

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques
Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement et Santé

THÈSE

Présentée par

EL AMINE AJAL

pour obtenir du grade de :

Docteur

Spécialité : Génétique et Biotechnologie végétale

**ANALYSE MOLECULAIRE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU
GRENADIER (*Punica granatum* L.) AU MAROC : EXPLORATION
DES MARQUEURS AFLPs ET ISSRs**

Soutenue publiquement le 27 Octobre 2014, devant le jury composé de :

Pr. Khalid HABBARI Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Président
Pr. Mohamed BAAZIZ Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech	Rapporteur
Pr. Abdelhamid ELMOUSADIK Faculté des Sciences, Agadir	Rapporteur
Pr. Soumaya HAMMADA Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Rapporteur
Pr. Soumia AMIR Faculté Polydisciplinaire, Béni Mellal	Examineur
Pr. Hafida HANINE Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Examineur
Pr. Abdelmajid HADDIOUI Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal	Directeur de thèse

Dédicaces

A mes chers parents

Qui m'ont tant soutenue et encouragé dans mes études et m'ont indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands hommes..., Vous trouverez dans ce travail le fruit de votre dévouement et le témoignage de tout mon amour et ma reconnaissance.

Je vous remercié, vous deux, pour votre sacrifice. Puisse dieu vous procurer santé, bonheur et une très longue vie.

A mes chers frères

A qui je souhaite encore plus de réussite. Je vous aime mes chers frères et je suis fière de vous. Je vous remercie pour toute l'aide et le soutien et les encouragements, qu'ils trouvent dans ce travail l'expression de mon affection et ma profonde gratitude.

A mon cher ami intime

Aadil et sa mère

Qui m'ont toujours témoigné tant attention, qui m'ont toujours là pour moi et dont les sacrifices resteront gravés dans mon cœur surtout les moments de préparation. Je vous remercie pour votre aide et votre soutien sans faille à surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de ce travail.

Veillez trouver ici, l'hommage respectueux de ma profonde gratitude et mes vifs remerciements.

AVANT-PRPOS

Nom et Prénom du candidat : El Amine AJAL.

Intitulé du travail : Analyse moléculaire de la diversité génétique du grenadier (*Punica granatum* L.) Au Maroc: Exploration des marqueurs AFLPs et ISSRs.

Directeur de thèse : Pr. Abdelmajid HADDIOUI, PES, Laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal.

Laboratoire ou les travaux ont été réalisés :

- Laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles de Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal.
- Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie de la Faculté des Sciences de Tunis.

Période de réalisation du travail de thèse : 2010- 2014

Rapporteurs :

- Pr. Mohamed BAAZIZ, PES, Faculté des Sciences Semlalia Marrakech.
- Pr. Abdelhamid ELMOUSADIK, PES, Faculté des Sciences Agadir.
- Pr. Soumaya HAMMADA, PES, Faculté des Sciences et Techniques, Béni Mellal.

Cadre de coopération – soutien financier : Coopération du comité Mixte Marocco-Tunisienne (Projet N°: 11/MT/23).

Principales publications et communications aux quelles ce travail a donnée lieu :

Publications:

- **Ajal E.A.**, Jbir R., Melgarejo P., Hernández F., Haddioui A. et Salhi Hannachi A. 2014. Efficiency of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers for the assessment of genetic diversity of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 24-31.
- Juan J.M., Hernández F., Haddioui A., Pilar L., Rafael M., **Ajal E.A** et Pablo M. 2012. Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. *Scientia Horticulturae* 140:100–106.

- **Ajal E.A.**, Jbir R., Melgarejo P., Hernández F., Salhi Hannachi A. et Haddioui A. 2013. Exploration des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme moléculaire du grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc. Revue des Régions Arides (In press).
- Jbir R., Bendhiaf A., **Ajal E.A.**, Haddioui A et Salhi Hannachi A. 2013. Etude de la diversité moléculaire de cultivars de grenadier (*Punica granatum* L.) du sud tunisien. Revue des Régions Arides (In press).
- **Ajal E.A.**, Jbir R., Legua P., Martinez J.J., Martinez R., Salhi-hannachi A. et Haddioui A. Genetic Analysis of Moroccan Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers. Australian Journal of Crop Science. (In press).

Communications:

- **Ajal E.A.**, Jbir R., Melgarejo P., Hernández F., Salhi Hannachi A. et Haddioui A. 2013. Exploration des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme moléculaire du grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc. IV Meeting International sur la Gestion des Ressources et Applications Biotechnologiques en Aridoculture et Cultures Oasiennes : Perspectives pour un développement durable en zones arides. 17-19 Décembre, Djerba, Tunisie.
- Jbir R., Bendhiaf A., **Ajal E.A.**, Haddioui A et Salhi Hannachi A. 2013. Etude de la diversité moléculaire de cultivars de grenadier (*Punica granatum* L.) du sud tunisien. IV Meeting International sur la Gestion des Ressources et Applications Biotechnologiques en Aridoculture et Cultures Oasiennes : Perspectives pour un développement durable en zones arides. 17-19 Décembre, Djerba, Tunisie.
- **Ajal E.A.**, Jbir R., Salhi-Hannachi A. et Haddioui A. 2014. Etude de la diversité génétique du grenadier au Maroc à l'aide des marqueurs ISSR. Le 2ème Congrès International de la Biodiversité Végétale. 27-29 Mars, Marrakech, Maroc.
- **Ajal E.A.**, Jbir R., Zineabidine L.H., Salhi Hannachi A. et Haddioui A. 2014. Etude de la diversité génétique de cultivars de grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc à l'aide des marqueurs moléculaires. 1^{ère} Edition des journées doctoriales sous le thème ' la recherche scientifique : Innovation et développement'. 10 et 11 Juin, Béni Mellal, Maroc.
- Haddioui A., Juan J.M., Hernandez F., Pilar L., Rafael M., **Ajal E.A** et Pablo M. 2014. Total phenol and antioxidant capacity in Moroccan pomegranate varieties. Balkan Agriculture Congress. 8-11 September, Turkey.

Résumé

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est l'une des espèces fruitières les plus anciennement cultivées au Maroc. Il présente des potentialités adaptatives considérables à plusieurs régions du pays et une grande diversité génétique. Cependant, les ressources de cette espèce se trouvent menacées par des stress biotiques et abiotiques et par une tendance vers une agriculture basée sur un nombre limité de cultivars productifs. Ainsi, la nécessité d'adopter une stratégie de caractérisation génétique du patrimoine local s'avère primordiale en vue de la conservation et de l'amélioration de cette espèce. Dans cette optique, l'étude de la diversité génétique de 41 cultivars de grenadier provenant de différentes régions au Maroc a été réalisée à l'aide de deux types de marqueurs moléculaires AFLP et ISSR appliqués aux extraits d'ADN de feuilles de grenadier. L'utilisation de six combinaisons d'amorces AFLP a permis de générer un total de 519 bandes dont 368 sont polymorphes (70.9%). Les paramètres Rp, PBP et PIC calculés, témoignent de l'efficacité de l'ensemble des combinaisons d'amorces utilisées. Le dendrogramme UPGMA et l'analyse en composante principale ont mis en évidence un regroupement qui s'opère indépendamment de leurs origines géographiques et de leurs appellations. L'analyse de la structuration génétique des groupes définis selon l'origine géographique a montré une différenciation inter-groupe de 9%. De même, les flux génétiques sont importants entre les groupes géographiquement distingués. Par ailleurs, l'exploitation de 8 amorces ISSR a révélé un total de 73 amplimères dont 61 polymorphes (87.14%). De même, les valeurs des paramètres Rp, PBP et PIC suggèrent la grande efficacité des amorces étudiés pour explorer le polymorphisme moléculaire chez cette espèce. L'estimation de la diversité génétique intra-groupe a montré une diversité génétique plus importante au sein du groupe issu de la région de Béni Mellal. Le dendrogramme UPGMA et l'analyse en composantes principales ont montré que les cultivars étudiés sont regroupés indépendamment de leurs origines géographiques et de leurs dénominations. L'analyse combinée des marqueurs AFLP et ISSR a permis de construire un dendrogramme UPGMA similaire à celui obtenu par les marqueurs AFLP pris séparément. Par ailleurs, leurs topologies indiquent des regroupements des cultivars selon l'origine géographique. L'ensemble des résultats obtenus apporte des informations et des connaissances de base sur le patrimoine marocain et confirme l'importance des marqueurs AFLP et ISSR dans l'exploitation de la diversité génétique et l'étude des relations phylogénétiques du grenadier au Maroc.

Mots clés : Grenadier (*Punica granatum* L.), AFLP, ISSR, polymorphisme moléculaire, diversité génétique.

Abstract

The pomegranate (*Punica granatum* L.) is one of the oldest cultivated fruit trees in Morocco. It has considerable adaptive potential in several regions and high genetic diversity. However, the resources of this species are threatened by biotic and abiotic stress and a trend toward an agriculture based on a limited number of productivity cultivars. Thus, establishment of genetic resources conservation strategies has, therefore, become imperative in order to preserve local pomegranate germplasm. In this context, the study of the genetic diversity of 41 Moroccan pomegranate cultivars from different regions was performed using two molecular markers AFLP and ISSR applied to DNA extracted from pomegranate leaves.

By using a combination of six AFLP primers, a total of 519 markers were scored of which 368 were polymorphic (70.9%). Calculated parameters of R_p , PBP and PIC, was reflecting effectiveness of all combination's primers. The derived UPGMA dendrogram and principal component analysis showed independently grouping from geographical origins and names. Genetic differentiation parameter indicated that 9% of diversity was intergroups. The value of N_m (4.99) showed that gene flow was important.

Although, the exploitation of eight ISSR primers has generated a total of 73 markers of which 61 are polymorphic (87.14%). The values of R_p , PBP and PIC parameters were scored. Data proved that the tested primers were informative to discriminate among cultivars and to survey the genetic diversity in this fruit crop. The estimation of genetic diversity within group showed greater genetic diversity within the group from the region of Beni Mellal. The results of the derived dendrogram and those of the PCA showed that the pomegranate cultivars are clustered independently from their geographical origin and their denomination.

The combined analysis of markers AFLP and ISSR produced similar dendrogram to that obtained using AFLP marker alone. Moreover, their topology grouped the cultivars according to geographic origin.

The overall results provide information and basic knowledge of Moroccan germoplasm and confirm the importance of ISSR and AFLP markers in detecting polymorphism, identification and characterisation of pomegranate in Morocco.

Keywords: Pomegranate (*Punica granatum* L.), AFLP, ISSR, molecular polymorphism, genetic diversity.

ملخص

تعتبر شجرة الرمان من أهم المغروسات التي عرف بها المغرب منذ القدم. فهي تتميز بمؤهلات تكيف و تنوع وراثي مهم في عدة مناطق من المغرب. إلا أن الموارد الوراثية لهذه الشجرة مهددة بالإجهاد الحيوي و الغير الحيوي و الإعتماد فقط على الأصناف المنتجة. لذا أصبحت الحاجة إلى إعتماد استراتيجية للتوصيف الوراثي للثروة المحلية ضرورة ملحة من أجل حفظها و تحسينها. و في هذا الإطار، يهتم هذا العمل بدراسة التنوع الوراثي ل 41 صنف من الرمان من مناطق مختلفة من المغرب على اساس مقايسة جزيئية (ISSR – AFLP). أظهر استعمال 6 مجموعات جزيئية لتقنية (AFLP) 519 جزيئية إجمالية مع 368 من التنوع (70.9%). تؤكد قيم (PIC, PBP, RP) المحصل عليها على قوة التميز لهذه المجموعات الجزيئية. و قد ساعدت نتائج الشكل (ACP – UPGMA) على توزيع أصناف الرمان في مجموعات مستقلة عن الأصل الجغرافي و الاسم. كما مكن تحليل البنية الوراثية لأصناف الرمان الموزعة وفقا للأصل الجغرافي من تميز بجماعي بنسبة 9.9%. مع تدفق وراثي مهم جغرافيا.

من جهة أخرى أعطيت تقنية (ISSR) باستعمال 8 مجموعات جزيئية على 73 جزيئية اجمالية مع 61 من التنوع (87.14%). توحى قيم (PIG –PBP, Rp) على فعالية هذه التقنية في التميز لدراسة هذا التنوع. بالإضافة إلى تنوع وراثي مهم لأصناف الرمان لمنطقة بني ملال. و قد أظهرت نتائج الشكل (ACP-UPGMA) لهذه التقنية إلى توزيع أصناف الرمان في مجموعات بغض النظر عن الأصل الجغرافي و الاسم.

و قد مكن التحليل المشترك لجزيئيات (ISSR – AFLP) من الحصول على شكل (UPGMA) مماثل للشكل المحصل عليه بإعتماد الجزيئيات (AFLP) بشكل منفرد. بينما بينت طوبولوجيا هذه الشكل على توزيع أصناف الرمان في مجموعات حسب الأصل الجغرافي.

و لقد مكنت نتائج هذه الدراسة من الحصول على معلومات و على قاعدة جيدة للثروة المحلية بالإضافة إلى نجاعة تقنيات (ISSR – AFLP) في تصنيف التنوع الوراثي و دراسة علاقات التطور لشجرة الرمان بالمغرب.

الكلمات الرئيسية : الرمان, AFLP, ISSR, تعدد الأشكال الجزيئية والتنوع الوراثي .

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à tous ceux qui ont été à l'origine et à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur **Ahmed ZEGHAL**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal pour m'avoir autorisé le déroulement des activités de recherche au sein de son établissement.

Je tiens à exprimer ma connaissance à Monsieur le Professeur **Abdelmajid HADDIOUI**, Chef du département des Sciences de la vie et Directeur du Laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, qui a bien voulu diriger ce travail et me faire bénéficier de son expérience et de ses compétences. Son dévouement et sa rigueur scientifique demeurent, pour moi, un exemple. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance, de mon respect et de mes remerciements les plus sincères. Je le remercie aussi pour la sympathie et la qualité humaine dont il a fait preuve à mon égard.

Je remercie particulièrement Madame **Amel SALHI HANACHI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, pour son soutien et ses conseils fructueux, pour le privilège qu'elle m'a accordé en ce qui concerne la disponibilité des produits, l'utilisation du matériel et pour tout l'intérêt qu'elle a manifesté pour ce travail.

Je remercie vivement Madame **Neila TRIFI-FARAH**, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à plusieurs reprises.

Je tiens à remercier Monsieur **Khalid HABBARI**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse, malgré ses nombreuses occupations. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **Mohamed BAAZIZ**, Professeur à la Faculté des Sciences Semlalia Marrakech, à Monsieur **Abdelhamid ELMOUSADIK**, Professeur à la Faculté des Sciences Agadir et Madame **Soumaya HAMMADA**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques Béni Mellal, qui ont bien voulu accepter d'être rapporteur de cette thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Madame **Soumia AMIR**, Professeur à la Faculté Polydisciplinaire de Béni Mellal et Madame **Hafida HANINE**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, d'avoir aimablement accepté de faire

partie de mon jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur d'évaluer et de juger ce travail. Ses remarques pertinentes et constructives ont contribué à mieux le valoriser.

Je suis également reconnaissant aux Professeurs **Latifa HAMAMA** et **Mohamed El HANSALI** pour leur soutien moral, leur coopération et l'ambiance conviviale de travail.

J'adresse également mes remerciements à Madame **Rania JBIR**, Enseignante à la Faculté des Sciences de Tunis, qui m'a initié aux techniques de marquage moléculaire et pour leurs conseils et leur appui dans la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier mon cher ami **Aadil BAJOUB** pour ses encouragements même aux moments les plus difficiles, pour sa patience, son appui tout au long de ces années et pour avoir été toujours présents à mes côtés.

Je souhaite remercier vivement les membres des deux laboratoires : Laboratoire de Gestion et Valorisation des Ressources Naturelles à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal et le Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie à la Faculté des Sciences de Tunis. En particulier, Lalla Hasna ZINELABIDINE, Mohamed NOURI, Taoufil ELRASAFI et Ghizlane KABIRI, Mohamed Amine Batnini, Aymen Bermil, Karim Guenni, Aymen Mahajbi, Imane Fadlawi, Nadia zaytouna, Manel Sekmani, Abdessalam Abdessamad..., pour leurs solidarités, leurs encouragements et leurs serviabilités et pour les bons moments de détente passés avec eux.

Je remercie également Mr. **Mustapha El FAHIM** et Mr. **Marwane MELLOUL** du laboratoire Plateforme Fonctionnelle Génomique du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, d'avoir permis la réalisation d'une partie des analyses au sein de leur laboratoire.

J'adresse mes vifs remerciements à Mr. **Mustapha ASRAOUI**, Directeur Provinciale de l'agriculture d'Azilal, Mr. **Khalid JABRI**, Chef de Service de la Vulgarisation et Appui et Mr. **Abdelali Oubaghdad**, Chef de Bureau des Travaux qui m'ont facilité les conditions pour la préparation de cette thèse et pour leur soutien moral, qu'ils trouvent ici l'expression de mon respect.

Il me reste, enfin, l'agréable devoir de remercier tous ceux, partout où ils sont, qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de mon travail.

Abréviation

- ACP** : Analyse en Composantes Principales
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AFLP**: Amplified Fragment Length Polymorphism
- ARNase** : Ribonucléase
- AMOVA**: Analysis of Molecular Variance
- BET**: Bromure d'éthidium
- CTAB**: Bromure d'Ammonium Cétylique-Triméthyl
- DAMD**: Directed Amplification of Minisatellite DNA
- dNTP** : désoxynucléotides triphosphate
- DO** : Densité optique
- g/mg/µg/ng** : Gramme/milligramme/microgramme/nannogramme
- ISSR** : Inter Simple Sequence Repeat
- Kb/pb** : Kilobase/paire de bases
- L/ml/µl** : Litre/millilitre/microlitre
- M/mM/µM/pM** : Molaire/millimolaire/micromolaire/picomolaire
- Min** : Minute
- PCR** : Polymerase Chain Reactions
- PIC** : Contenu informationnel du polymorphisme
- QTL** : Quantitative Trait Loci
- RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA
- Rp**: Resolving power
- Rpm** Rotation par minute
- SSR** : Simple Sequence Repeats
- Taq**: Thermophilus aquaticus
- TBE**: Tris-borate EDTA
- TE**: Tris EDTA
- T_m** : Temperature d'hybridation
- UV**: Ultraviolette
- UPGMA**: Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic Average.

