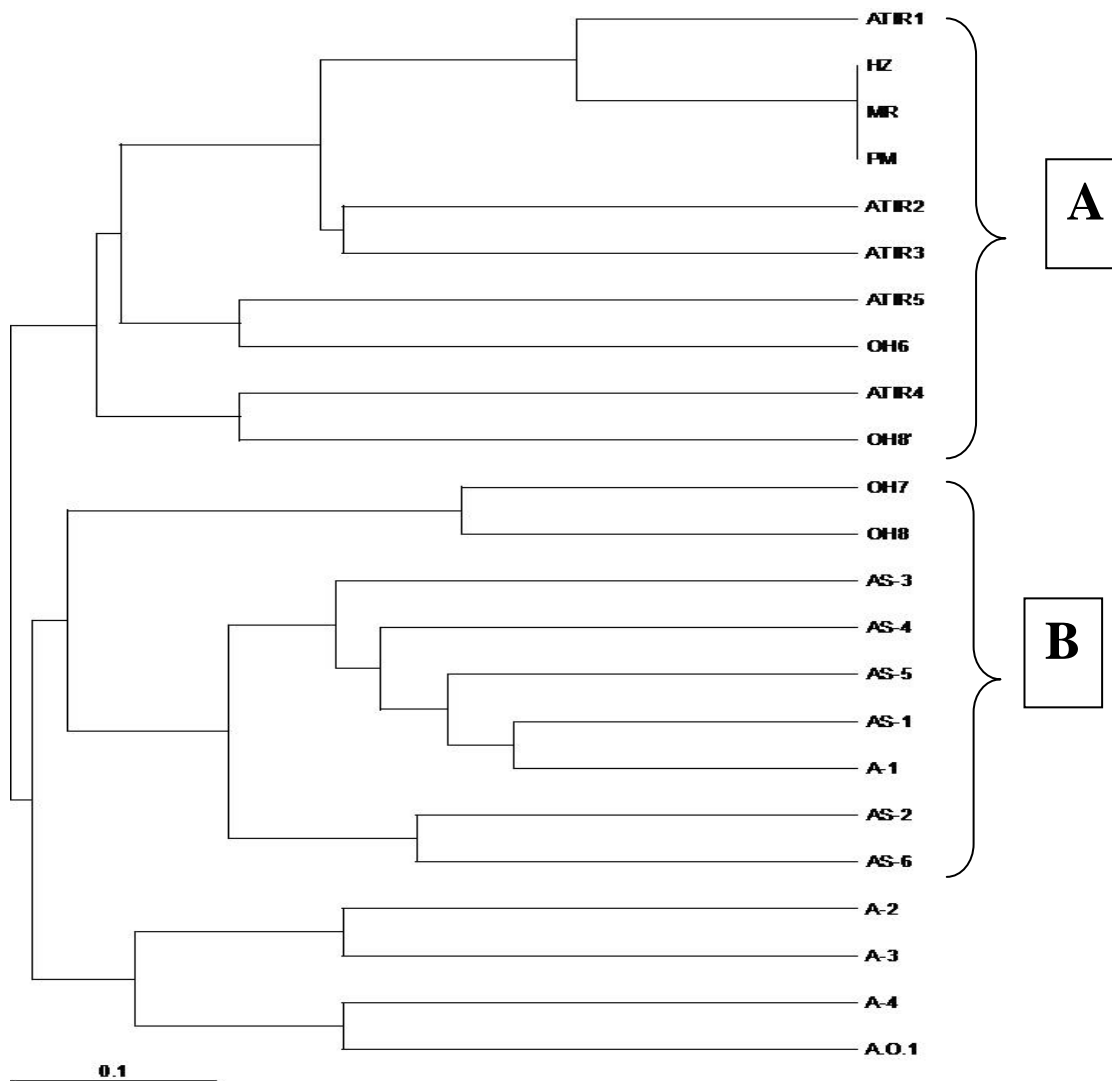


Figure 20 : arbre phylogénétique entre les 23 individus d'olivier de Moulay Driss Zerhoun basée sur la méthode UPGMA et le calcul des distances.