Liste des figures

- Figure 1:** Arbre de grenadier (*Punica granatum* L.).
- Figure 2:** Fleur et inflorescence du grenadier
- Figure 3:** Fruit du grenadier (*Punica granatum* L.).
- Figure 4:** Centres d'origines et de diversité du grenadier (Sanchez-Monge, 1974).
- Figure 5:** Pays producteurs des grenades (Melgarejo et Valero, 2012).
- Figure 6:** Evolution de la superficie et de la production du grenadier au Maroc.
- Figure 7:** Schéma illustrant les différentes utilisations et voies de valorisation des grenades
- Figure 8:** Carte de localisation des cultivars du grenadier au Maroc.
- Figure 9:** Schéma illustrant les différentes étapes de la technique AFLP (Zabeau et Vos, 1993).
- Figure 10:** Principe de l'ISSR. Si les bases arbitraires de l'amorce sont du côté 5' du microsatellite, on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du côté 3', c'est le produit B est obtenu.
- Figure 11:** Exemple des profils d'AFLP obtenus par l'amorce E_{AGC}/M_{CAA} .
- Figure 12:** Dendrogramme UPGMA de classification de 24 cultivars de grenadier généré à partir de 368 marqueurs AFLP.
- Figure 13:** Projection des cultivars étudiés de grenadier dans le plan défini par les deux premières composantes de l'ACP.
- Figure 14:** Electrophorèse de l'ADN cellulaire total sur gel d'agarose (0,8%).
- Figure 15:** Exemple de profils d'amplification par ISSR obtenus par l'amorce $(AG)_8YA$ chez les cultivars de grenadier (1-16).
- Figure 16:** Dendrogramme UPGMA représentant les relations génétiques entre les 27 cultivars de grenadier construit selon la méthode UPGMA et basé sur les 61 marqueurs ISSR.
- Figure 17:** Distribution des cultivars de grenadier dans le plan 1-2 de l'ACP basée sur 61 marqueurs ISSR.
- Figure 18:** Représentation schématique de la diversité génétique et de la structuration des cultivars étudiés.
- Figure 19:** Dendrogramme UPGMA entre les trois groupes.
- Figure 20 :** Dendrogramme UPGMA de 10 cultivars de grenadier sur la bases des marqueurs AFLP et ISSR.
- Figure 21 :** Dendrogramme UPGMA de 10 cultivars de grenadier sur la bases d'une analyse conjointe par des marqueurs AFLP et ISSR.

Liste des tableaux

- Tableau 1:** Composition chimique du jus de grenades par 100 g de la partie comestible du fruit.
- Tableau 2:** Liste des différents cultivars de grenadier étudiés avec codes, origines géographiques et les types de marqueurs analysés (AFLP, ISSR).
- Tableau 3:** Séquences des adaptateurs et des oligonucléotides pour les pré-amplifications et les amplifications sélectives.
- Tableau 4:** Code, séquence et température d'hybridation (T_m) des amorces utilisées dans les réactions PCR-ISSR.
- Tableau 5:** Dénominations, codes et origines géographiques des cultivars de grenadier étudiés par la technique AFLP.
- Tableau 6:** Bandes AFLP révélées par les six couples d'amorces chez 24 cultivars de grenadier étudiés.
- Tableau 7:** Matrice des distances génétiques calculées selon la formule de Nei and Li's (1979) basée sur les 368 marqueurs AFLP générés pour 24 cultivars de grenadier.
- Tableau 8:** Absorption de la variabilité par les trois premiers axes de l'analyse en composantes principales réalisée sur les marqueurs moléculaires AFLP pour 24 cultivars.
- Tableau 9:** Paramètres de diversité Intra-groupes de grenadiers.
- Tableau 10:** Paramètres de diversité génétique de Nei (1978) : Diversité génétique totale (H_t), diversité génétique pour chaque groupe (H_s); diversité génétique dans les groupes (D_{st}); différenciation génétique (G_{st}); nombre de migrants efficaces (N_m) et indice de Shannon (I).
- Tableau 11:** Identités génétiques et distances génétiques entre les groupes de grenadiers (Nei, 1978).
- Tableau 12:** Marqueurs AFLP spécifiques révélés chez certains cultivars de grenadier.
- Tableau 13:** Dénominations, codes et origines géographiques des cultivars de grenadier étudiés par la technique ISSR.
- Tableau 14:** Caractéristique des amorces ISSR testées et les paramètres statistiques.
- Tableau 15:** Matrice des distances génétiques entre 27 cultivars de grenadier calculée selon la formule de Nei et Li (1979) basées sur 61 marqueurs ISSR.
- Tableau 16:** Absorption de la variabilité par les trois premiers axes de l'Analyse en composantes principales réalisée sur les marqueurs ISSR pour les 27 cultivars étudiés.
- Tableau 17:** Classification des cultivars étudiés en trois groupes selon la répartition géographique.
- Tableau 18:** Paramètres de diversité Intra-groupes de grenadiers.
- Tableau 19:** Paramètres d'estimation de la diversité génétique intra et inter groupes de grenadier.
- Tableau 20:** Identités génétiques et distances génétiques entre les groupes de grenadiers (Nei, 1978).
- Tableau 21:** Marqueurs ISSR spécifiques révélés selon les groupes géographiques.
- Tableau 22:** Liste des cultivars de grenadier étudiés par les deux marqueurs AFLP et ISSR.
- Tableau 23:** Polymorphisme des marqueurs AFLPs révélés chez 10 cultivars de grenadier.

Tableau 24: Polymorphisme des marqueurs ISSRs révélés chez 10 cultivars de grenadier.

Tableau 25: Distances génétiques calculées pour 10 cultivars de grenadier au moyen des marqueurs AFLP selon la formule NEI et LI (1979).

Tableau 26: Distances génétiques calculées pour 10 cultivars de grenadier analysés au moyen des marqueurs ISSR.

Tableau 27: Distances génétiques calculées pour 10 cultivars de grenadier au moyen d'une analyse conjointe par des marqueurs AFLP et ISSR.

Sommaire

INTRODUCTION GENARALE.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Botanique, taxonomie et description du grenadier.....	5
1.1. Botanique et taxonomie.....	5
1.2. Description de l'espèce grenadier.....	6
1.2.1. Arbre.....	6
1.2.2. Rameaux.....	8
1.2.3. Racines.....	8
1.2.4. Feuilles.....	8
1.2.5. Fleur.....	8
1.2.6. Fruits.....	10
2. Mode de multiplication du grenadier.....	12
3. Origine géographique et aire de répartition du grenadier.....	12
3.1. Origine géographique du grenadier.....	12
3.2. Répartition et importance dans le Monde.....	13
3.3. Répartition et importance au Maroc.....	17
4. Utilisation et voie de valorisation des produits et sous-produits du grenadier.....	18
4.1. Valeur nutritionnelle et bienfaits sur la santé humaine.....	20
4.2. Voie de valorisation des sous-produits des grenades.....	23
4.2.1. Pépins.....	23
4.2.2. Ecorce.....	23
5. Variétés répertoriées au Maroc.....	24
5.1. Grenades à consommation en frais.....	24
5.2. Grenades destination industrielle.....	26
6. Etat phytosanitaire du grenadier au Maroc.....	26
7. Ressources génétiques du grenadier.....	28
7.1. Caractérisation morphologique.....	28
7.2. Caractérisation Biochimique.....	31
7.2.1. Protéines ou enzymes.....	31
7.2.2. Métabolites secondaires.....	32
7.3. Caractérisation moléculaire.....	33
7.3.1. RAPD : Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe.....	33
7.3.2. AFLP: Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés.....	35
7.3.3. ISSR: Séquences Inter-Simple Répétées	37
7.3.4. Microsatellites ou SSR: Séquences Simple Répétées	37
7.3.5. SPAR: Réaction d'amplification par des amorces uniques.....	40
7.3.6. Evaluation comparative des marqueurs d'ADN.....	40
7.4. Conservation des ressources génétiques du grenadier.....	42

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal.....	44
2. Oligonucléotides.....	47
2.1. Oligonucléotides pour les marqueurs AFLP.....	47
2.2. Oligonucléotides pour les marqueurs ISSR.....	48
3. Méthodes.....	49
3.1. Protocole d'extraction pour la technique AFLP.....	49
3.2. Protocole d'extraction pour la technique ISSR.....	50
3.3. Méthode d'exploration de la diversité génétique.....	51
3.3.1 Technique d'amplification AFLP.....	51
3.3.2 Technique d'amplification ISSR.....	55
4. Méthodes d'analyse statistiques des données.....	58
4.1. Logiciels utilisés.....	58
4.2. Analyse de la diversité génétique.....	59
5. Paramètres de différenciation et d'analyse de la structuration génétique.....	60
6. Estimation des distances génétiques et établissement des relations génétiques.....	61
7. Analyse multivariée: Analyse en composantes principales (ACP).....	61

CHAPITRE III : RESULTATS

Partie I : Analyse de la diversité génétique des grenadiers par l'utilisation des marqueurs AFLP

1. Analyse de la diversité génétique par la technique AFLP.....	64
1.1. Pourcentage de bandes polymorphes (PBP).....	64
1.2. Pouvoir résolutif (Rp).....	66
1.3. Contenu Informationnel du polymorphisme (PIC).....	66
2. Exploration des relations phylogénique entre les cultivars.....	67
2.1. Distances génétiques.....	67
2.2. Etablissement du dendrogramme de classification.....	69
3. Analyse de la structuration de la diversité génétique.....	71
3.1. Analyse en composantes principales (ACP).....	71
3.2. Paramètres de Nei.....	73
3.3. Distances génétiques.....	75
3.4. Marqueurs spécifiques.....	75
4. Discussion et conclusion.....	76

Partie II: Analyse de la diversité génétique des grenadiers par l'utilisation des marqueurs ISSR

1. Analyse de la diversité génétique par la technique ISSR.....	85
2. Structuration génétique des cultivars étudiés.....	86
2.1. Distances génétiques de Nei et Li (1979).....	87
2.2. Etablissement du dendrogramme de classification.....	89
2.3. Analyse en composantes principales (ACP).....	91

2.4. Paramètres de diversité génétique de Nei	92
3. Analyse des marqueurs spécifiques aux groupes.....	96
4. Discussion et conclusion.....	97

Partie III : Analyse Combinée des marqueurs AFLP et ISSR

1. Analyse combinée de la diversité génétique par les deux techniques	101
2. Comparaison de la structuration génétique des cultivars étudiés au moyen des techniques AFLP et ISSR.....	103
2.1. Structuration génétique par la technique AFLP.....	103
2.1.1. Distances génétiques.....	103
2.1.2. Dendrogramme de classification hiérarchique.....	104
2.2. Structuration génétique par la technique ISSR.....	106
2.2.1. Distances génétiques	106
2.2.2. Dendrogramme de classification hiérarchique.....	106
2.3. Dendrogramme de classification hiérarchique issu des données combinées AFLP et ISSR.....	107
2.3.1. Distances génétiques.....	107
2.3.2. Dendrogramme de classification hiérarchique.....	108
3. Test de corrélation entre des distances génétiques.....	109
4. Discussion et conclusion.....	110
DISCUSSIONS ET CONCLUSION GENERALE.....	112
PERSPECTIVES DU TRAVAIL.....	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	118

INTRODUCTION

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

Le Maroc est considéré comme un centre important de diversité génétique pour un grand nombre d'espèces végétales cultivées et sauvages. Toutefois, un grand nombre de ces espèces sont menacées non seulement par des stress biotiques, mais également par des pressions abiotiques notamment une urbanisation intensive, des changements climatiques et une tendance vers une agriculture industrielle basée sur un nombre limité de variétés productives. Ainsi, la sauvegarde et la valorisation de ces ressources locales constituent non seulement un impératif mais également une composante majeure de l'équilibre des écosystèmes naturels et de leur valorisation dans des perspectives agro-économiques et environnementales. Il est donc indispensable d'établir une stratégie visant une valorisation rationnelle de ces espèces. Plusieurs actions sont nécessaires pour répondre aux objectifs de cette

stratégie. Il s'agit en particulier de dresser l'inventaire des accessions, de mener des collectes, d'évaluer la diversité génétique du matériel génétique local, d'établir des actions de conservation *in situ* (protection de plantes dans leurs sites d'origine) et *ex situ* (banques de gènes, banques de semences) et de mettre au point une stratégie d'exploitation rationnelle de ces ressources génétiques. Parmi les ressources végétales marocaines, les espèces fruitières occupent une place très importante étant donné leurs rôles socio-économiques et environnementaux. Le présent travail porte sur l'une de ces espèces fruitières en l'occurrence le grenadier (*Punica granatum* L.). Le grenadier constitue l'une des espèces fruitières les plus importantes sur le marché mondial. C'est un arbre fruitier dont le fruit est fortement apprécié pour la saveur sucrée et l'arôme. Au Maroc, le grenadier est l'un des fruitiers les plus anciennement cultivés et qui présente des potentialités adaptatives considérables à plusieurs régions. C'est un arbre considéré originaire de la Perse et des régions environnantes. Certaines zones de la Méditerranée sont considérées comme des centres secondaires de diversification de cette espèce. Il est présent sous des climats tropicaux et subtropicaux et on le rencontre en Europe, en Afrique, en Asie, en Californie et au Chili, ainsi qu'au tour du bassin méditerranéen (Mars, 2001). Le processus de domestication est dû à la propagation et à la germination facile de ses graines qui sont disséminés au cours des diverses migrations des populations humaines (Sanchez-Monge, 1974).

Du point de vue production ainsi que des surfaces cultivées, l'Inde, l'Iran, la Chine, la Turquie et les Etats Unies d'Amérique sont les principaux pays producteurs du grenadier. Au Maroc, la production nationale en grenades ne cesse d'augmenter. Ainsi, la culture de cette espèce s'étend sur une superficie totale d'environ 8218 hectares pour une production estimée à 76300 tonnes destinées essentiellement au marché local (MAPM, 2012). Le grenadier est cultivé surtout dans les régions de Béni Mellal, Haouz, Settat, Taounate, Nador, Meknès, Fès, Chefchaouen et certains Oasis du Sud (Wallali *et al.*, 2003; Oukabli, 2004). Le matériel végétal local montre une grande diversité. Cependant, le nombre de cultivars marocains de grenadier est inconnu avec précision. En effet, outre les problèmes de fausses appellations (homonymie et synonymie), le grenadier n'a pas

suscité d'intérêt particulier des chercheurs pour en dresser un inventaire exhaustif de cultivars. Cependant, des études fragmentaires impliquant un nombre limité de cultivars ont été rapportés (Oukabli *et al.*, 2004 ; Pilar *et al.*, 2012 ; Martínez *et al.*, 2012 ; Hmid *et al.*, 2013). Ces études ont porté essentiellement sur une caractérisation morphologique et physico-chimique des fruits des cultivars les plus cultivés. Les résultats obtenus ont montré une diversité génétique considérable du patrimoine local. Cependant, en dépit de cette richesse, le grenadier est sujette à d'énormes problèmes notamment une confusion régnant au niveau des appellations des variétés, conséquence de synonymie et d'homonymie. En outre, la culture des grenades se heurte à d'autres problèmes dont notamment l'éclatement et la pourriture des fruits et les attaques de certains ravageurs (Haddioui, 2012). Quoique la caractérisation par ces marqueurs pomologiques et chimiques soit indispensable et très utile pour des programmes d'amélioration, les marqueurs moléculaires, sont nécessaires pour évaluer la diversité génétique et établir les relations génétiques entre les variétés et pour chercher des marqueurs liés à des traits agronomiques. Ils permettent l'identification rapide et précise des géotypes et ont l'avantage de ne pas être influencés par les facteurs environnementaux. Toutefois, il n'y a pas d'études du polymorphisme des marqueurs moléculaires du grenadier marocain bien qu'elle a le potentiel d'améliorer la production de cette espèce.

Le travail proposé concerne l'étude de la diversité génétique des ressources locales marocaines afin de fournir des éléments d'aide à la décision pour la gestion et la conservation du patrimoine génétique du grenadier. Notre intérêt a porté sur l'évaluation de la diversité génétique des cultivars marocains du grenadier à l'aide de deux types de marqueurs moléculaires AFLP et ISSR. Le présent travail constitue la première approche de l'évaluation de la diversité génétique au sein de cette espèce à l'aide des marqueurs moléculaires. Cette étude devrait permettre l'identification des cultivars représentatifs de la diversité locale dans le but d'élaborer une collection réunissant la biodiversité disponible et d'assurer la conservation et la gestion des ressources génétique de cette espèce.

Le premier chapitre dresse une analyse bibliographique assez détaillée sur le grenadier et l'état actuel des travaux de recherche sur les ressources génétiques de cette espèce.

Dans le second chapitre, nous décrivons le matériel ainsi que les différentes techniques utilisées au cours de ce travail.

Le troisième chapitre qui sera consacré à la présentation des résultats acquis, est articulé en trois parties :

- * Dans la première partie, nous exposerons les résultats obtenus sur la variabilité génétique des grenadiers par les marqueurs AFLP.

- * La deuxième partie concernera les résultats issus de l'analyse de la diversité génétique des grenadiers par les marqueurs ISSR.

- * Dans la troisième partie, nous présenterons une étude conjointe et comparative entre les marqueurs AFLP et ISSR.

A l'issue d'une discussion générale des résultats obtenus ainsi que de leur comparaison avec ceux de nos prédécesseurs, nous présenterons les recommandations ainsi que les perspectives qui découlent de l'ensemble de nos travaux.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Botanique, taxonomie et description du grenadier

1.1. Botanique et taxonomie

Le grenadier (*Punica granatum* L.) est une espèce diploïde comportant huit à neuf paires de chromosomes ($2n=16$ ou 18) (Zukovskij, 1950 ; Moriguchi *et al.*, 1987). Nath et Randhawa (1959), en étudiant certains cultivars Indiens et un cultivar d'ornement 'Double Flower' ont mis en évidence cette caractéristique où 6 cultivars présentaient un nombre de chromosomes ($2n=16$) alors que le cultivar d'ornement avait un nombre de chromosome ($2n=18$). De plus, une tétraploïde ($2n=32$) a été obtenue à partir d'un cultivar diploïde 'GB-1' par marcottage aérien (CIRP, 1986). En comparaison avec d'autres espèces bulbeuses telles que la tulipe et l'oignon ayant respectivement des génomes de taille de 63,6pg et 32,7pg, le grenadier est caractérisé par un génome de petite taille d'environ 1,4 pg (Ohri, 2002; Bennett et Leitch, 2005).

Le grenadier appartient à la famille des *Punicaceae* et au genre *Punica* qui ne comporte que deux espèces : *Punica granatum* qui est originaire de l'Iran et de la région méditerranéenne et *Punica protopunica* qui est endémique de l'île de Socotra et des côtes de Somalie (Zukovskij, 1950 ; Moriguchi *et al.*, 1987 ; Guarino *et al.*, 1990). Cependant, certains auteurs ont classé le nain d'ornement de grenade comme une espèce distincte : *Punica nana* (Melgarejo et Martínez, 1992).

Sur le plan taxonomique, deux principales classifications ont été proposées pour le grenadier. La première a été introduite par Linné en 1753 et selon laquelle le grenadier est classifié comme suit :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : *Magnoliopsida*
- Ordre : Myrtales
- Famille : *Punicaceae*
- Genre : *Punica*
- Espèce : *Punica granatum*

La deuxième classification a été mise en place par un groupe de botanistes en 1998 (Angiosperm Phylogeny Group ou APG) (Spichiger *et al.*, 2004). Cette nouvelle classification phylogénétique est basée sur des critères moléculaires, s'intéressant essentiellement à l'ADN de deux gènes chloroplastiques et au gène nucléaire ribosomique. Cette classification a été révisée en 2003 par le même groupe de botanistes et a donné naissance à une nouvelle classification phylogénétique APGII où le grenadier se positionne comme suit:

- Division : Phanérogames
- Subdivision : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones vraies
- Sous-Classe : Rosidées
- Ordre : Myrtales
- Famille : *Lythraceae*
- Genre : *Punica*
- Espèce : *Punica granatum*

On note alors que d'après cette nouvelle classification, la famille des *Punicaceae* n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des *Lythracées* (Spichiger *et al.*, 2004).

1.2. Description de l'espèce grenadier

1.2.1. Arbre

Il s'agit d'un arbre dont la hauteur peut atteindre jusqu'à 5 mètres. Les charpentières sont écailleuses et souples ce qui donne à l'arbre une allure retombante (Figure 1).



Figure 1: Arbre de grenadier (*Punica. granatum* L.).

1.2.2. Rameaux

Les rameaux et les brindilles sont grêles, souples et enchevêtrés. En général, la brindille est couronnée par une épine plus au moins développée selon les variétés. A la base de chaque épine, on trouve des bourgeons qui sont soit végétatifs et donnent des pousses feuillées soit fructifère mixtes portant des feuilles et des fleurs (Wald, 2009).

1.2.3. Racines

Le grenadier est caractérisé par un système racinaire traçant et plus ou moins superficiel (70% des racines ne dépassent pas 50 cm de profondeur). Ainsi, sur un sol léger, avec une irrigation de surface, le système racinaire se ramifie abondamment dans la couche supérieure sans dépasser 1.25 à 1.50m de profondeur (Wald, 2009). Bien que les racines principales se situent sur un rayon qui ne dépasse guère 1m autour du tronc, les secondaires, plus nombreuses, peuvent facilement franchir les 2 mètres (Chkioua, 2008). Grâce au pouvoir d'absorption de ses racines, le grenadier est connu par sa tolérance au calcaire, à la sécheresse et à la salinité (Mars, 2001; Hasnaoui, 2003).

1.2.4. Feuilles

Le grenadier est une espèce à feuilles caduques dans les zones subtropicales et persistantes dans les régions tropicales (Özgüven et Yilmaz, 2009). Les feuilles sont relativement petites, opposées et entièrement elliptique. Elles sont glabres sur les deux faces et de couleur vert foncé (Wald, 2009) et sont munies d'un court pétiole, de 1 à 5 mm de long, sa face supérieure est généralement rougeâtre (Godet, 1991). Le limbe est épais et les nervures sont plus ou moins rougeâtres.

1.2.5. Fleur

Le grenadier est une espèce monoïque qui développe, sur le même arbre, des fleurs hermaphrodites fertiles et des fleurs mâles stériles avec un style très court et des ovaires atrophiés (Shulman *et al.*, 1984). Les fleurs mâles sont généralement les

plus dominants avec un taux de 60 à 70% (Oukabli, 2004). Cette proportion varie selon la variété et les conditions du milieu (Chaudhari et Desai, 1993). Elles apparaissent en mai sous forme de rosette au nombre de 5 à 7 fleurs à l'extrémité d'un bouquet porté par le vieux bois. Les fleurs peuvent être solitaires ou regroupées en inflorescence (double, triple ou quadruple), de couleur généralement rouge écarlate (Figure 2). La fleur est formée d'un calice rouge charnu, constitué de 5 à 8 grands sépales épais et insérées (Figure 2). On y rencontre de très nombreuses étamines et un ovaire dont le stigmate est saillant (Wald, 2009).



Figure 2: Fleur et inflorescence du grenadier

(<https://www.flickr.com/photos/rubengobetti/6427753479>)

La floraison du grenadier est très échelonnée pouvant se prolonger sur plusieurs semaines. Des études réalisées sur la dynamique de floraison chez des cultivars Tunisiens ont confirmé cette caractéristique (Mars et Marrakchi, 2004). Elle se déroule sur trois ou quatre vagues distinctes souvent difficile à distinguer entre elles (Ben Arie *et al.*, 1984; Hussein *et al.*, 1994; Mars et Marrakchi, 2004). La première vague de floraison donne le meilleur taux de nouaison (90%) avec des

fruits de bonne qualité et qui sont moins susceptibles à l'éclatement (Mars, 2000). Le nombre de fleurs ouvertes est très limité au début de la période de floraison et ce n'est qu'à partir de la deuxième semaine que le rythme d'apparition des fleurs s'accélère. En général, le maximum de fleurs s'obtient entre la troisième et la cinquième semaine qui correspond à la période de pleine floraison (Mars et Marrakchi, 2004). La majeure partie des fleurs apparaît sur le bois âgé d'un an ou plus et les fleurs portées par le bois de l'année s'observent tardivement. A ce niveau, Mars et Marrakchi (2004) ont montré que la chute des boutons floraux ou des fleurs épanouies commence quelques jours après le début de la floraison et se poursuit jusqu'à 1 à 2 semaines après l'épanouissement des dernières fleurs. Les chutes, au départ peu importantes, deviennent par la suite intenses avec des pertes moyennes entre la quatrième et la septième semaine après le début de la floraison.

Le régime de reproduction des variétés de grenadier est préférentiellement allogame. L'étalement de la floraison favoriserait la pollinisation croisée (Mars et Marrakchi, 2004). Toutefois, d'autres régimes de reproduction du grenadier ont été reportés : autogame, auto-allogame ou allogame préférentielle (Jalicop et Sampath Kumar, 1990).

1.2.6. Fruits

La grenade est un fruit non climactérique caractérisée par un taux de respiration faible et dont la récolte n'est faite qu'une fois la maturation est achevée (Ben-Arie *et al.*, 1986; Shulman *et al.*, 1984). Il s'agit d'un gros fruit, arrondi, légèrement aplati, sans pédoncule et d'une couleur variant du jaune pâle au rouge pourpre. Le péricarpe riche en tanin est épais, coriace, surmonté des restes d'un calice dentelé et très résistant. La grenade renferme un grand nombre de graines entourées d'une pulpe charnue transparente plus colorée à la maturité formant la partie comestible (Figure 3).

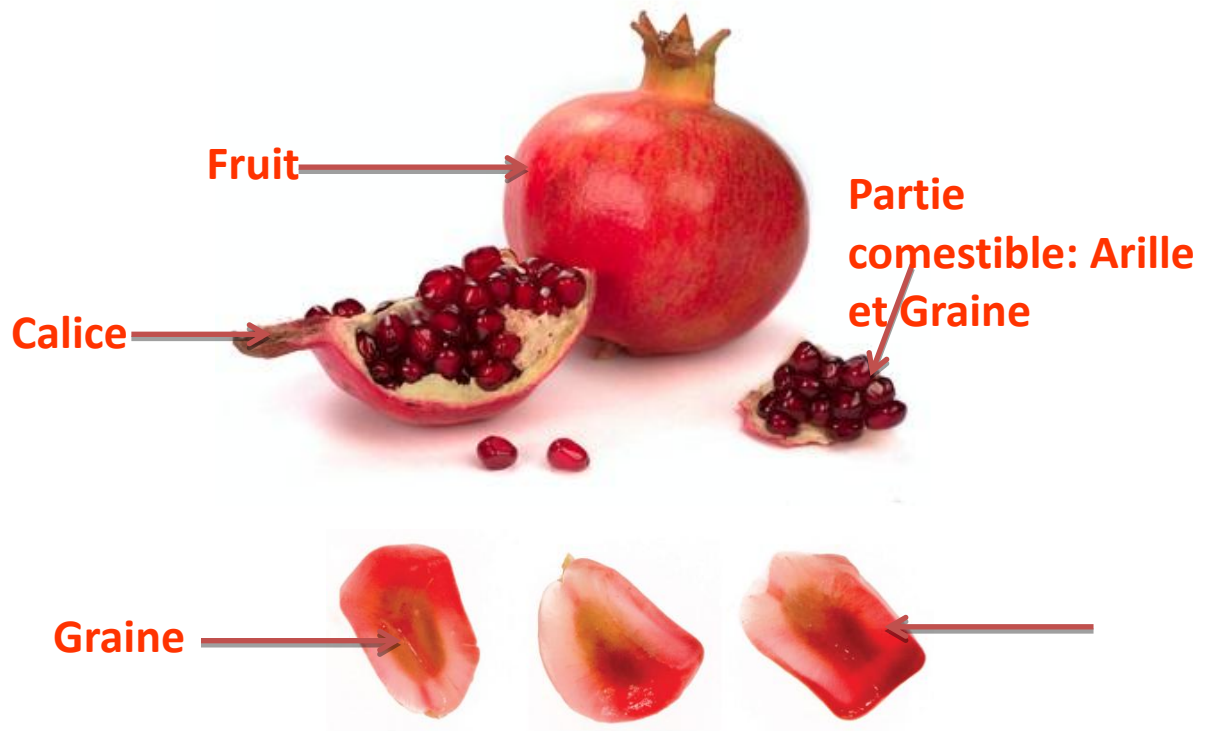


Figure 3: Fruit du grenadier (*Punica granatum* L.).

L'intérieur est séparé par des cloisons membranaires qui forment des loges dans lesquelles se trouvent les arilles. Celles-ci renferment des pépins d'une forme triangulaire mesurant environ 15 millimètres dans une enveloppe translucide juteuse de couleur rouge foncé à rose clair (Figure 3). Les arilles représentent entre 50 à 70% du poids du fruit (Hernández *et al.*, 2000).

L'importance de l'épaisseur de l'écorce et des cloisons membraneuses relève du déterminisme génétique de la variété. Toutefois on peut constater des variations morphologiques du fruit sur un même individu. Ainsi, on distingue d'une part les grenades issues des fleurs précoces qui sont plus grandes avec une écorce plus épaisse et plus colorée et d'autre part les fruits issus de fleurs tardives avec un calibre moyen et une écorce légèrement mince et moins colorée (Melgarejo et Martinez, 1992). Les fruits se distinguent aussi par une grande variation dans la grosseur et la saveur. A cet effet, on distingue les grenades acides, demi aigres, douces et sucrées.

2. Mode de multiplication du grenadier

Le grenadier peut se reproduire, naturellement, par graine. Ce mode de propagation donne des pieds à fruits de forme et de qualité variables (Mars, 2001). En plus, la reproduction fidèle des variétés commerciales ne peut pas être assurée par les graines à cause de l'hétérozygotie et de l'allogamie (Jalilop et Sampath, 1990). Cependant, la multiplication végétative de cette espèce par bouturage reste la plus utilisée (Evreinoff, 1949 ; Mars, 1995 ; Tous et Ferguson, 1996). En se basant sur le calibre, les qualités pomologiques et gustatives du fruit, ce type de multiplication donne des arbres conformes aux caractères du pied mère. Etant donné que les variétés sauvages présentent une meilleure adaptabilité climatique et résistent mieux aux maladies et aux attaques d'insectes, la multiplication par bouturage permet de produire et de sélectionner des variétés performantes (Sharma et Sharma, 1990). Des boutures de 20 à 30 cm sont prélevées en décembre et conservées en stratification avant leur plantation en pépinière, de telle façon qu'un œil seulement reste au-dessus du sol, tous les autres sont enterrés. Les boutures s'enracinent facilement et rapidement et dès le printemps suivant elles peuvent être mises en place (Walali *et al.*, 2003). Les plants peuvent être produits en sachets ou à racines nues (Oukabli *et al.*, 2004). L'utilisation des hormones d'enracinement n'est pas nécessaire (Özgüven et Yilmaz, 2000).

3. Origine géographique et aire de répartition du grenadier

3.1. Origine géographique du grenadier

Le grenadier serait originaire d'Iran et d'Afghanistan où il croît de façon spontané depuis plus de 4000 ans. On le retrouve également sur des bas-reliefs égyptiens datant de 2500 ans avant JC et au jardin botanique de Thoutmôsis III créé en 1450 avant JC. (Amouretti et Comet. 1992).

Les nomades arabes, dans leurs transhumances, en ont facilité la dissémination. En effet, en raison de la résistance de son écorce qui en fait un fruit de longue conservation et peu susceptible d'être altéré durant le transport, la

grenade a constitué, très tôt dans l'histoire, un des aliments de base des voyageurs et des caravaniers. D'autant plus que sa pulpe gorgée d'eau et légèrement acidulée permettait d'absorber la soif durant les longues traversées du désert (Sanchez-Monge, 1974; Ciaraldi, 1999; Jacomet *et al.*, 2002).

La culture du grenadier a débutée dans l'ancienne Perse et par la suite importée en Occident sur les pourtours du bassin méditerranéen de l'Europe et de l'Afrique du nord. En effet, la plante fut introduite à Rome à la fin des guerres puniques, rapportée par les Romains après leur victoire sur les Carthaginois (Boullard, 2001).

Les Maures, berbères d'Afrique du nord, ont introduit cette espèce dans la péninsule ibérique au VIIIème siècle lors de la conquête de ce territoire. Forts appréciés dans le sud de l'Espagne, les grenadiers connaissent alors une culture intensive (Oury, 1984 ; Sijelmassi, 1991). L'ancienne cité primitive d'Elvira conquise par les Maures fut au XIème siècle, renommée « Garnat Al Yahud », c'est-à-dire Grenade. Les conquistadors espagnols ont également introduit le grenadier en Amérique et aux Antilles au XVème siècle lors de la découverte du continent Américain (Oury, 1984 ; Sijelmassi, 1991). Dans les Antilles, au nord du Venezuela, se trouve d'ailleurs un archipel d'une superficie d'environ 340 km², composé d'une île principale dénommée Grenade et de quelques îles appelées « îles des grenadines ».

3.2. Répartition et production du grenadier dans le monde

Le grenadier est caractérisé par une large répartition géographique qui s'étend de l'Iran à l'Himalaya (Behzadi Shahrabaki, 1998). Il occupe les zones tropicales, subtropicales, les milieux arides, semi arides et même les oasis (Mars, 2001). Le grenadier est fort présent au Moyen-Orient. Il s'étend au niveau de la région méditerranéenne grâce à la propagation et la germination facile de ses graines qui sont disséminés par les nomades, les oiseaux ou d'autres animaux (Sanchez-Monge, 1974). (Figure 4).

La culture du grenadier a connue un regain d'intérêt ces dernières années. Ainsi, la culture de cette espèce s'étale sur une superficie de 140.000 ha. Actuellement l'Inde, l'Iran, la Chine, la Turquie et les Etats Unies d'Amérique constituent les principaux pays de culture de grenadier aussi bien en termes de superficie que de production (Jadhav et Sharma, 2007; Chandra *et al.*, 2010b) (Figure 4). Toutefois, la culture du grenadier connaît un engouement au niveau de certains pays considérés comme de nouveaux producteurs, à l'instar du Pakistan, Espagne, Maroc, Tunisie, Afghanistan, Tadjikistan, Jordanie, Égypte, Italie, Azerbaïdjan, Libye, Liban, Soudan, Myanmar, Bangladesh, Mauritanie, Chypre, Grèce, France, Chine et Japon (Melgarejo et Salazar, 2003).

Par ailleurs, environ 500 variétés ont été répertoriées à l'échelle mondiale dont 50 variétés sont cultivées à des fins commerciales (IPGRI, 2001). Dans ce sens, se distinguent les pays méditerranéens en tant que principal centre de la commercialisation du grenadier, suivis par les pays asiatiques, les pays de l'ex-URSS ainsi que certaines régions de l'Argentine, l'Australie, le Brésil, le Chili, l'Afrique du Sud et les États-Unis (La Rue, 1980; Mars, 1995; Frison et Servinsky, 1995). Les cultivars les plus connues commercialement sont Roja en Espagne, Hicazuar en Turquie, Jolone Seedless en Inde, Manfalouty en Egypte.

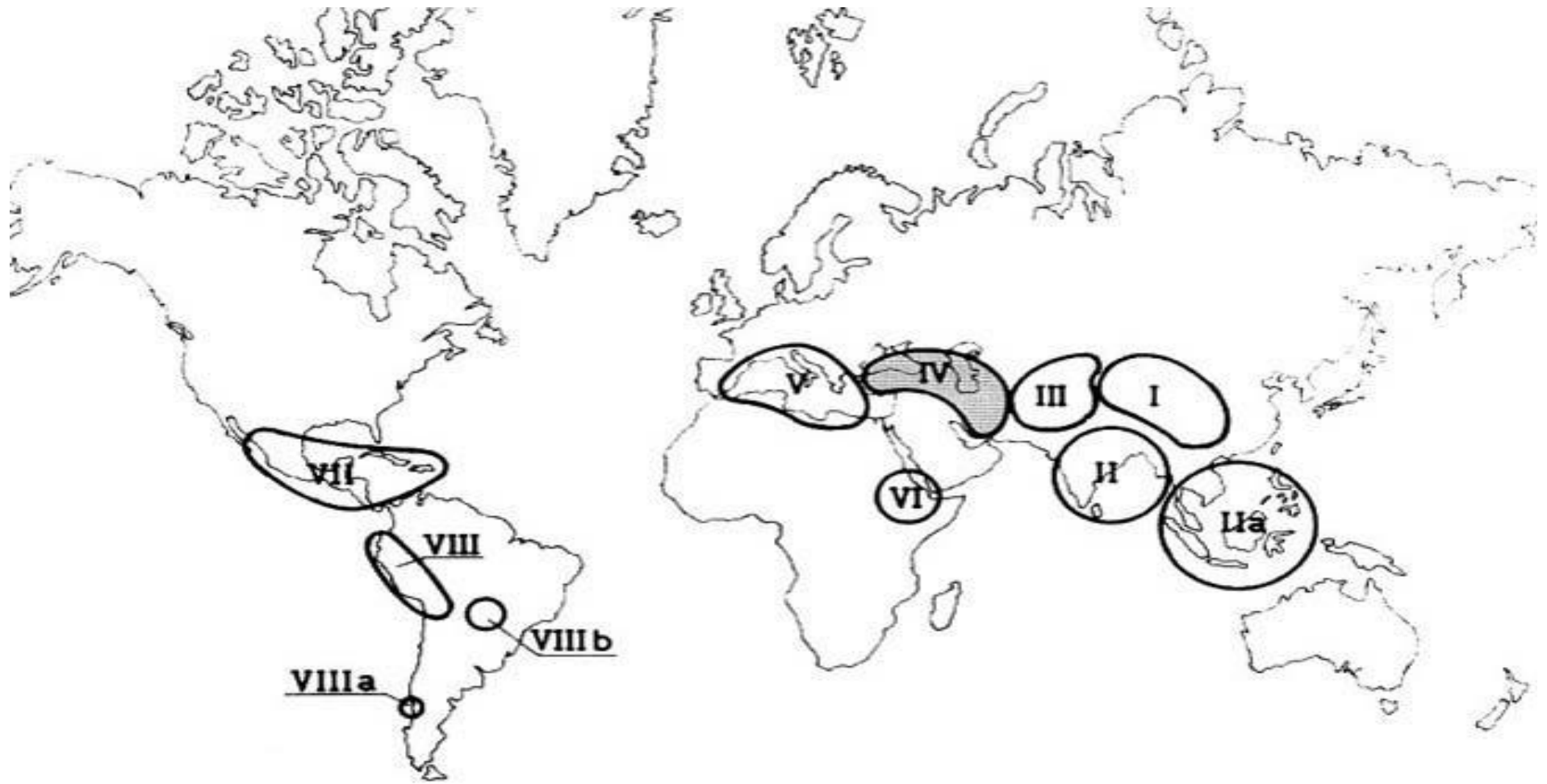


Figure 4: Centres d'origines et de diversité du grenadier (Sanchez-Monge, 1974).

La production de la grenade montre une allure croissante durant ces dernières années, en réponse à une demande de plus en plus élevée encouragée par un regain d'intérêt pour ce fruit apprécié par les consommateurs pour ses valeurs nutritionnelles et ses propriétés thérapeutiques et ornementales. En 2006, la production mondiale était de 1 500 000 tonnes (Holland et Bar-Ya'akov, 2008). En 2012, la production en grenade a connue une nette augmentation pour atteindre 2 400 000 tonnes (Figure 5) (Melgarejo et Valero, 2012), ce qui montre le réel dynamisme que connaît le secteur du grenadier actuellement.