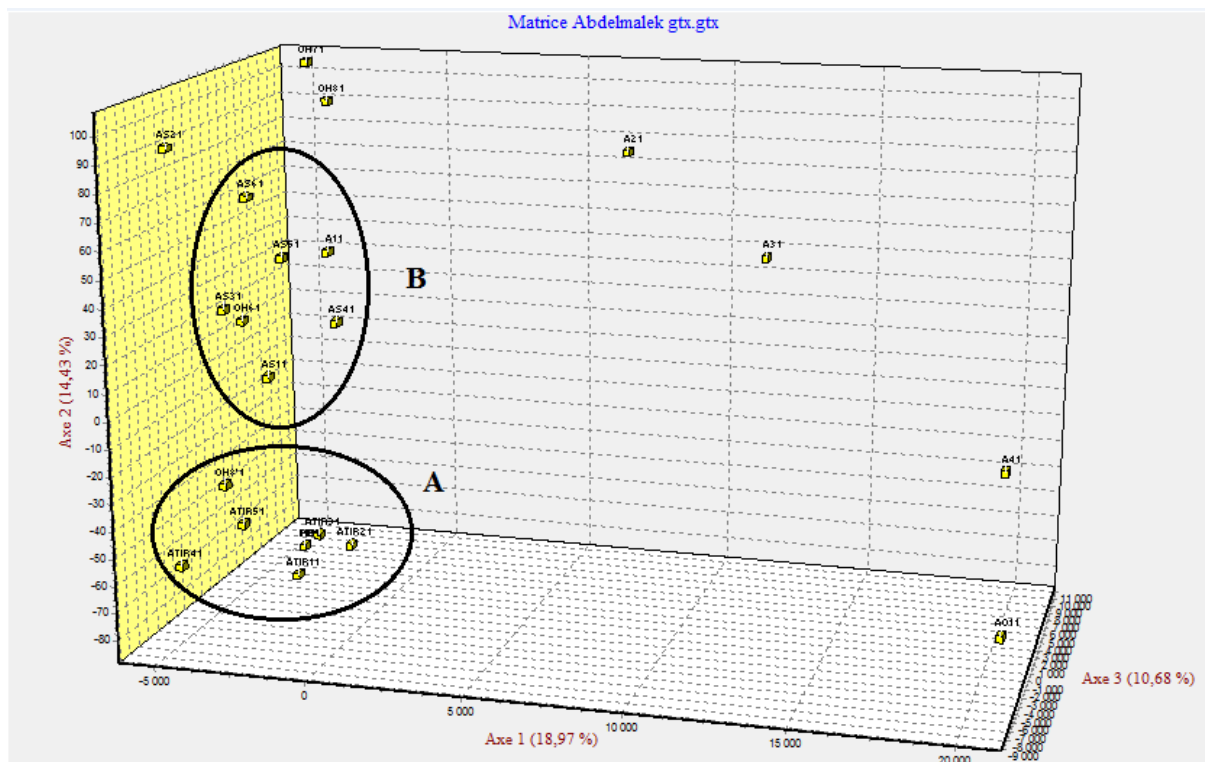


Figure 21 : Répartition des génotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun dans le plan défini par les axes 1, 2 et 3 de l'AFC de l'analyse par les marqueurs SSR

Le groupe A regroupe des génotypes qui ont une distinction allélique faible avec la variété Picholine marocaine, surtout le génotype ATIR1 qui a juste 3 allèles de différence. Pour les autres génotypes comme ATIR2, ATIR5 et ATIR3 le nombre d'allèles de différence est de 3 à 8 ce qui explique un certain éloignement intra-groupe de ces génotypes.

Les amorces utilisées, choisies parmi les 15 amorces développées sur l'olivier et utilisées par Khadari *et al.* (2008) et Charafi *et al.* (2008), ont un pouvoir de discrimination élevé. Le nombre moyen d'allèles par locus déterminé dans notre étude (6) est légèrement plus bas par rapport aux valeurs obtenues dans des études à grande échelle pour des variétés méditerranéennes cultivées et aussi pour une étude sur des variétés marocaines (Charafi, 2007; Khadari *et al.*, 2008) dont le nombre d'allèles est de 7. De même, l'hétérozygotie observée de notre étude (0,71) est comparable à celle de l'étude précitée (0,61).

A l'exception de 8 comparaisons de génotypes 2 à 2 qui ont été distingués par 1 à 4 allèles, les 23 génotypes se distinguent clairement. Les génotypes proches, distinction allélique faible, correspondent probablement à des variations somaclonales via une multiplication végétative sur de longues périodes, mais qui reste à vérifier par l'utilisation d'un grand nombre de locus SSR. Alors que, les génotypes bien distincts, plus de 6 allèles, seront issus de semis ou

sélectionnés à partir de génotypes issus de semis. La probabilité d'obtenir des génotypes proches qui se distinguent par 1 à 4 allèles via la reproduction sexuée est très faible. Ainsi l'analyse des descendants d'un croisement chez l'olivier, '*Picholine marocaine X Picholine de languedoc*' (Charafi *et al.*, 2007) à l'aide de 35 locus microsattellites montre que les descendants sont différents par au moins 16 et 18 allèles. Ces résultats indiquent que les génotypes de Moulay Driss Zerhoun ont un niveau de diversité élevé.