En termes de rendement, l'Espagne et les Etats-Unis d'Amérique sont les deux pays où le grenadier est le plus productif avec des rendements moyens à l'hectare d'environ 18,5 et 18,3 tonnes respectivement (Chandra et Meshram, 2010).

Concernant les exportations, l'Iran représente le premier exportateur (60000 tonnes), suivi par l'Inde (35 180 tonnes), les Etats-Unis (31 000 tonnes) et l'Espagne (14 000 tonnes) (Holland et Bar-Yaacov, 2008; Chandra et Jadhav, 2009).

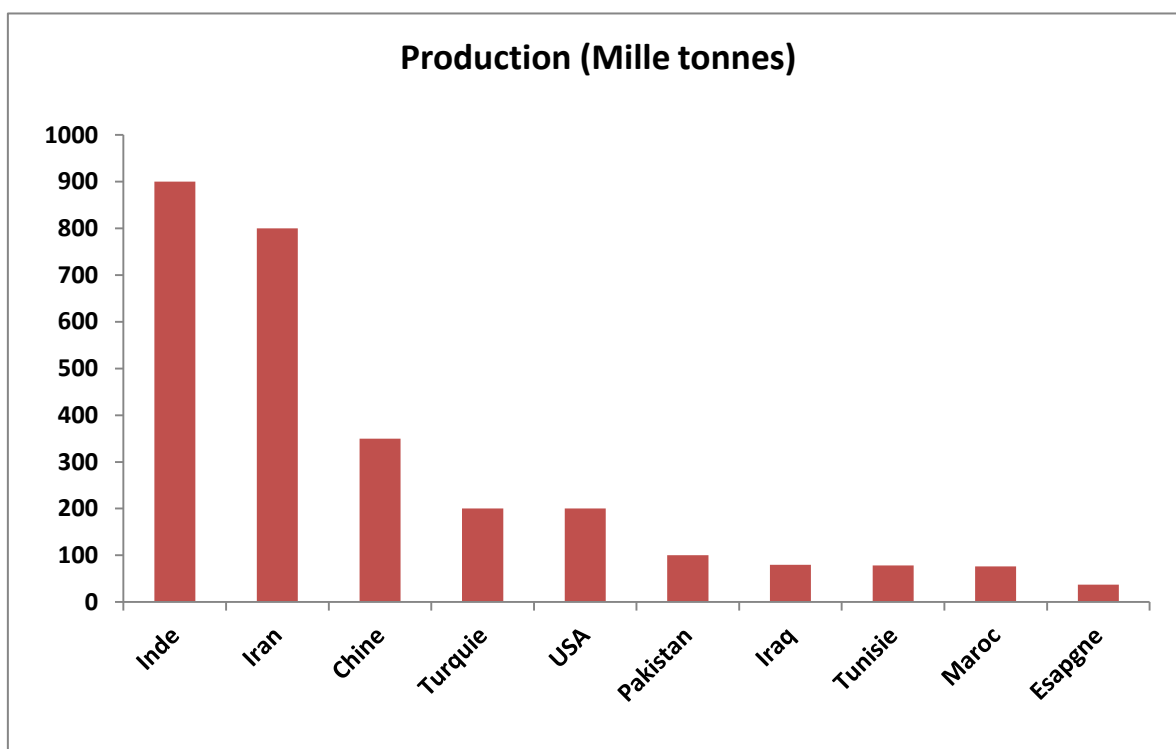


Figure 5: Pays producteurs des grenades (Melgarejo et Valero, 2012).

3.3. Répartition et importance du grenadier au Maroc

Au Maroc, la superficie emblavée par la culture du grenadier a connu une grande extension durant ces dernières années grâce aux efforts déployés dans le cadre des orientations stratégiques du Plan Maroc Vert mis en place par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. En effet, cette superficie est passée de 5820 ha en 2009 à 8218 ha en 2012, soit une augmentation de plus de 29 % en moins de 3 ans (Figure 6). Cette espèce est cultivée dans toutes les zones de culture allant du Nord au Sud du pays avec une certaine concentration dans la plaine du Tadla (35%), Haouz (20%), Settat (16.6%), Taounate (5.8%), Nador (5.3%), Chefchaouen (4.5%), Azilal (3,3%) et certains Oasis du Sud (MAPM, 2012). Aussi, sur le plan de la conduite culturale, deux modes de conduites peuvent être distingués : des plantations en monoculture ou celles en associations avec d'autres arbres fruitiers en occurrence l'olivier (Oukabli *et al.*, 2004).

De même, la production a connu une nette augmentation durant ces dernières années. En effet, la production en grenade a atteint un total de 76 300 tonnes durant la campagne agricole 2011/2012 contre 35.000 tonnes durant la campagne agricole 2001/2002. Ce chiffre reste relativement faible vu que les nouvelles plantations ne sont pas encore productives. Les rendements les plus importants sont obtenus dans la région de Tadla (24,8 t/ha) contre 12,5 t/ha comme moyenne nationale.

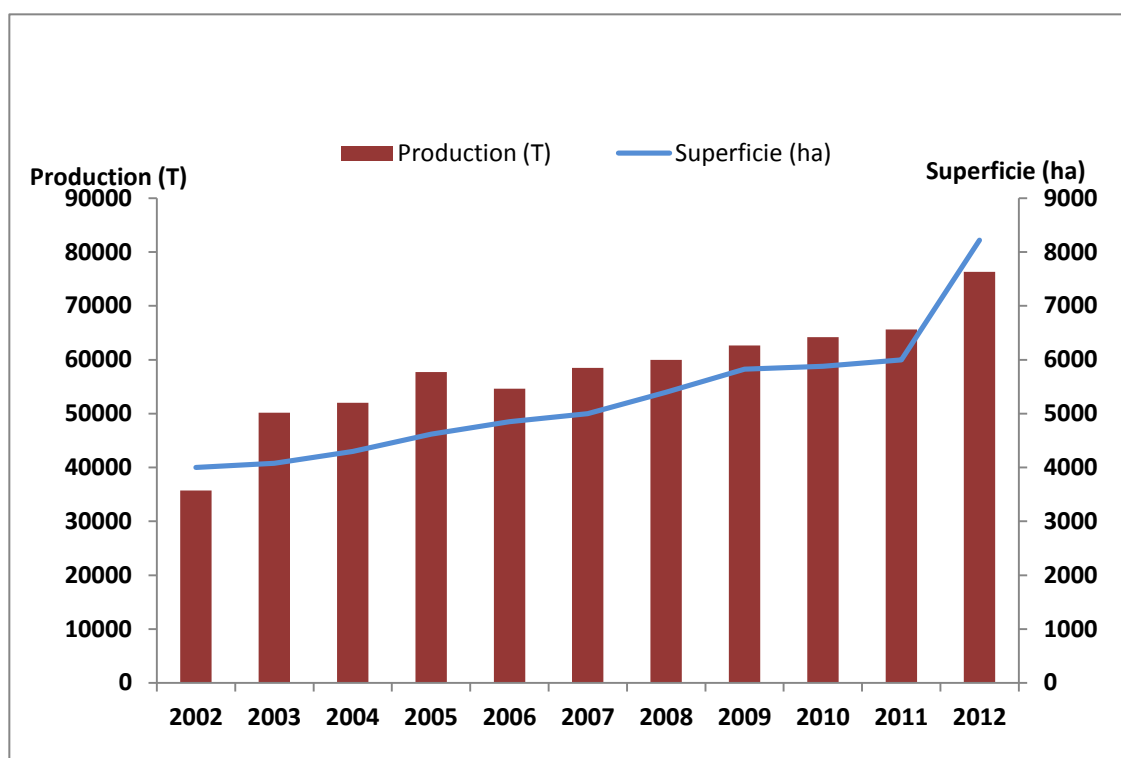


Figure 6: Evolution de la superficie et de la production du grenadier au Maroc. (MAPM, 2012)

D'autre part, l'exportation des grenades nationales reste négligeable. La quantité exportée représente moins de 1% de la production marocaine. Ainsi, des mesures d'incitation des exportations et de valorisation de la production nationale s'imposent pour assurer un développement harmonieux de la filière de grenadier et ériger celle-ci au même rang que les autres filières arboricoles marocaines stratégiques.

4. Utilisation et voie de valorisation des produits et sous-produits du grenadier

Depuis fort longtemps, la grenade fait partie intégrante de l'alimentation humaine. La couleur, les goûts et les arômes de ses arilles ont toujours constitué des éléments d'attraction et d'incitation de sa consommation. Frais ou sous forme de produits transformés, la grenade constitue une source indéniable de nutriments dont les métabolites secondaires sont parmi les plus importants. La partie comestible de la grenade constitue environ 52% de la masse total du fruit et comprend 78% de jus et 22% de graines (Kulkarni *et al.*, 2005).

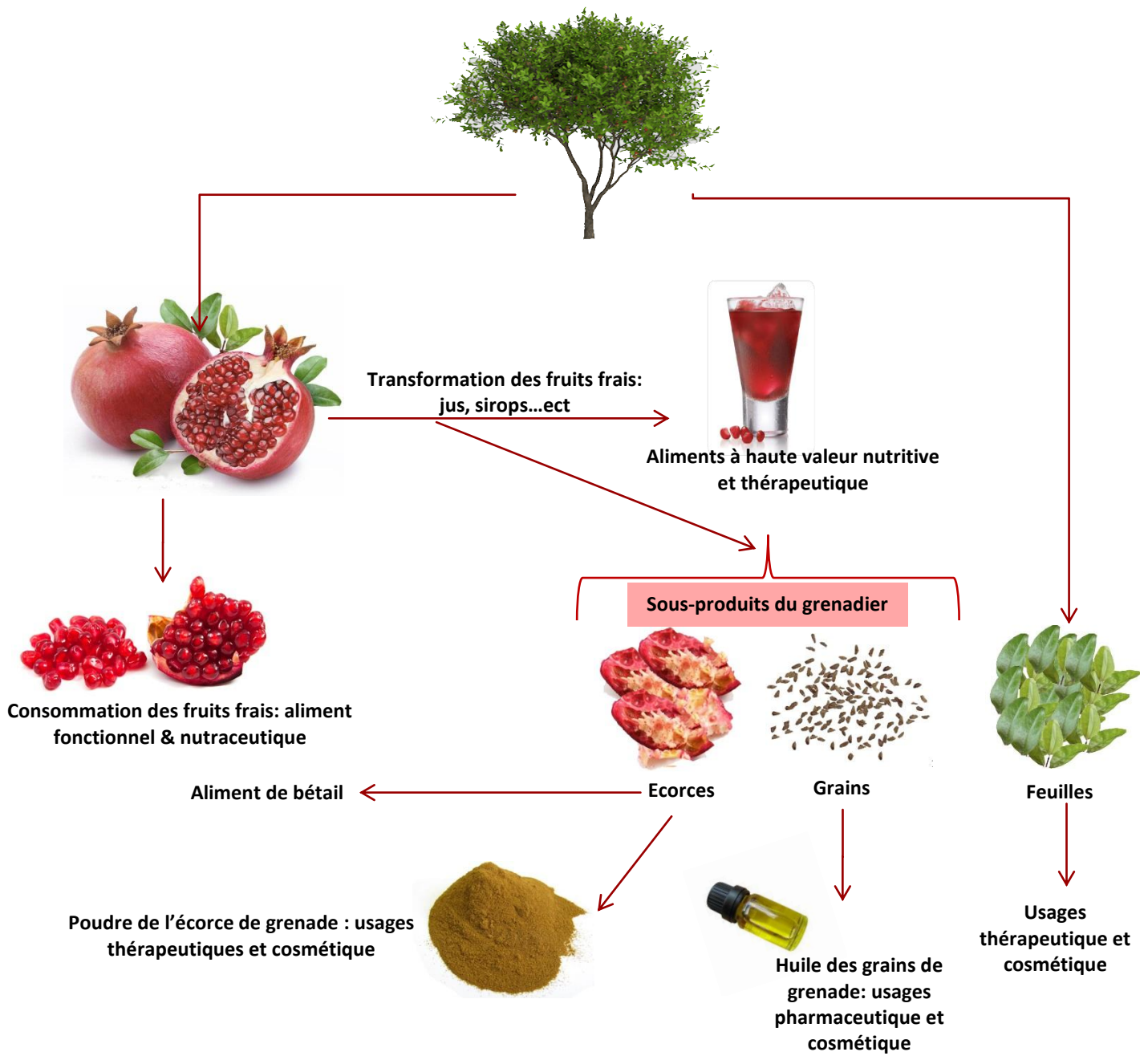


Figure 7: Schéma illustrant les différentes utilisations et voies de valorisation des grenades

Durant la dernière décennie, nombreux sont les travaux scientifiques conduits pour la caractérisation de la valeur nutritionnelle et des bienfaits de la consommation de la grenade sur la santé humaine (Balasundram *et al.*, 2006; Mertens-Talcott *et al.*, 2006; Seeram *et al.*, 2007; Basu et Penugonda, 2009). Les principaux résultats de ces travaux ont permis de mettre en évidence une richesse éminente de ce fruit et ses produits en composés dits bioactifs, particulièrement les composés phénoliques et volatiles. Ainsi, grâce à ses valeurs nutritionnelles et thérapeutiques la grenade est actuellement parmi les plus importants aliments dont la consommation est recommandée. En outre, au-delà de l'utilisation alimentaire de la grenade, les sous-produits engendrés par son utilisation aussi bien comme fruit frais ou résultant de sa transformation en jus et en sirop entre autres, ont une grande valeur nutritive. Ainsi, les voies de leur valorisation sont multiples (Figure 7).

4.1. Valeur nutritionnelle et bienfaits sur la santé humaine

La grenade est caractérisée par une valeur énergétique très élevée (Melgarejo *et al.*, 2000). Les données sur la richesse de la grenade en éléments nutritifs sont présentées dans le tableau 1. Le jus de grenade est riche en glucides avec environ 14g par 100 g de partie comestible. Il est constitué en proportions pratiquement égales en fructose et en glucose et en acides organiques. Entre 1 et 2 g d'acides organiques, sont essentiellement sous forme d'acide citrique. En effet, la valeur énergétique apportée par la consommation de 100 g de grenade permet un apport calorique moyen de l'ordre de 83 Kcal. Le fruit du grenadier a une composition nutritive variée et riche. Il constitue une source non négligeable de vitamines en particulier C et K, on trouve également des acides aminés tels que la valine, la proline et la méthionine (Lansky *et al.*, 2007). Ainsi, en moyenne, la grenade est constituée de 74.4 à 82.2% d'eau, 0.3 à 0.5% de protéines brutes, 0.1 à 0.3% de lipides, 14.6% de sucres et amidon et 5.1% de cellulose (FAO, 2009).

Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence qu'en plus de sa richesse nutritionnelle, la grenade comporte plusieurs composés phénoliques connus par leurs effets positifs sur la santé humaine en particulier en tant qu'agents anti-

oxydants (Lansky et Newman, 2007; Viuda-Martos *et al.*, 2010). Ainsi, même si la richesse de la grenade en ces composés reste tributaire des facteurs génétiques (variété), climatiques, culturelles et du stade de maturité (Mirdehghan et Rahemi, 2007; Borochoy-Neori *et al.*, 2009), les principaux composés phénoliques reportés être présents au niveau de la grenade sont des anthocyanes, des tanins et l'acide ellagique (Kaplan *et al.*, 2001; Noda *et al.*, 2002; Cerda *et al.*, 2003).

Tableau 1: Composition chimique du jus de grenades par 100 g de la partie comestible du fruit.

Eléments nutritifs	Valeur nutritive pour 100 g
Eau	80,97 g
Valeur énergétique	83 Kcal
Carbohydrates	18.70 g
Protéines	1.67 g
Matière grasse totale	1.17 g
Cholestérol	0 mg
Fibres	4 g
Vitamine A	108 IU
Vitamine C	10.2 mg
Vitamine E	0.60 mg
Vitamine K	16.4 µg
Calcium	10 mg
Cuivre	0,18
Irone	0.30 mg
Magnésium	12 mg
Manganèse	0.119 mg
Phosphore	36 mg
Zinc	0.35 mg
Sodium	3 mg
Potassium	236 mg
Alpha- Carotène	50 µg
Beta-Carotène	40 µg

(Source: USDA 2007)

En plus de la consommation de ce fruit à l'état frais, la grenade est largement utilisée pour la fabrication des jus. Ce dernier est reporté être particulièrement riche en anthocyanes qui sont responsables de la couleur rouge de ce produit. En général, jusqu'à 55 composés bioactifs ont été identifiés dans le jus de grenade (Fischer *et al.*, 2011).

Sur le plan thérapeutique, grâce à la richesse de la grenade et de son jus en éléments bioactifs, plusieurs travaux *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence les principales actions bénéfiques sur la santé humaine que peut avoir la consommation de ces produits. Dans ce sens, la grenade et son jus ont été reportés avoir des effets anti-oxydant (Seeram *et al.*, 2006; Borohov-Neori *et al.*, 2009), anti-allergique (Damiani *et al.*, 2009), anti-microbienne (Al-Zoreky 2009; Su *et al.*, 2010, 2011), anti-plasmodiale (Dell'Agli *et al.*, 2009), anti-diabétique (Julie, 2008; McFarlin *et al.*, 2009), anti-cancérigènes (Seeram *et al.*, 2005; Khan, 2009) et digestif (Wang *et al.*, 2010). De même, elle a été utilisée comme agent anti-parasitaire, comme un tonique du sang et de la guérison des ulcères. Une étude récente a montré que les grenades améliorent le syndrome métabolique (Medjakovic et Jungbauer, 2012). En effet, la présence de vitamine C contribue à la santé des os, des cartilages, des dents et des gencives. De plus, elle protège contre les infections et favorise l'absorption du fer contenu dans les végétaux. De même, la présence de la vitamine B6 connue sous le nom de pyridoxine participe au métabolisme des protéines et des acides gras, ainsi qu'à la fabrication de neurotransmetteurs. Cette vitamine a également un rôle dans la fabrication des globules rouges et elle est aussi nécessaire à la transformation du glycogène en glucose et contribue au bon fonctionnement du système immunitaire. La vitamine B6 joue aussi un rôle dans la formation des cellules nerveuses (Miguel *et al.*, 2010; Syed *et al.*, 2010). La grenade contient des concentrations assez importantes en oligo-éléments notamment en cuivre qui est nécessaire à la formation de l'hémoglobine et du collagène et qui entre dans la composition de nombreuses enzymes.

4.2. Voie de valorisation des sous-produits des grenades

4.2.1. Pépins

Les pépins de la grenade proviennent du processus industriel de fabrication des jus et des autres produits transformés de ce fruit. Ils représentent environ 3% du poids total du fruit (Faria et Calhau, 2011). La principale voie d'utilisation de ce sous-produit est l'extraction de l'huile qui représente 12% à 20% du poids total de la graine (Al-Maiman et Ahmad, 2002). Cette huile présente une composition particulière avec la dominance des acides gras conjugués (65 à 80%) dont l'acide 11-cis-13-trans-octadecatriénoïque connu sous le nom d'acide punique qui est le plus dominant (Abbasi *et al.*, 2008). L'extraction de cette huile est particulièrement faite par des solvants et pour la préserver contre l'oxydation, des techniques de mise en capsules sont actuellement disponibles (Eikani *et al.*, 2012). Cette huile est essentiellement utilisée pour des fins thérapeutiques. Elle présente de nombreuses propriétés biologiques (Eikani *et al.*, 2012) ainsi que des activités anti-inflammatoire (Boussetta *et al.*, 2009). L'incorporation de l'huile des pépins de grenade dans le régime alimentaire inhibe le développement de certaines maladies du colon (Kohno *et al.*, 2004).

4.2.1. Ecorce

La valeur énergétique de l'écorce des grenades est assez élevée grâce aux pectines digestibles et aux sucres. À cette fin, ce produit a été depuis longtemps utilisé dans l'alimentation de bétail. Toutefois, les nouvelles évidences scientifiques sur les propriétés nutraceutiques et thérapeutiques des extraits phénoliques de l'écorce ont orienté son utilisation vers les domaines pharmaceutiques et cosmétiques. Dans ce sens, plusieurs études ont mis en évidence le potentiel thérapeutique de l'écorce de grenade en mettant l'accent sur ses propriétés antimicrobiennes et anti-oxydantes (Guo *et al.*, 2003; Negi *et al.*, 2003; Okonogi *et al.*, 2007; Tehranifar *et al.*, 2011), anti-inflammatoire et anti-allergique (Panichayupakaranant *et al.*, 2010), anti-diabétique, anti-cancérogènes et digestif (Ismail *et al.*, 2012).

D'autre part, l'écorce des grenades est utilisée comme un colorant au tannage et en teinture dans plusieurs pays comme le Maroc, la Tunisie, le Japon, l'Afghanistan, l'Inde... (Lloyd, 1987). En effet, cette écorce fournit de nombreux principes tinctoriaux, aux couleurs très variées, tels que le vert, une large palette de jaune, le gris, le brun et le noir. L'écorce de la grenade contient environ 28% d'ellagitanins, tel que le flavogallol (de couleur jaune), la punicaline, la punicalagine, la punicalcortéine, la punigluconine et les granatines A et B. Un arbre peut fournir jusqu'à 1 Kg d'écorce de grenade séchée par an (Wald, 2009). Ainsi, l'écorce de la grenade fut quelques fois utilisée, pour remplacer la noix de galle, dans la préparation de l'encre (Wald, 2009). En plus de l'écorce des fruits, l'écorce de la racine, les branches et le tronc sont également utilisés.

Au Maroc, l'écorce de la grenade est employée, avec mordantage à l'alun, pour donner leur belle couleur jaune aux cuirs marocains, utilisés par exemple pour la réalisation des babouches. (Lloyd, 1897). Les écorces de fruits verts sont utilisées pour réaliser des couleurs jaune pâle et les écorces de fruits mûrs pour les tons dorés (Wald, 2009).

5. Variétés répertoriées au Maroc

Sur la base de la caractérisation pomologique, deux groupes de variétés ont été caractérisés au Maroc selon leur destination à la consommation en frais ou à la transformation (Walali - Loudyi, 1995).

5.1. Grenades à consommation en frais

Ce groupe présente des variétés à pépins souvent rouges, juteuses et tendres. Un nombre important de variétés sont cultivées au Maroc dont les principales sont :

- Grenade rouge: variété à vigueur moyenne avec un port retombant. Le fruit est de forme ronde, légèrement aplatie d'un poids moyen de 375g avec une écorce fine de couleur jaunâtre lavé de rouge du côté ensoleillé. Les graines sont rouges, juteuses

et sucrées à pépins tendres qui s'égrainent facilement. Le rendement moyen est de 68 kg par arbre en pleine production.

- Grenade jaune: arbre à port retombant et légèrement plus vigoureux. Le fruit est de forme ronde, légèrement aplatie, d'un poids moyen de 380 g, à écorce fine, de couleur jaunâtre. Les graines sont rouges, juteuses, d'un calibre supérieur à celles de la variété précédente et à pépins très tendres. Le rendement moyen est de 61kg par arbre.

- Zhéri : variété d'origine tunisienne à vigueur moyenne avec un port semi-dressé. Cette variété est constituée de deux clones : Zhéri précoce et Zhéri tardif qui ont un décalage de maturité d'environ deux semaines. Leurs caractéristiques pomologiques sont proches : des baies de couleur jaune-orange et calibre moyen de 300 à 350 g. Les graines sont tendres et de poids moyen de 0.4 à 0.5 g, avec une couleur rose pour Zhéri précoce et blanche pour Zhéri d'automne et une acidité de 0.25g/100 g de jus et un degré Brix de 15. Elles sont juteuses et très sucrées. Cette variété fleurit en fin Avril et arrive à maturité entre fin Septembre et mi-octobre. Elle est précoce et donne des rendements de 20 à 25 kg/arbre à la 8ème année d'âge.

- Sefri : variété à vigueur moyenne, avec un port semi-dressé et compact. Le fruit est de grande taille (500 g) de couleur jaune avec une pulpe assez épaisse (6 mm). Les graines sont de couleur rose-claire, demi-tendre, juteuses et très sucrées avec un degré Brix de 14 et une acidité de 0.24 g/100g de jus. Ce génotype semble être polyclonal. Sa floraison débute la première semaine de Mai et s'étale sur un mois. Sa maturité se situe en début Octobre.

- Djeibi : arbre vigoureux et à port semi-dressé. Le fruit est de taille moyenne avec des écorces de couleur jaunâtre. Les graines sont d'un poids de 0.4 g, demi-tendres, rose-claires et très sucrées (16 °Brix, acidité : 0.2 g/100 g de jus). Cette variété fleurit début mai et mûrit à partir de la mi-octobre.

- Gordo de Jativa : variété d'origine espagnole à une vigueur moyenne à élevée avec un port semi-dressé. Ses fruits ont un calibre moyen à gros (325 g) avec une

couleur jaune orange de l'épiderme. Elle se caractérise par une peau très fine (2mm). Les graines sont tendres, de poids moyen de 0.5 g, roses et sucrées (°Brix de 14 et acidité de 0.32 g/100g de jus) (Oukabli, 2004). Elle arrive à maturité en fin septembre et son rendement est moyen.

Il existe d'autres variétés cultivées au Maroc à regain d'intérêt telles que :

- Kharazi : c'est une variété dont le fruit présente une écorce fine avec des graines juteuses colorées et des pépins tendres.
- Mesri : c'est une variété cultivée surtout dans la région de Bzou. Les fruits sont gros rouges avec des graines sucrées colorées, juteuses et à pépins tendres.
- Laroussi : c'est une variété localisée dans la région de Fès. Elle est caractérisée par des fruits de très gros calibres avec des graines qui sont sucrées et des pépins demi-durs.

5.2. Grenades à destination industrielle

Ce groupe est caractérisé par des variétés à pépins souvent durs et acides. Elles sont destinées pour la production des sirops ou des jus. On peut les classer en fonction de leur taux d'acidité par ordre croissant: Wonderful, Negro, Monstruoso, Dwarf semi evergreen (INRA-Béni Mellal, 2009).

6. Etat phytosanitaire du grenadier au Maroc

Le grenadier et la grenade ont peu d'ennemis. La plupart des ravageurs du grenadier sont répandus dans les pays tropicaux ou les régions côtières et très peu présentes dans les régions continentales. Au Maroc, les principaux ravageurs et maladies du grenadier sont présentés ci-dessous par ordre d'apparition :

- Les pucerons qui sont de types *Aphis. gossypii* et *Aphis. Punicae*. Ces insectes nuisibles dévorent les jeunes pousses, les feuilles, les boutons floraux et peuvent se trouver même sur les jeunes fruits. Les dégâts se manifestent par la chute des

organes infestés. La lutte chimique nécessite des traitements répétés avec des produits variés (Fakhour, 2012).

- La pourriture du fruit, dûe à *Aspergillus castaros*, champignon qui entraîne un noircissement interne du fruit qui devient nauséabond et impropre à la consommation. Cette maladie est fréquente dans les zones fortement humides (Mars, 1995).

- Cératite : causée par un lépidoptère *Ectomyelois ceratoniae* considéré comme le plus grand ennemi des grenades, pouvant causer des dégâts considérables en affectant 80% des fruits d'une récolte (Dhouibi, 1992). Cette espèce est assez fréquente dans les régions chaudes et humides du Moyen Orient, du sud de la Méditerranée et même de l'Australie et de la Californie. Les pertes occasionnées par cette espèce se traduisent surtout par la pourriture des grenadiers qui les rendent impropres à la consommation. La ponte des œufs d'*Ectomyelois ceratoniae* est surtout privilégiée au niveau du calice. Ainsi, la position pendante des fruits au niveau des arbres ne facilite guère la pulvérisation de produits d'origines chimiques ou biologiques (comme ceux à base de *Bacillus thuringiensis* ou de *Saccharopolus paraspinosa*). Les moyens de lutte utilisés pour atténuer les attaques de la pyrale des caroubes sont basés sur :

- L'application de techniques culturales (élimination des fruits pourris et éclatés).
- Renforcement de la faune auxiliaire associé aux espèces nuisibles présentes.

- Zeuzères : Ces insectes *Zeuzera pyrina* L, à l'état de larve, creusent des galeries sur le tronc et les grosses branches, pouvant provoquer leur cassure. Les dégâts sont plus importants dans les zones côtières (Mars, 1995).

7. Ressources génétiques du grenadier

La gestion et la conservation des ressources génétiques du grenadier, de même que la définition de nouvelles stratégies d'amélioration génétique, passent par l'analyse et la compréhension de la structure génétique non seulement des formes cultivées, qui pourraient provenir de la domestication et la diversification de cette espèce mais aussi des formes sauvages du grenadier susceptibles d'être des sources de diversité génétique utilisables et également celui de *P. protopunica*, forme apparentée à *P. granatum* (MARS, 2001). Divers travaux se sont intéressés, ces dernières années, à cette espèce et ont touchés l'identification variétale ainsi que l'étude de la diversité génétique et sa structuration impliquant aussi bien les paramètres morphologique que les marqueurs moléculaires.

7.1. Caractérisation morphologique

Cette caractérisation consiste à la description des variétés de grenadier sur la base des paramètres morphologiques des différents organes. Ces paramètres dépendent de l'environnement, de l'âge et de l'état phytosanitaire des plants. Leur caractérisation nécessite un suivi régulier tout au long de l'année afin de couvrir tous les stades physiologiques de l'espèce. En effet, les caractères morphologiques, sont souvent à déterminisme génétique complexe et résultent de l'action de plusieurs traits : à la fois sous l'influence d'un environnement et d'une pression d'évolution données (Iezzoni et Pritt 1991). Plusieurs travaux se sont intéressés à la caractérisation morphologique des cultivars du grenadier. Cette caractérisation a concerné des caractères quantitatifs et qualitatifs des feuilles, fleurs et fruits. Les résultats obtenus ont permis d'estimer les ressemblances entre les cultivars et d'élucider plusieurs cas d'homonymies et de synonymies (Melgareijo et Martinez, 1992 ; Levin, 1994 ; Mars et Sayadi, 1992 ; Mars et Marakchi, 1999 ; Amoros *et al.*, 2000 ; Zamani *et al.*, 2007).

En Tunisie, l'étude des paramètres morphologiques des feuilles, fleurs et fruits ainsi que la dynamique de la floraison et du régime de reproduction de certains cultivars ont montré que le matériel végétal de cette espèce présente une

grande diversité (Mansour *et al.*, 2011). Toujours en Tunisie, les travaux de Mars et Marrakchi (1998) ont permis d'identifier certaines variétés des polyclones sur la base de paramètres morphologiques et d'autres variétés sont classées selon le goût des fruits (sucré, sucré/acide, acide), la période de maturation, la dureté des graines et le rendement en jus. Dans un autre travail, Mars et Marrakchi (2004) ont montré que les variables liées à la taille et à la couleur du fruit et aux caractéristiques du jus sont les paramètres les plus discriminants des cultivars Tunisiens.

En Espagne, une étude basée sur les traits morphologiques des fruits et des graines et des caractéristiques chimiques du jus a été réalisée chez cinq cultivars de grenadier (Amoros *et al.*, 2000). Les résultats obtenus ont montré une variabilité entre les cultivars étudiés pour les paramètres : poids moyen du fruit, production des graines, la teneur en jus et l'acidité des jus. De même, une corrélation positive a été obtenue entre le rendement des arbres et la taille et le poids des fruits (Amoros *et al.*, 2000).

En Turquie, l'étude des caractéristiques morphologique et chimique de 76 cultivars de grenadier a révélé l'existence d'une grande diversité morphologique entre ces cultivars. Les résultats obtenus ont montré que certains cultivars se sont distingués en termes de paramètres de qualité de fruits. Ces cultivars pourraient être utilisés pour l'extrait des arilles et le jus puisqu'ils présentent des arilles de grande taille et de couleur rouge foncé et un jus de bon goût. En outre, d'autres cultivars doux caractérisés par des graines tendres avec des arilles de couleur rouge étaient très prometteurs pour la consommation en frais (Caliskan et Bayazit, 2013). Dans une autre étude, Muradoglu et al. (2006) ont montré que les ressources génétiques de cette espèce en Turquie présentent une diversité phénotypique très importante.

De même, en Italie, la caractérisation morphométrique des variétés originaires de la Sicile, a montré la présence d'une grande variabilité (Barone *et al.*, 2001).

Dans une autre étude concernant des cultivars Iraniens, le poids du fruit varie entre 197 g et 315 g, le pourcentage en arilles est compris entre 38–65% du poids total du fruit, écorce (32,28–59,82%), pépins (9,44–20,55%) et jus (26,95–46,55ml/100g du fruit) (Tehraniifar *et al.*, 2010).

Au Maroc, quelques travaux ont été réalisés en se basant sur des études morphométriques de certaines variétés. Oukabli *et al.* (2004) ont montré une diversité des caractères pomologiques notamment la qualité gustative et la texture des baies entre 17 cultivars (11 clones locaux et 6 variétés étrangères) installés en collection à Meknès. Les accessions indigènes sont plus attractives et des caractéristiques qualitatives propres pour une consommation en frais. Les génotypes Sefri, Zhéri précoce et d'automne, Djeibi, et Gordo de Jativa ont présentés les meilleures caractéristiques pomologiques des fruits. Aussi, une autre caractérisation morphologique des cultivars récoltés dans différentes régions du Maroc a été réalisée par Martinez *et al.* (2012). Ce travail témoigne de l'existence d'un patrimoine génétique très riche et diversifié. En effet, le poids moyen de fruits étudiés varie de 430,8 g pour le cultivar Rouge Marrakech à 535,1g pour le cultivar Sefri. Ce dernier est considéré comme un cultivar avec un fruit de grande taille mais il n'est pas significativement différent des deux cultivars d'Ounk Hman et Ruby. Cependant, les cultivars Jaune Marrakech et Rouge Marrakech ont montré les tailles les plus petites. En outre, une forte corrélation a été obtenue entre le poids et la taille des fruits ($r=0,88$). Par ailleurs, le cultivar Rouge Marrakech présente les valeurs les plus élevées pour le poids des arilles tandis que Bouaâdime possède les valeurs les plus faibles.

Une autre étude a été rapportée par Hmid *et al.* (2013) concernant la caractérisation pomologique de dix huit cultivars du grenadier de la collection de l'INRA de Meknès. Les résultats obtenus révèlent une variabilité significative entre les différents cultivars étudiés pour l'ensemble des paramètres mesurés à l'exception de la longueur de la graine et du poids des pépins. Ces différences soulignent la grande variabilité phénotypique observée entre les variétés étudiées.

7.2. Caractérisation Biochimique

Dans ce type d'analyses, différents composés peuvent être étudiés : protéines, polyphénols, les huiles ou les antioxydants.

7.2.1. Protéines ou enzymes

Ces marqueurs sont de type co-dominant et à déterminisme génétique simple. Ils ont été utilisés dans l'étude de la diversité génétique chez plusieurs espèces fruitières et la classification des différentes variétés. Des marqueurs enzymatiques ont été utilisés pour caractériser les cultivars de grenadier chinois (Yuan *et al.*, 2007). Ces travaux ont indiqué qu'il y avait une large diversité génétique chez les cultivars de grenade en Chine. La population Henan présentait une diversité génétique plus élevée par rapport aux autres populations. Par ailleurs, Hmid *et al.* (2013) ont étudiés les effets des différents traitements enzymatiques sur la clarté des jus issus de 18 cultivars marocains. Les valeurs obtenues sont significativement affectées par la concentration de pectinase et de protéase à ($p < 0,05$). En effet, le jus traité par la pectinase varie entre 0,048 et 0,021 et celui traité par la protéase varie entre 0,053 et 0,029. Cependant, la clarté du jus de grenade augmente avec l'augmentation de la concentration de l'enzyme. Le mélange de ces deux enzymes se traduit par une plus grande limpidité du jus par rapport au jus traité par une seule enzyme. En outre, ces auteurs ont reporté que les teneurs moyennes en protéines de ces jus se situent entre 1,49g/L pour le cultivar 'Djeibi' et 8,51g/L pour le cultivar 'Dwarf Semi Evergreen'. De même, Al-Maiman et Ahmad (2002), ont montré que cette teneur est de 1,05% chez la variété Taifi en Arabie Saoudite. Ils ont montré aussi un faible changement de protéines contenues dans le jus au cours de la maturation et qui passe de 0.97 à 1.03. Le changement de la composition en protéines au cours de la maturation est déjà signalé dans d'autres fruits (Al Khalifa et Dilshad, 1998). D'autres études ont concerné les constituants des graines. El Falleh *et al.* (2010) ont signalé que les protéines de stockage contenu dans les graines variaient en fonction des cultivars (15.4 à 20.1%). Les graines ainsi

étudiées sont riches en protéines de stockage de façon indépendante de leurs groupes organoleptiques (doux, aigre doux ou aigre) (Elfalleh *et al.*, 2011).

7.2.2. Métabolites secondaires

Parmi ces métabolites on trouve les polyphénols, les huiles et les huiles essentielles. Depuis une vingtaine d'années, ces marqueurs sont explorés pour étudier la diversité des cultivars du grenadier (Melgarejo *et al.*, 1995 ; Ben Nasr *et al.*, 1996 ; Amoros *et al.*, 2000 ; El Falleh *et al.*, 2011 ; Hasnaoui *et al.*, 2011 ; Pilar *et al.*, 2012 ; Martinez *et al.*, 2012). L'analyse des proanthocyanidines a permis de classer 8 cultivars de grenadiers Tunisiens en 4 groupes (Ben Nasr *et al.*, 1996). Dans une autre étude, Hasnaoui *et al.* (2011) ont montré que la teneur en sucres et en acides organiques des jus varie en fonction des cultivars. Les résultats obtenus ont montré un taux élevé d'acide citrique chez les cultivars aigres, alors que l'acide malique était très élevé chez les cultivars doux. Par ailleurs, une variation significative de polyphénols totaux a été relevée à ($P < 0,05$) entre les dix-huit jus et la valeur la plus élevée est celle du cultivars 'Grenade jaune' (9476,32 mg/ L) tandis que la plus faible est celle du cultivar 'Zherie d'Automne' avec 1284,42 mg/ L (Hmid *et al.*, 2013). Ainsi, les arilles des cultivars Rouge Marrakech et Jaune Marrakech présentent des caractéristiques organoleptiques plus appropriés pour la consommation en frais. La valeur de pH la plus basse a été obtenue pour Bouaâdime (pH = 4,0) et la plus élevée pour Ruby (pH=5,5). Le cultivar Bouaâdime a montré la plus grande teneur en total des solides solubles avec 17,6°Brix et la plus haute acidité de 4,7g/l tandis que les autres cultivars ont présenté des valeurs d'acidité beaucoup plus faibles. Pour l'indice de maturité le cultivar Ounk Hman présente la valeur maximale avec 77,6. La plus faible valeur est enregistrée pour le cultivar Bouaâdime avec 37,4. Toutefois, les valeurs rapportées par Pilar *et al.* (2012) pour dix cultivars originaires de différentes régions du Maroc sont relativement plus élevées que celles obtenues par Hmid *et al.* (2013). Ainsi, le cultivar 'Hamde' semble particulièrement adapté pour la production des jus en raison de sa teneur élevée en composés phénoliques (Pilar *et al.*, 2012). De même, une variabilité significative a été révélée entre 25 cultivars de grenade Iranienne pour les

paramètres : acidité titrable, pH, degré Brix et indice de maturité (Fadavi *et al.*, 2005).