L'analyse de la structure génétique (dendrogramme et AFC) des 20 génotypes présélectionnés de Moulay Driss Zerhoun plus les trois variétés Picholine, Haouzia et Menara, montre la présence d'une structuration génétique. Les génotypes sont répartis en deux groupes ce qui signifie qu'ils sont originaires de pools génétiques différents. Un pool très proche de la variété témoin la « Picholine marocaine » dont la variation est probablement due aux variations somaclonales. Les individus de l'autre groupe, qui est très distinct, sont vraisemblablement originaires de la reproduction sexuée ou d'une sélection locale. Ces constatations concordent parfaitement avec les travaux de Charafi (2007), Charafi *et al.* (2008) et Khadari *et al.* (2008), qui stipulent la présence d'une variation somaclonales chez la Picholine marocaine et aussi la présence de génotypes locaux qui sont diversifiés par rapport à cette variété témoin dans chaque région marocaine.

Les différences alléliques faibles peuvent être dues au nombre faible de locus SSR utilisés dans cette étude (6 locus). Ainsi, une re-vérification est nécessaire avec la migration sur gel d'acrylamide pour élucider avec plus de précision ces différences alléliques. Ainsi, pour apporter plus d'informations il est nécessaire de faire des études approfondies avec un nombre élevé de locus SSR à l'intérieur de chaque groupe pour une meilleure compréhension des distances génétiques entre certains génotypes et de déterminer définitivement le profil génétique de chaque individu.

## *Conclusion et Perspectives*

---

Ce travail a permis de détecter un niveau de diversité génétique entre les géotypes d'olivier de Moulay Driss Zerhoun par les caractères agronomique et par les marqueurs microsatellites. Ces deux techniques ont permis de donner un profil distinct pour chaque géotype. La plupart des géotypes se différencie par plus de 6 allèles.

Malgré l'influence de l'environnement sur les caractères agronomiques, la présence des échantillons sous les mêmes conditions climatiques conduit à la stabilité de la variation de ces caractères. D'autre part, les microsatellites ont permis la révélation de l'identité de certains géotypes avec la variété témoin '*Picholine marocaine*'. La détermination de dénominations précise de ces géotypes nécessite une étude profonde.

Les différents géotypes étudiés, identifiés lors de la prospection et suivis *in situ* (2012-2014), ont montré des caractères intéressants pour la culture. Ils semblent très adaptés pour la région, productifs et avec des caractères agronomiques satisfaisants. En effet, la production observée dans l'étude en collection (conditions de conduite contrôlées et homogènes), confirme leurs performances ce qui permettrait de les proposer au catalogue officiel comme variétés nationales ou au moins régionales.

- La confrontation des caractérisations moléculaire et morphologique pourrait enrichir l'étude et confirmer les résultats
- Pour apporter plus d'informations et plus de précision dans la détermination de géotype de chaque individu, il est nécessaire de faire des études approfondies avec un nombre élevé de locus SSR à l'intérieur de chaque groupe pour comprendre un certain éloignement intra-groupe .

## Références bibliographiques

Adam A. F. et Dron M. (1993). Les outils moléculaires et leurs applications à l'amélioration des plantes. Dans: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire et des gènes? Ed. AURELP-UREF. John Libbey Eurotex, Paris, pp. 23-46.

Afidol, 2011. Protection raisonnée et biologique en oléiculture, p 11-15

Amugues S., 1993. héophraste, Recherches sur les plantes. Trad .Coll.Université de France .Paris : Les Belles Lettres, In : De l'olivier à L'oléastre : Origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen Breton C, Medial F, Pinatel C, Berville A., 2006.

Argenson. C., Regis, S., Jourdain, J. M., Vaysse, P., 1999. L'olivier. Eds .Centre technique interprofessionnel des fruits et légume (Ctifl), Paris, 204 pages

ARTAUD Monique, 2008. L'olivier Sa contribution dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. p 6-7

Becker, J., P. Vos, M. Kuiper., Salamini, M. Heun., (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol. Gen. Genet. 249 :65-73.

Belkhir K. 1999. GENETIX. Logiciel Sous Windows Pour la Génétique Analysis Des Populations. CNRS UPR 9060, Université de Montpellier, Montpellier, France

Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P. & Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 10 (2) : 77 – 81.

Bernie G, Forrester S, Grey D., 2006. Botanica. Encyclopedie de botanique et d'horticulture plus de 1000 plants de monde entière .édition place victoires 1020P.

Besnard G, Breton C, Baradat P, Khadari B, Bervillé A., 2001. Cultivar identification in the olive (*Olea europaea* L.) based on RAPDS. *J Amer Hort Science* 2001b; 126:668-75.

Boulouha B., Oukabli A., Hadiddou A., Sikaoui E., Ouguas Y. et Mamouni A., 2006a. Fiche technique olivier. Edt INRA, Rabat.

Breton C, Besnard G, Bervillé A., 2006a. Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. In : De l'olivier à L'oleastre : Origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen., 2006. Cahiers agricultures vol.15, n°4, juillet Août 2006.

Breton C, Tersac M, et Berville A., 2006 b .Genetic diversity and gene flow between the wild olive (Oleastre, *Olea Europea* L.) and the olive. In : De l'olivier à L'oleastre : Origine et domestication de l'Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen, 2006. Cahiers agricultures

vol.15, n°4, juillet -Août 2006.

Charafi J., (2007). Diversité génétique de l'olivier au Maroc et cartographie génétique de la population hybride F « PICHOLINE MAROCAINE X PICHOLINE DU LANGUEDOC » : Bases pour l'amélioration variétale, P 28-45.

Charafi J., El Meziane A., Moukhli A., Boulouha B., El Modafar C. and Khadari B. (2008). Menara gardens : A Moroccan olive germplasm collection identified by a SSR locus-based genetic study. Genet. Resources Crop Evol., 55 :893-900.

COI. 2013. Campagne 2013-2014 : une production oléicole nationale revue à la baisse.

De Vienne D. (1990). L'analyse du déterminisme génétique des caractères quantitatifs chez les végétaux médecines/sciences: 10(6), XI-V.

D.de Vienne, 1998. Les marqueurs moléculaires en génétiques et biotechnologies végétales, 2<sup>ème</sup> édition, 31-35.

DDFP. 2013. Evolution de la superficie, de la production et de la commercialisation oléicole de 1998 à 2012.Rabat. Maroc.

Green, P.S. (2002) A revision of olea L. (oleaceae). Kew bulletin 57 (1) :91-140

Ibrahim KONATE, 2007. Diversité phénotypique et moléculaire du caroubier (*ceratonia siliqua* L.) et des bactéries qui lui sont associées, p 42

Johanson LAS (1957) A review of the family pleaceae. Contributions from the new south wales national herbarium 2 : 395-418

Khadari (2005). Domestication et flux de gènes chez une espèce méditerranéenne, ligneuse et pérenne, l'olivier, *olea europeae* L. thèse université Abdelmalek Essaadi, faculté des sciences. Tetouan, 529p.

Khadari B, Charafi J., Moukli A., Ater M. 2008. Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar : a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. Tree Genet. Genome, 4 :213-221.

Lansari A., Tahiri Hassani JB, 1996. Contribution à l'étude de la variabilité morphologique au sein de la population de « Picholine marocaine » dans la région de Zerhoun au Maroc. Olivae 60 : 42-47.

Loussert R. et Brousse G., 1978. L'olivier .Ed . Maisonneuve et Larose, Paris .447p .

Mackill, D. J., Z. Zhang, E, D. Redona, and P. M. Colowit. (1996). Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome. 39, 969-977.

MAPM.2012. Etude pour l'élaboration du schéma directeur d'implantation des unités de valorisation des olives dans le cadre des projets d'agrégation dans la filière oléicole.

MAPM, 2013. Veille économique-secteur oléicole.

Med Faouzi Kasraoui, 2014. L'olivier (<http://www.kasraoui.com>)

Metzidatis I T, 1997. Proceedings of the third international symposium on Olive growing: Volume 1. Acta Horticulture no 474, Crete, Chania & Greece.

Miliani R (1932) classificazione ecologica dell'olivo in italia. Annali di tecnica Agraria, V (III): 247-427.

Morgante M, Olivier A M (1993) PCR amplified microsatellite as markers in plant genetics. Plant J 3 : 175-182.

Nei M, Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci., 74 :5267-5273.

Oukabli ahmed, 2008. La pollinisation des arbres fruitiers. N° 166. INRA, Meknès.

Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P., (1995). Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'Olivier (*Olea europaea* L.). Agronomie, 15, 31-37.

Monique, 2008. ([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Olive\\_coupe.PNG](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Olive_coupe.PNG))

Pagnol, J., (1996). L'Olivier. Aubanel Ed, France.

Park C., Chang L. S. and Shenk T. (1991). A polymerase chain reaction mediated by simple primer. Cloning of genomic sequences adjacent to a serotonin receptor protein coding region. *Nucl. Acids Res.* 19:7155-7160.

Rallo, P., Dorado, G., Martin, A., (2000). Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 984-989.

Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98:503-517.

Terral JF, Alonso N, Capdevila RBI *et al.*, 2004. Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archeological material. *J Biogeogr*; 31:63-77

Welsh J. and McClelland M. (1990). Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.

Walali, 2003. Fiches techniques : l'amandier, l'olivier, le figuier, le grenadier, n°105, p 2-3

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18, 6531-6535.

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