7.3. Caractérisation moléculaire

Grace à l'avancée des biotechnologies et au développement des techniques moléculaires, l'étude de la diversité génétique et de la phylogénie ont été explorés chez différentes espèces végétales en impliquant l'ADN génomique. Ces marqueurs moléculaires apportent des informations complémentaires aux caractères morphologiques. Ils ont l'avantage d'être spécifiques d'un génotype, neutres vis-à-vis de l'environnement, indépendants du stade physiologique de la plante et ils sont capables de couvrir tout le génome aussi bien les régions codantes que les régions non codantes. Ils permettent d'observer le polymorphisme des séquences de l'ADN de sites ou de locus répartis sur le génome. Ces marqueurs présentent plusieurs avantages : niveau de polymorphisme élevé, bonne reproductibilité, possibilité de génotypage à grande échelle et possibilité d'établissement des bases de données interchangeables (De vienne *et al.*, 1998 ; Santoni *et al.*, 2000). La technique d'hybridation moléculaire avec des sondes de séquences spécifiques et la commercialisation des enzymes de restriction, ont permis de mettre au point des techniques d'analyse du polymorphisme variétale au niveau de l'ADN (Botstein *et al.*, 1980). L'approche moléculaire de la caractérisation des variétés de grenadier consiste à établir pour chaque variété un profil moléculaire correspondant à l'analyse de plusieurs sites du génome ou loci et permettant d'identifier la variété avec certitude. Le profil moléculaire obtenu est considéré comme le génotype de référence de la variété en question. Bien que le grenadier soit une espèce qui gagne de plus en plus d'intérêt, les études génétiques sur cette espèce restent encore très limitées.

7.3.1. RAPD : Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe

Les marqueurs RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) sont représentés sur le génome en nombre illimité, généralement très polymorphes, dont la plupart d'entre eux sont considérés comme non codants (Wilianms *et al.*, 1990 ; Hardy *et al.*, 1992). La technique RAPD consiste à réaliser une réaction PCR d'une

partie inconnue de l'ADN de l'individu étudié en utilisant une amorce courte de séquence arbitraire de 10 nucléotides. Les marqueurs RAPD sont de type dominant et permettent d'analyser la diversité, sans digestion de l'ADN, sans hybridation et sans pour autant trancher entre la nature des génotypes hétérozygotes et ou homozygotes (Santoni *et al.*, 2000).

En ce qui concerne le grenadier, plusieurs travaux ont étudié la diversité génétique de différents cultivars d'origines géographiques différentes, en exploitant les marqueurs RAPD. Ces marqueurs ont été utilisés pour étudier la diversité génétique de génotypes Iraniens en exploitant 16 amorces. Ces dernières ont révélé 178 marqueurs dont 102 sont polymorphes (Sarkhosh *et al.*, 2006, 2009). De même, Zamani *et al.* (2007) ont étudié les relations génétiques des génotypes Iraniens de grenadier à l'aide des marqueurs RAPD combinés aux critères morphométriques. Parmi 113 amorces testées, 27 ont montré une bonne amplification et ont généré 158 marqueurs. Ainsi, l'analyse comparée des caractères morphologiques avec les résultats de l'analyse RAPD, n'a pas produit de corrélation significative. Ce résultat montre que l'information basée sur les caractéristiques du fruit n'était pas suffisante pour la discrimination génétique des cultivars de grenadier. Toujours chez le grenadier Iraniens, Talebi Baddaf *et al.* (2003) ont utilisé 13 couples d'amorces RAPD pour étudier le polymorphisme génétique des cultivars maintenus dans une collection. Les résultats obtenus ont montré un faible niveau de polymorphisme expliqué probablement par le mode de propagation qui est principalement de type végétatif.

De même, ces marqueurs moléculaires ont été utilisés pour étudier la diversité génétique des cultivars Tunisiens. Parmi 12 amorces testées, 4 amorces ont révélé un total de 29 marqueurs dont 82,76% sont polymorphes (Hasnaoui *et al.*, 2010).

En Chine, 12 amorces RAPD ont été utilisées pour étudier le polymorphisme des cultivars de grenadier. Les résultats ont abouti à 110 marqueurs polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 71,8% (Yang *et al.*, 2007).

Toutefois, des marqueurs RAPD se sont avérés utiles dans la séparation des génotypes de grenadier.

Ces marqueurs ont été utilisés également dans une étude de diversité chez le grenadier en Turquie (Ercisli *et al.*, 2011). Parmi 86 amorces testées, 12 amorces ont généré 145 marqueurs RAPD dont 91% sont polymorphes. Le dendrogramme a illustré cinq grands groupes avec des coefficients de similitude génétique différents. Le plus élevé était de 0.24 et le plus bas était de 0.08.

7.3.2. AFLP: Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une technique basée sur la détection des fragments de restriction d'ADN par amplification PCR. C'est une technique d'élaboration d'empreintes génétiques intéressantes en raison du nombre élevé de bandes polymorphes qu'elle fournit et par la qualité des profils qu'elle produit (De Vienne *et al.*, 1998). Les marqueurs AFLP permettent de révéler un grand nombre de marqueurs et un niveau de polymorphisme très élevé, ce qui est avantageux dans l'étude de la diversité génétique chez des espèces de génome inconnu. Ces marqueurs se sont montrés hautement polymorphes, stables et reproductibles. Ils sont utilisés pour l'identification des espèces, l'analyse de pedigree et la recherche de marqueurs génétiques liés à un caractère d'intérêt (Tagu, 1999). Ils permettent de construire la carte de marqueurs génétiques d'une part et l'identification de clones génomiques d'autre part (Vos *et al.*, 1995). Les marqueurs AFLP sont également utilisés pour identifier les variétés et pour résoudre les cas d'homonymies et de synonymies (Powell *et al.*, 1996; Desprès *et al.*, 2003).

Cet outil moléculaire a été exploité dans l'analyse de la diversité génétique chez le grenadier. En Tunisie, ces marqueurs ont été appliqués pour l'étude de la structuration génétique des cultivars de grenadier appartenant à 5 régions différentes du pays. L'utilisation de 6 couples d'amorces a donné naissance à 327 marqueurs, un nombre qui témoigne de l'efficacité de ces marqueurs pour l'étude de la diversité génétique chez cette espèce. Les résultats obtenus ont montré un regroupement

indépendamment des origines géographiques et des dénominations (Jbir *et al.*, 2012).

Ces marqueurs ont été également utilisés pour étudier le polymorphisme génétique de 85 cultivars issus de 6 populations géographiquement distinctes en chine en exploitant 8 amorces. Ces dernières ont révélé 152 bandes polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 73.26%. En outre, l'étude a montré l'absence de structuration de la diversité génétique selon les origines géographiques de grenadiers. Et que les distances génétiques entre cultivars n'étaient pas corrélées aux distances géographiques (Yuan *et al.*, 2007).

Dans une autre étude, les marqueurs AFLP ont été utilisés avec succès pour détecter la diversité génétique intra- et inter-population du grenadier en Iran. Un groupe de 67 cultivars issus de quatre populations a été étudiée à l'aide de 8 combinaisons d'amorces. Les résultats obtenus ont permis de générer un total de 221 bandes dont 118 sont polymorphe (54,13 %) (Moslemi *et al.*, 2010). De même, cette technique a été utilisée pour étudier les relations génétiques de 21 cultivars de grenadier Iranien. Parmi 72 combinaisons d'amorces AFLP testées, 31 ont permis de générer un total de 503 bandes polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 38,99%. Les résultats de cette étude ont montré l'existence d'une variabilité inter-groupes et que le marqueur AFLP peut être un outil utile pour étudier la diversité génétique des géotypes de grenade (Sarkhosh *et al.*, 2011).

En Turquie, 19 géotypes du grenadier originaires de la vallée du Coruh ont été caractérisés par 4 couples d'amorces d'AFLP. Les résultats ont généré un total de 297 bandes, dont 213 sont polymorphes (73,0%). Le dendrogramme UPGMA a montré la présence de deux grands groupes et une variabilité des caractéristiques de fruits des géotypes au sein du même groupe. Les marqueurs AFLP se sont révélés hautement polymorphes par rapport aux caractéristiques du fruit (Ercisli *et al.*, 2011).

Au Maroc, cette méthode a été utilisée pour l'étude du polymorphisme génétique de plusieurs espèces fruitières, telle que la caractérisation des variétés

d'olivier (Zine el Aabidine *et al.*, 2010), de Clémentine (Chahidi *et al.*, 2008), de Mandarine (Handaji *et al.*, 2011), du Caroubier (Konaté *et al.*, 2007) et du Palmier dattier (Elhoumaizi *et al.*, 2006). Cependant, aucun travail n'a été abordé pour l'étude de la diversité génétique du matériel génétique local du grenadier.

7.3.3. ISSR: Séquences Inter Simples Répétées

Cette technique est basée essentiellement sur des réactions PCR qui donne des résultats hautement informatifs. (Saiki *et al.*, 1985). Elle permet d'étudier la variabilité génétique inter et intra spécifique surtout les régions non codantes du génome qui se caractérisent par l'abondance de séquences très répétées au sein desquelles les mutations sont assez fréquentes. Cette technique permet de révéler en masse du polymorphisme de type microsatellite. En fait, il s'agit d'une amplification par PCR entre deux microsatellites répétés (4 à 6 répétitions selon sa taille) et en position inversée qui génère un profil avec plusieurs bandes de tailles variables. Le polymorphisme dépend du nombre d'unité de répétition. Les marqueurs ISSR sont hautement reproductibles et fiables. Ils se sont également avérés fortement utiles dans la caractérisation des germoplasmes.

Les marqueurs ISSR ont été appliqués pour étudier la diversité génétique de 49 cultivars de grenadier Indien qui représentent huit populations naturelles issues de deux régions de l'Inde (Narzary *et al.*, 2009a). L'exploitation de 17 marqueurs a révélé un total de 268 bandes polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 87,01%. Les résultats obtenus ont révélé une variation génétique plus élevée intra-populations qu'inter-populations. Ce résultat indique que les marqueurs ISSR sont suffisamment informatifs et puissants pour évaluer la variabilité génétique du grenadier.

7.3.4. Microsatellites ou SSR: Séquences Simples Répétées

Les microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri, ou tétranucléotidiques qui couvrent tout le génome. Les plus courantes sont (A)_n, (AT)_n, (GA)_n, (GT)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, etc., la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines.

De tels motifs sont très abondants dans le génome des organismes eucaryotes (Berckman et Soller, 1990). Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des microsatellites en génétique réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé sous forme de nombre des unités de répétitions qui constituent la séquence microsatellites. En effet, les séquences microsatellites sont très sensibles aux événements de mutations, ce qui confère à ces marqueurs un polymorphisme extrêmement élevé. De plus, les crossing-over asymétriques peuvent être une des origines de ce fort polymorphisme des microsatellites (Kijas *et al.*, 1994). L'ADN génomique est amplifié à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques des régions flanquantes (Weber et May, 1989). Le polymorphisme concerne le nombre des unités de répétition qui constituent la séquence microsatellite (De Vienne *et al.*, 1998; Gupta et Varshney, 2000). Ces marqueurs se sont montrés très efficaces pour l'analyse de la diversité génétique et pour les études de l'évolution des espèces. De plus, leur analyse permet de suivre les flux géniques et d'identifier éventuellement les liens de parenté entre accessions. De ce fait, ces marqueurs sont très puissants pour l'identification des cultivars, l'évaluation de la diversité génétique, l'étude de la cartographie génétique ainsi que les analyses de la génétique des populations. Koochi - Dehkordi *et al.* (2007); Zarei *et al.* (2009) et Norouzi *et al.* (2012) ont montré que les marqueurs microsatellites présentent un excellent outil pour l'identification et l'évaluation des distances génétiques entre les cultivars.

En ce qui concerne le grenadier, ces marqueurs ont été utilisés dans plusieurs travaux pour l'étude de la diversité génétique des cultivars. Une étude a été menée pour produire des motifs enrichis en séquences microsatellites et identifier des séquences des microsatellites. Deux motifs génomiques enrichis en (AG) et (GT) répétés ont été développés pour la collection du grenadier de 'Yazd' en Iran, 15 paires d'amorces ont été conçues sur la base des séquences microsatellites. Cinq des 15 paires d'amorces amplifiées ont été polymorphes uniquement chez 29 cultivars (Norouzi *et al.*, 2012). Ces SSRs ont été utilisées pour analyser les relations génétiques et l'identification entre les cultivars de grenadier. Parvaresh *et al.* (2012) ont rapporté que les SSRs ne pouvaient pas différencier clairement entre 75 génotypes de grenadier d'origines d'Iran, du Japon, du Turkménistan, de Russie,

d'Italie et des Etats-Unis. Les résultats obtenus ont révélé un regroupement des cultivars de la Russie avec les génotypes Iraniens et un rapprochement de certains génotypes Américains avec des cultivars Turkménistan. Dans une autre étude de la diversité génétique du grenadier Iranien par les marqueurs SSR, Noormohammadi et al. (2012) ont montré que 2 sur 4 marqueurs SSR utilisés sont polymorphes et hautement transférable entre les cultivars.

En Tunisie, différentes études portant sur la diversité génétique du grenadier en utilisant des marqueurs SSR ont été réalisées (Hasnaoui *et al.*, 2010b). Ces auteurs ont désigné 11 amorces SSR spécifiques pour étudier le polymorphisme génétique de 27 cultivars. Ces locus ont généré 25 allèles amplifiés avec un nombre d'allèle par locus compris entre 1 et 4 et une hétérozygotie observée de 0.037 et exp 0.592. Dans une autre étude, Hasnaoui et al. (2012) ont utilisé quatre amorces SSR pour caractériser 33 génotypes du grenadier Tunisien. Les résultats obtenus ont révélé une très faible diversité génétique avec un nombre moyen d'allèle par locus de 2,83. Par ailleurs, l'exploration de 6 loci SSR a permis de générer 44 allèles et 51 génotypes (Jbir *et al.*, 2012). Les résultats obtenus montrent un regroupement des cultivars qui s'opère indépendamment des caractéristiques pomologiques et des origines géographiques, ainsi que des appellations des cultivars. Les variations des fréquences alléliques enregistrées ont montré, un haut niveau de polymorphisme moléculaire. Les estimations multilocus des paramètres de Nei ont suggéré que la variabilité totale est due à la variabilité intra-groupe. La comparaison des valeurs de l'hétérozygotie expérimentale avec celles observées a montré un déficit en hétérozygotes et une déviation significative quand à l'équilibre de Hardy-Weinberg. De même, L'analyse combinée de ces marqueurs SSR et des critères morphométriques a montré certaines similitudes de regroupement et une corrélation significative. Les génotypes multilocus SSR ont permis l'établissement d'une clé d'identification variétale sur la base de 8 loci avec un pouvoir de différenciation de 100%. La clé d'identification constituée est très utile dans la mise en œuvre d'un programme futur d'amélioration et de la mise en place d'une collection nationale de référence (Jbir *et al.*, 2012).

7.3.5. SPAR: Réaction d'amplification par des amorces uniques

Le principe de la méthode SPAR (Réaction d'amplification par des amorces uniques) est basé sur la technique PCR utilisant une seule amorce par réaction d'amplification. Il s'agit des techniques RAPD : «Random Amplified Polymorphism DNA», DAMD «Directed Amplification of Minisatellite DNA» et ISSR «Inter Simple Séquence Repeats» (Williams *et al.*, 1990; Heath *et al.*, 1993; Prevost et Wilkinson, 1999). La méthode SPAR présente l'avantage de générer un nombre élevé de marqueurs anonymes réputés insensibles à l'environnement et ne requière aucune connaissance préalable de la séquence d'ADN. Elle est aussi jugée fiable et rapide pour l'identification et la discrimination des cultivars.

Zhang *et al.* (2008) ont appliqué cette technique pour analyser 23 génotypes de grenadier en Chine. En utilisant sept paires d'amorces, environ 1380 bandes ont été amplifiées dont 662 sont polymorphes (48%).

De même, ces marqueurs ont été utilisés pour étudier la diversité génétique de 64 génotypes de grenadier Indien. En effet, les profils SPAR ont permis de générer 259 bandes qui ont révélé un niveau très élevé de polymorphisme génétique pour les grenadiers spontanés, sub-spontanés et cultivés en Inde (Ranade *et al.*, 2009).

Aussi, Cette méthode a été utilisée avec succès dans l'évaluation de la diversité génétique de 63 génotypes cultivés, sauvages, et ornementales de grenadier de cinq régions géographiques différentes de l'Iran (Soleimani *et al.*, 2012). L'exploitation de 13 couples amorces a révélé un total de 250 marqueurs dont 133 sont polymorphes (53%) et des différences significatives de la diversité génétique entre les régions ont été démontré.

7.3.6. Evaluation comparative des marqueurs d'ADN

L'analyse conjointe des différents marqueurs moléculaires constitue une approche technique pour la mise en évidence d'éventuelles corrélations génétiques entre les marqueurs moléculaires. Compte tenu du niveau élevé de la diversité morphologique des cultivars de grenadier Iranien, la comparaison de la variabilité

généétique de 24 cultivars de grenade a été évaluée en utilisant les marqueurs (RAPD) et (ISSR). Les amorces RAPD ont permis d'obtenir un total de 131 amplimères dont 29 ont été révélés polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme égal à 22,14%. Les amorces ISSR ont produit 173 fragments d'ADN dont 64 sont polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme de 37 %. La valeur moyenne du PIC est de 0,128 pour RAPD et 0,163 pour l'ISSR. Les résultats suggèrent que les marqueurs ISSR révèlent des bandes reproductibles et plus efficaces. Les valeurs de l'indice de similarité par amorces varient de 0,353 à 1,0 pour RAPD, de 0,291 à 0,930 pour ISSR et les valeurs moyennes de l'indice de similitude de 0,604 et 0,674 pour RAPD et ISSR respectivement. L'analyse (AMOVA) des données RAPD et ISSR ne montre aucune différence significative entre les régions géographiques. Divers travaux sur la variabilité et les relations génétiques du grenadier ont été réalisés en Inde à l'aide de 8 amorces (RAPD) et 4 amorces (DAMD) pour analyser la diversité génétique de 64 géotypes de grenadier (15 sauvages, 34 semi sauvages et 15 types cultivés). La matrice des distances génétiques estimées entre les 64 géotypes en se basant sur 259 marqueurs moléculaires montre que les distances génétiques varient de 0,12 à 0,97 avec une moyenne de 0,55. Les distances génétiques les plus élevées et les plus faibles étaient de 0,94 et 0,12, 0,97 et 0,24, 0,95 et 0,34, entre les géotypes de type cultivé, semi-sauvage et sauvages respectivement. Les résultats indiquent des niveaux élevés de diversité génétique entre les géotypes et significativement pour les géotypes sauvages (Ranade *et al.*, 2009). De même, Narzary *et al.* (2009b) décrivent l'utilisation de marqueurs RAPD et DAMD pour l'analyse de la diversité génétique du grenadier sauvage de l'Inde. L'étude a révélé que le polymorphisme obtenu avec la technique DAMD (97.08%) est plus important que celui révélé avec la méthode RAPD (93.72%), cela signifie que les marqueurs utilisés avec la technique DAMD étaient plus puissants que ceux obtenus avec les techniques RAPD et ISSR quant à l'évaluation de la diversité génétique du grenadier. La diversité génétique des populations naturelles du grenadier Indien a également été étudiée en se basant sur les marqueurs Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Quarante neuf géotypes représentant huit populations issues de deux régions de l'Himalaya occidental ont

été analysées en utilisant 17 amorces ISSR. Les résultats obtenus ont révélé un total de 268 bandes polymorphes. L'AMOVA a montré que 54% de la diversité génétique du grenadier sauvage est dû à la variabilité intra-population (Narzary *et al.*, 2009a).

Dans une autre étude, Narzary *et al.* (2010) ont étudié la diversité génétique et la relation génétique de 87 génotypes de grenadier Indien à l'aide des groupes d'amorces RAPD et DAMD ; ISSR et RAPD ; ISSR et DAMD. Les résultats ont révélé 92.35%, 98.525% et 76.50% de polymorphisme respectivement.

7.4. Conservation des ressources génétiques du grenadier

Si le grenadier a été considéré longtemps comme étant une espèce d'intérêt secondaire, aujourd'hui il révèle un intérêt sans précédent. Ceci est la conséquence notamment de la diversification des domaines d'utilisation de ses produits selon une vision intégrée basée sur la valorisation aussi bien de la partie comestible que des sous-produits de cette espèce. Ainsi, la grenade et son jus sont considérés actuellement parmi les aliments fonctionnels qui suscitent un intérêt croissant chez les consommateurs qui cherchent de plus en plus une alimentation nutritive riche en éléments bioactifs avec des effets bénéfiques sur la santé humaine. De ce fait, la mise en place d'une stratégie de mise en valeur de la diversité génétique de cette espèce devrait être l'une des principales priorités de toute politique de développement et mise à niveau du secteur de grenadier.

Plusieurs actions sont donc nécessaires pour répondre aux objectifs de cette stratégie. La prospection sur terrain des espèces cultivées et sauvages apparentées constitue la première étape (Bernhard et Boulbria, 1985). Cette étape s'étend sur plusieurs années et nécessite de définir les zones de cultures traditionnelles (Marchenay, 1987). Par la suite, il faut identifier et caractériser les cultivars échantillonnés. Cette caractérisation concerne surtout des caractères agronomiques et morphologiques (Melgarejo et Martinez, 1992, Mars et Marrakchi, 1999). Le but ultime est de définir différentes stratégies de sauvegarde de cette espèce. Plusieurs travaux ont été entamés dans différent pays méditerranéen (Espagne, Egypte, Grèce,

Maroc, Turquie, Tunisie...) et ont permis la mise en place de collections vivantes de grenadier. L'établissement des collections ex situ est le moyen de sauvegarde le plus utilisé. La plus grande collection a été entamée en 1934 dans la collection expérimentale des Ressources Phytogénétiques de Turkménistan avec 1117 accessions provenant de 26 pays (Levin, 1994 ; 1995a).

En Iran, la collection de Yasd regroupe 760 génotypes de grenadier et en Chine, 238 cultivars de grenadier sont collectionnés dans différentes provinces (Behzadi, 1998 ; Yuan *et al.*, 2007).

En Espagne, une collection a été établie en 1992 contenant 64 cultivars avec 4 répétitions maintenues dans des conditions homogènes (Martinez *et al.*, 2006).

Au Maroc, la première collection nationale des variétés de grenadier a été installée à la collection d'Ahlsouss près de la région de Béni Mellal par les français en 1950 pour les essais de comportement de variétés de grenadier. Cette collection regroupe 18 variétés dont 12 variétés introduites (USA, Espagne et Tunisie) qui sont connues mondialement dans leurs pays d'origine et 6 cultivars locaux intéressants issus des prospections notamment les cultivars Bzou et grenade rouge qui ont été sélectionnés dans la région de Bzou et Marrakech respectivement. Chaque variété est représentée par 9 arbres. Par la suite les mêmes variétés de cette collection ont été replantées en 1996 par l'Institut Nationale de Recherche Agronomique dans le domaine expérimental d'Ait Taoujtat à Meknès à raison de 3 arbres/ génotype et répartis d'une manière aléatoire.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de 41 cultivars de grenadier provenant de différentes régions du pays. 23 cultivars collectés à partir du champ dans les régions de Béni Mellal, Azilal et Settat. Ces cultivars sont issus des prospections réalisées dans les zones à forts potentiels en superficie du grenadier (Haddioui, 2012). De même, 18 cultivars entretenus dans la collection d'Ahlouss à Fkih Ben Salah ont été étudiés. La liste de ces cultivars, leurs appellations et leurs origines géographiques sont présentés dans le tableau 2 et la Figure 8.

Le prélèvement d'échantillons de feuilles pour l'extraction de l'ADN a été effectué à partir des pieds de grenadier directement dans les vergers d'agriculteurs particuliers dans les diverses sites prospectés ou dans la collection de grenadier de Fkih Ben Salah. Environ 10 g de jeunes feuilles fraîchement recueillies sur des arbres adultes bien entretenus, indemnes de maladies et d'attaques d'insectes, ont été prélevés d'une manière aléatoire. Ensuite, les feuilles ont été lavées à l'eau distillée et congelées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN génomiques.

L'étude de la diversité génétique du grenadier au Maroc n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude. Le présent travail constitue la première approche de la variabilité génétique du matériel génétique marocain à l'aide de deux types de marqueurs : AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats).

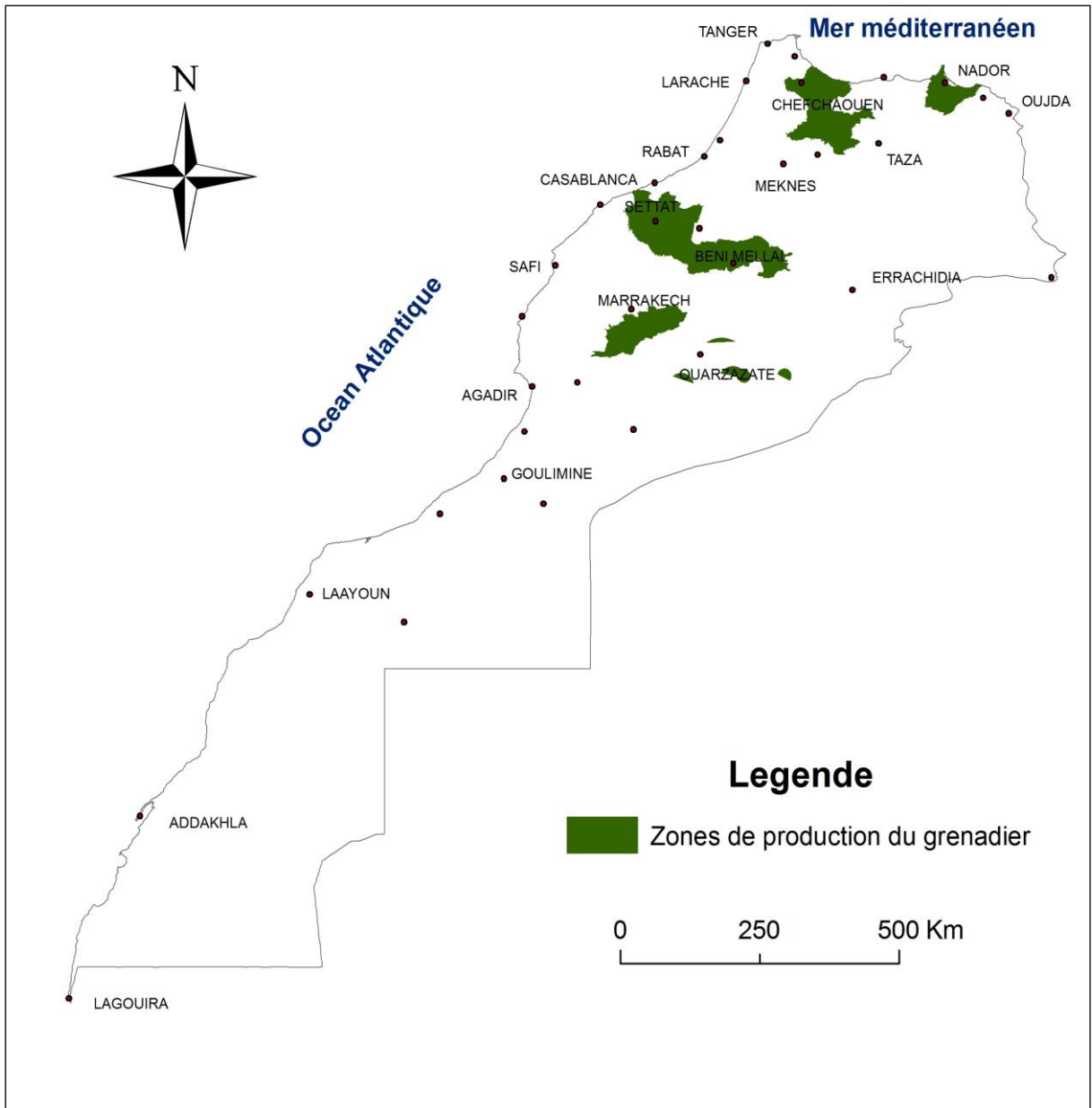


Figure 8: Carte de localisation des cultivars du grenadier au Maroc

Tableau 2 : Liste des différents cultivars de grenadier étudiés avec codes, origines géographiques et les types de marqueurs analysés (AFLP et ISSR).

Cultivar	Code	Origine géographique	Marqueurs analysés	
			AFLP	ISSR
Bouâdime	BD1	Bzou	X	X
Bouâdime	BD2	Demnat	X	
Bouchouk	BK	Tmassine-Settat		X
Bourassa	BR	Sour El Lâz-Demnat		X
Bouyâlem	BM2	Taghzirt Béni Mellal		X
BzekTair	BT	Tmassine-Settat		X
Bzou	BZ1	Sour El Lâz-Demnat		X
Bzou	BZ2	Collection Ahlsouss	X	X
Chelfi	CH	Collection Ahlsouss	X	X
Chioukhi	CK1	Collection Ahlsouss	X	
Djebali	DJ	Collection Ahlsouss	X	X
Djeibi	Dj1	Collection Ahlsouss	X	
Dwarf semi Evengreen	DE1	Collection Ahlsouss	X	
Gordo de Jativa	GJ2	Collection Ahlsouss	X	
Grenade jaune	GJ1	Collection Ahlsouss	X	
Grenade rouge	GR1	Ait Attab		X
Grenade rouge	GR2	Collection Ahlsouss	X	X
Grenade verte	GR3	Ait Attab		X
Hamde Bzou	HM1	Bzou	X	
Hamed blanc	HM2	Ait Oumghar-Demnat		X
Hamed rouge	HM3	Ait Oumghar-Demnat	X	X
Kharaji	KJ1	Bzou	X	X
Kharaji	KJ2	Ouled Abellah		X
Lkhadri	LK	Tmassine-Settat		X
Merssi	MS1	Demnat		X
Merssi	MS2	Tmassine-Settat		X
Meski	MSK	Ouled Abellah		X
Mollar Offin Hueso	MH1	Collection Ahlsouss	X	
Negro Monstruoso	NM1	Collection Ahlsouss	X	
Ounek Hmame	OH1	Collection Ahlsouss	X	
OunkLahmam	OH2	Ouled Abellah		X
Papenschell	PP1	Collection Ahlsouss	X	
Ruby	RB1	Collection Ahlsouss	X	
Sefri	SF1	Collection Ahlsouss	X	X
Sefri	SF2	Ouled Abellah		X
Sefri	SF4	Tmassine-Settat		X
Sefri	SF2	Demnat	X	
Wanderful	WF1	Collection Ahlsouss	X	
Zariâ	ZR	Tmassine-Settat		X
Zehri d'automne	ZH1	Collection Ahlsouss	X	X
Zehri Précoce	ZH2	Collection Ahlsouss	X	X

2. Oligonucléotides

Selon la méthode d'analyse de la diversité moléculaire (AFLP ou ISSR), leur amplification repose sur l'utilisation des amorces spécifiques.

2.1. Oligonucléotides pour les marqueurs AFLP

Les marqueurs AFLP ont été choisis pour étudier la diversité entre les cultivars de grenadier marocain. La technique d'AFLP développée par Vos et al. (1995) a été utilisée comme plateforme lors de notre étude. Au cours des différentes étapes de pré-amplification et des amplifications sélectives, des oligonucléotides fournis par le kit AFLP Applied Biosystem ont été utilisés. Les séquences des amorces de pré-amplification sont complémentaires aux séquences des adaptateurs avec un nucléotide ancré. Diverses combinaisons d'oligonucléotides avec trois nucléotides ancrés sont utilisées pour les amplifications sélectives (Tableau 3).

Tableau 3 : Séquences des adaptateurs et des oligonucléotides pour les pré-amplifications et les amplifications sélectives.

Enzymes	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
	Séquences nucléotidiques	
Site de restriction	5'GAATTC3' 3'CTTAAG5'	5'TTAA3' 3'AATT5'
Adaptateur	5'CTCGTAGACTGCGTACG3' 3'ATCTGACGCATGCTTAA5'	5'GACGATGAGGTCCTGAG3' 3'TACTCCAGGACTCAT5'
Amorces de pré-amplification	5'GACTGCGTACGAATTCA3'	5'GATGAGTCCTGAGTAAC3'
Amorces d'Amplification sélective	5'GACTGCGTACCAATT CAGC 3' 5'GACTGCGTACCAATT CAAC 3' 5'GACTGCGTACCAATT CACA 3' 5'GACTGCGTACCAATT CACC 3' 5'GACTGCGTACCAATT CACT 3' 5'GACTGCGTACCAATT CACT 3'	5'GATGAGTCCTGAGTAAC CAA 3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC CAA 3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC CAG 3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC ACTA 3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC ACT 3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC ACTC 3'

Tableau 4 : Code, séquence et température d'hybridation (Tm) des amorces utilisées dans les réactions PCR-ISSR.

Code de l'amorce	Séquence (5'-3')	Tm (°)
809	(AG) ₈ G	52
810	(GA) ₈ T	52
812	(GA) ₈ A	50
825	(AC) ₈ T	50
827	(AC) ₈ G	50
834	(AG) ₈ YT	50
836	(AG) ₈ YA	50
840	(GA) ₈ YT	50
841	(GA) ₈ YC	50

2.2. Oligonucléotides pour les marqueurs ISSR

La technique ISSR a été développée en utilisant des amorces des oligonucléotides universels. Il s'agit des amorces permettant l'amplification des régions de l'ADN entre les microsatellites. Les bandes amplifiées correspondent à des marqueurs ISSR (Inter Simple Séquence Repeats). Les marqueurs sont qualifiés de ce fait d'anonymes et de type dominant. Le tableau 4 résume les séquences nucléotidiques des amorces testées. Il s'agit de 9 amorces ISSR à choisir pour détecter le polymorphisme génétique entre les 27 cultivars de grenadier étudiés. Ces amorces sont ancrées d'un ou deux nucléotides du côté 3' et est représentées par un motif dinucléotidique répété 8 fois.

3. Méthodes

L'étude du polymorphisme moléculaire a nécessité au préalable l'extraction et la purification des ADN cellulaires totaux à partir de jeunes feuilles des différents cultivars utilisés.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi deux types de marqueurs moléculaires :

Les marqueurs AFLP ont été choisis dans notre étude pour mieux apprécier le polymorphisme moléculaire, identifier et élucider des relations génétiques entre les cultivars étudiés du grenadier. La mise à profit des marqueurs AFLP offre beaucoup d'avantages et une bonne alternative pour augmenter le nombre de marqueurs identifiés chez l'espèce *Punica granatum* L. Le protocole AFLP de base a été adopté après une série de modifications.

Les marqueurs ISSR ont constitué des marqueurs de choix pour les avantages qu'ils présentent (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Ces marqueurs sont largement utilisés chez de nombreuses espèces et paraissent très efficaces en termes de mise en évidence du polymorphisme de l'ADN. Nous avons donc opté pour cette technique (ISSR) en effectuant quelques mises au point pour assurer une bonne reproductibilité des résultats.

3.1. Protocole d'extraction pour la technique AFLP

L'extraction de l'ADN est réalisée au sein du Laboratoire du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST- Rabat). En effet, l'ADN génomique total a été extrait de jeunes feuilles en utilisant le détergent CTAB (Bromure d'Ammonium Cétylique-Triméthyl) selon le protocole d'extraction de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1984) auquel certaines modifications ont été apportées. Les jeunes feuilles (3g) ont été broyées en une fine poudre dans de l'azote liquide et mélangées avec 500µl de tampon d'extraction (2% CTAB; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, pH 8.0, 1.3M de NaCl; 4% pyrrolidone polyvinylique; 0.2% β-mercaptoéthanol). Le tampon d'extraction a été incubé à 65°C pendant 20 min, puis mélangé avec 500 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Après une centrifugation à (12.000 tr/min pendant 15 min), le surnageant est

récupéré et maintenu sur glace. L'acétate de potassium (KoAc) 200µl et un volume de l'isopropanol froid 500µl (-20C°), sont ajoutés au surnageant. L'ensemble est soigneusement mélangé et refroidi pendant 15 min. l'ADN a été sédimenté par centrifugation à 12000 tr/min pendant 15 min. Le culot récupéré est lavé 2 fois avec (100µl) de l'éthanol à 70% pré refroidi. Le culot est ensuite bien séché et suspendu dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Afin de tester l'aspect qualitatif et quantitatif de l'ADN obtenu, nous avons mesuré la densité optique (DO) des échantillons au spectrophotomètre (Gene-Quant, Pharmacia) à 260 nm (une unité de densité optique correspond à 50µg/ml d'ADN). Le rapport DO260/DO280 donne une idée sur la pureté de l'ADN. L'intégrité de l'ADN a été testée par électrophorèse analytique sur gel d'agarose à 0,8% selon la méthode décrite par Sambrook et al. (1989).

Après avoir été testé, l'ADN est conservé à -20°C jusqu'à leur utilisation.

3.2. Protocole d'extraction pour la technique ISSR

L'extraction de l'ADN génomique a été effectuée au Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie de la Faculté des Sciences de Tunis. En effet, des jeunes folioles congelées et non lyophilisées ont été utilisées pour l'extraction de l'ADN total en utilisant un Kit, le DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen S.A, Courtaboeuf, France, 2006).

L'utilisation des ADNs ainsi extraits nécessite au préalable une étape de purification pour éliminer les contaminations par l'ARN qui entrave le déroulement convenable de la PCR. Pour cela, 1µl d'ARNase (7mg/ml) a été additionné à la solution d'ADN, le tout a été centrifugé pendant quelques minutes et incubé dans un bain-marie à +55°C pendant 30 minutes.

La concentration et la qualité des ADNs ainsi extraits et purifiés ont été testées par électrophorèse analytique sur gel d'agarose 0.8% suivant la méthode visuelle de Sambrook et al. (1989) qui est basée sur la comparaison de l'intensité

des bandes de l'ADN extrait aux différentes concentrations d'ADN standard du phage Lambda (50, 100, 200 et 300 ng/ μ l).

Le gel est préparé dans un tampon TBE 0.5X (Tris-Borate 8mM, acide borique 8.9mM, EDTA 8mM) et la migration de l'ADN total a été faite dans une cuve d'électrophorèse, pendant 1 heure à 90V. Les bandes de l'ADN ont été visualisées après coloration au Bromure d'Ethidium (BET), agent intercalant, et exposition à une lumière ultraviolette (UV).

3.3 Méthode d'exploration de la diversité génétique

L'analyse du polymorphisme moléculaire a été abordée en mettant à profit l'apport de différentes techniques en l'occurrence la technique AFLP et ISSR.

3.3.1 Technique d'amplification AFLP

Nous avons utilisé au total 6 combinaisons d'oligonucléotides fournies par les kits "AFLP Applied Biosystem" (Invitrogen). Ces combinaisons ont été utilisées pour l'analyse du polymorphisme génétique des cultivars Marocains de grenadiers sur la base des marqueurs moléculaires AFLP (Tableau 3).

La technique AFLP est principalement basée sur la digestion totale d'ADN par deux enzymes, une enzyme (MseI) et (EcoRI), puis la ligation des bouts cohésifs avec un adaptateur de séquences connues et spécifiques à chaque enzyme (Vos *et al.*, 1995) (Figure 9).

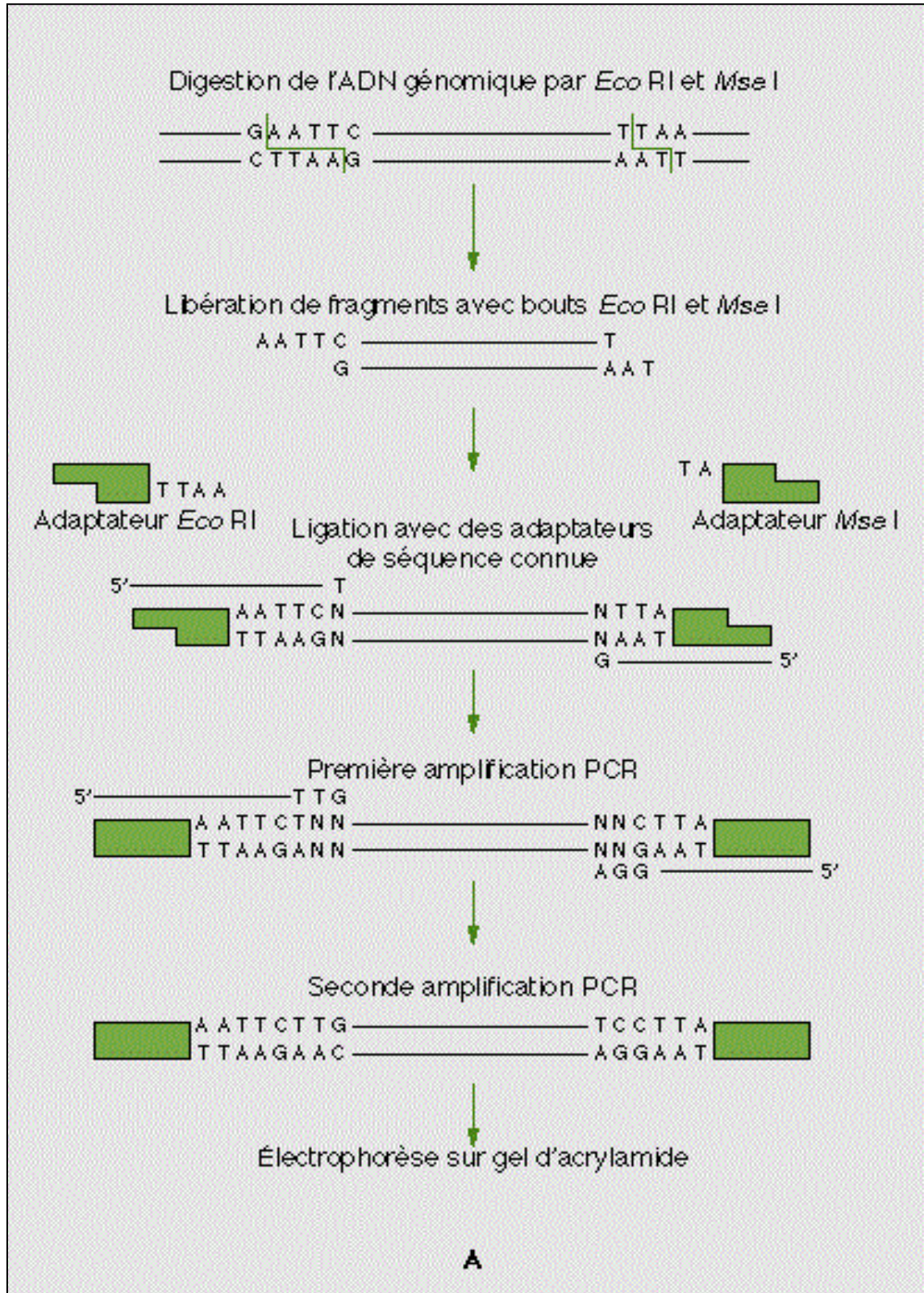


Figure 9: Schéma illustrant les différentes étapes de la technique AFLP (Zabeau et Vos. 1993).

Le protocole d'amplification AFLP consiste en 4 étapes principales :

- Une étape de digestion de l'ADN génomique des cultivars étudiés par deux endonucléases de restriction. Le kit fournit deux enzymes de restriction dont une à site de restriction rare (*EcoRI*) G-AATTC alors que la deuxième est à site de restriction fréquent (*MseI*) T-TAA. Lors de cette étape nous avons digéré environ 500ng d'ADN cellulaire total avec 2µL (1,25 U/µL) du mélange des enzymes *EcoRI* et *MseI*. La digestion est optimisée dans un volume de 5 µL de tampon de digestion (5mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂; 50 mM NaCl et 1 mM DTT) à (pH 7.5) (Invitrogen). Le mélange réactionnel est incubé dans un bain à sec à 37°C pendant 4 heures. Les endonucléases de restriction sont inactivées par incubation à + 80°C pendant 15 min. une étape de vérification de la digestion complète de l'ADN est obligatoire. Ainsi, le résultat des digestions est examiné par électrophorèse analytique sur un gel d'agarose à 0,8 %. La présence d'une traînée vague en l'absence de bande de haut poids moléculaire traduit une digestion complète de l'ADN cellulaire total.

- La deuxième étape consiste en une ligation des fragments d'ADN digérés aux adaptateurs complémentaires aux sites *EcoRI* et *MseI*, fournis par le kit, ils sont formés par une vingtaine de bases de part et d'autre des fragments cohésifs résultant de la double digestion (Tableau 3). Les deux adaptateurs présentent les séquences suivantes :

<i>EcoRI</i>	5'CTCGTAGACTGCGTACG3'
	3'ATCTGACGCATGCTTAA5'
<i>MseI</i> :	5'GACGATGAGGTCCTGAG3'
	3'TACTCCAGGACTCAT5'

La ligation des produits issus de la double digestion est réalisée dans un volume réactionnel de 45 µL de mélange réactionnel contenant :

- 20 µL du mélange réactionnel résultant de la double digestion.
- 24 µL du mélange contenant les adaptateurs *EcoRI* et *MseI*.
- 1 µL de T₄ DNA ligase (1U/µL).

La ligation est optimisée à 37°C pendant 3 heures. Cette étape peut aussi être vérifiée par une visualisation des produits de la ligation après électrophorèse sur gel d'agarose. Le mélange réactionnel obtenu est par la suite dilué au 1/10 à l'aide du tampon TE pour les étapes de pré-amplification et d'amplifications sélectives.

- La troisième étape du protocole d'AFLP consiste en une pré-amplification ou PCR non sélective. Elle est basée sur l'utilisation de deux amorces des oligonucléotides complémentaires à la séquence des adaptateurs prolongée en 3' par une base arbitraire, l'amorce EcoRI dont la séquence est 5'GACTGCGTACGAATTCA3' et l'amorce MseI dont la séquence est 5'GATGAGTCCTGAGTAAC3'. L'amplification est réalisée dans 15µl de mélange réactionnel contenant 4 µL du produit de la ligation dilué au 20^{ème}. La réaction PCR d'amplification est réalisée dans un volume de 20µL.

- 4 µL d'ADN digéré ligué et dilué
- 1 µL d'oligonucléotides de pré-amplification
- 5 µL de tampon de Taq DNA polymérase (10 X)
- 1 µL de Taq DNA polymérase (5U/µL).
- qsq à 20 µL H₂O.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur du type Applied Biosystems selon le programme suivant :

- Une dénaturation pendant 20 s à 94 °C,
 - Une hybridation pendant 30s à 56 °C,
 - Une élongation pendant 2 min à 72 °C.
- } 20 cycles

Les endonucléases de restriction sont inactivées par incubation à 60°C pendant 30min. Après révélation d'un échantillon sur gel d'agarose à 1%, le produit de la pré-amplification est dilué 10 fois dans du tampon TE 0.1 buffer (20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0).

- La quatrième étape d'AFLP consiste en une amplification sélective à partir des produits pré-amplifiés au moyen d'amorces ancrées à leurs extrémités 3'-OH par 3 nucléotides sélectifs. Six combinaisons d'amorces ont été testées (Tableau 2).

La PCR est réalisée dans 20µl de mélange réactionnel contenant 3 µL d'ADN pré-amplifié dilué, 1µL de chaque amorce EcoRI_{NNN} et MseI_{NNN} et 15 µL du mélange contenant 20 µL de tampon Taq DNA polymérase (10X), 1 µL de Taq DNA polymérase (5U/µL) (Invitrogen), 12 µL MgCl₂ et 67 µL H₂O.

La PCR est ensuite réalisée selon le programme suivant : 10 cycles d'une étape de dénaturation de 20s à 94°C, une étape d'hybridation de 30 s à 66°C (-1°C/cycle) et une étape d'élongation de 2min à 72°C. Ceci suivi par 20 cycles avec une étape de dénaturation de 20 s à 94°C, une étape d'hybridation de 30 s à 56°C et une étape d'élongation de 2 mn à 72°C.

Ensuite, 1µl du produit d'amplification sélective a été dilué dans 25 µl de mélange de tampon de charge d'AFLP (9 V de formamide, GeneScan-500 de taille standard ROX, Applied Biosystems). Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 min. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse capillaire dans un analyseur génétique ABI 3130XL (Applied Biosystems).

3.3.2 Technique d'amplification ISSR

Les marqueurs ISSR ont été choisis dans un premier temps afin d'étudier la diversité génétique des cultivars de grenadier. Nous avons commencé par optimiser le protocole d'amplification pour avoir un résultat interprétable et reproductible. Nous avons ainsi testé différentes concentrations des composants du mélange réactionnel de la PCR ainsi que du programme d'amplification.

Les techniques ISSR consistent à amplifier les régions génomiques séparant les motifs répétés appelés microsatellites. (Saiki *et al.*, 1985). Pour cela une amorce est utilisée, constituée de motifs microsatellite (4 à 6 répétition selon sa taille) compétée par des oligonucléotides dégénérés en 3' ou en 5' (Figure 10). De

ce fait, elle peut s'hybrider avec les microsatellites cibles et amplifier les régions entre ces derniers.

Les amorces ISSR sont de trois types :

- ✓ Amorces non ancrées, constituées seulement d'un motif microsatellites.
- ✓ Amorces ancrées en 5', constituées d'un motif microsatellite auquel s'ajoute un ou deux nucléotides au niveau de l'extrémité 5'P.
- ✓ Amorces ancrées en 3', constituées d'un motif microsatellite auquel s'ajoute un ou deux nucléotides au niveau de l'extrémité 3' OH libre.

Elle permet alors une amplification aléatoire des régions du génome cadrées par les séquences microsatellites et permet de générer des amplimères de taille variable.

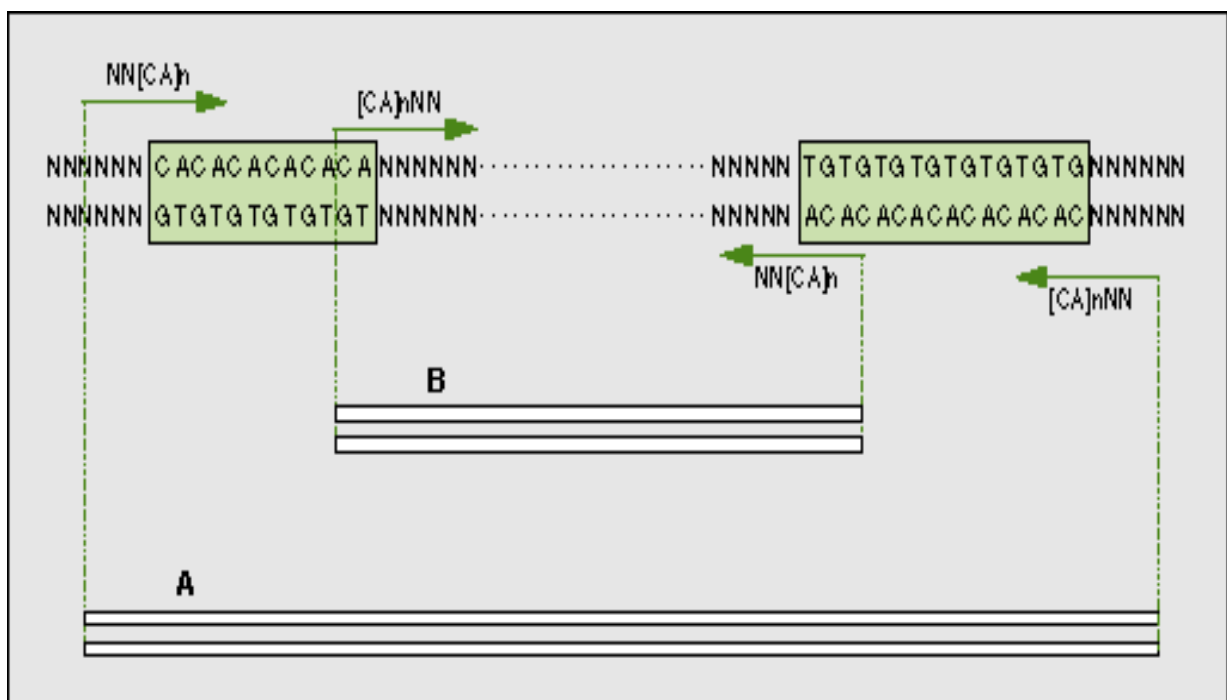


Figure 10. Principe de l'ISSR. Si les bases arbitraires de l'amorces sont du côté 5' du microsatellite, on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du côté 3', c'est le produit B est obtenu.

Après une série d'optimisation du protocole d'amplification par ISSR nous avons opté pour le mélange réactionnel et le programme d'amplification qui nous a permis d'avoir le meilleur profil d'amplification. A la lumière de cette

expérimentation, les conditions optimales suivantes ont été retenues pour 35 cycles d'amplification :

Chaque réaction est effectuée dans un volume total de 25 µl contenant : 1µl d'ADN (environ 25ng), 2.0 mM MgCl₂; 200 µM de dNTP; 0,8 µM d'amorces; 2.5µM de tampon de Taq DNA polymérase ((10x: + KCL-Mgcl₂); 0,5µl de Taq DNA polymérase. Le volume réactionnel a été ajusté à 25µl par de l'eau distillée stérile.

L'amplification a été conduite dans un Termocycleur (Perkin (QBiogene, France)) en suivant les étapes ci-dessous :

- Phase de dénaturation : 5min à 94°C
- 35 cycles dont chacun correspond à trois phases :
 - ✓ Dénaturation : 1 min à 94°C
 - ✓ Hybridation : 1 min à Tm°C
 - ✓ Elongation : 2 min à 72°C
- Elongation finale : 7min à 72°C

Pour minimiser les risques de contamination et de variation de la réaction d'amplification, un mélange réactionnel majeur a été utilisé pour toutes les réactions. En plus, pour chaque réaction PCR un contrôle négatif est toujours utilisé ; il s'agit du mélange réactionnel contenant tous les produits PCR excepté d'ADN matrice.

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% préparé dans un tampon TBE (Tris-Borate 8mM, acide borique 8.9mM, EDTA 8mM) additionné de BET (Bromure d'Ethidium) à raison de 0.5% g/ml.

Pour chaque PCR, la totalité du produit d'amplification, 25µl a été mélangée avec une goutte du Bleu de bromophénol puis déposée dans un puits du gel d'agarose. La migration a été faite sous 90V pendant 2h30min. Les amplimères sont visualisés sous UV à 254nm, puis photographiés à l'aide du système Gel Doc

équipé d'une caméra (Bio-Rad, USA). La taille des fragments a été estimée à l'aide d'un marqueur de taille (Ladder DNA1Kb, Invitrogen) soumis à la migration en même temps que les produits d'amplification dans un puit parallèle réservé à cet effet.

4. Méthodes d'analyse statistiques des données

Les amplimères générés par les différentes méthodes d'amplification (AFLP et ISSR) ont été considérés comme étant des marqueurs moléculaires. La valeur 1 est attributive en cas de présence d'un amplimère polymorphe à un niveau donné du gel. Son absence est notée 0. Les méthodes et les logiciels de traitement statistique des données varient selon le type de marqueur étudié (AFLP ou ISSR).

4.1. Logiciels utilisés

Dans différentes étapes de ce travail, nous avons utilisé des programmes informatiques appropriés:

- **PHYLIP** (Phylogeny Inference Package, version 3-69) (FELSENSTEIN, 1995).
- **GENDIST**: appartenant à l'ensemble des programmes PHYLIP, version 3-5726, il permet le calcul des distances génétiques.
- **NEIGHBOR**: appartenant à l'ensemble des programmes au PHYLIP, il permet de générer l'arbre phylogénique, qui est par la suite, construit par le logiciel **TREEVIEW**, Win32, version 1.5.2, (Page, 1996).
- **XLSTAT** software (XLSTAT 2009.1), ce logiciel a été utilisé pour la réalisation d'une analyse multivariée ainsi que le test Mantel.
- **POPGENE VERSION 1.31**, ce logiciel a été utilisé pour construire les liens génétiques entre les cultivars étudiés au moyen des marqueurs AFLP et les marqueurs polymorphes ISSR et pour estimer les flux géniques entre les groupes de grenadier.

4.2. Analyse de la diversité génétique

L'amplification du génome par la technique AFLP et ISSR génère des marqueurs dominants. Dans cette étude, seules les bandes polymorphes et reproductibles ont été prises en considération au cours des analyses. Les résultats ont été transformés en une matrice binaire qui a été exploitée pour effectuer les différentes analyses statistiques. Plusieurs paramètres sont estimés pour l'analyse de la diversité génétique et l'identification des cultivars étudiés.

- **Pourcentage de bandes polymorphes (PBP)**

Pour chaque amorce, le pourcentage de bande polymorphe (PBP) a été calculé. Le PBP est le nombre de bandes polymorphes par rapport au nombre total de bandes révélées.

- **Pouvoir résolutif (Rp)**

Le pouvoir résolutif a été calculé en utilisant la formule suivante (Gilbert *et al.*, 1999) :

$$R_p = \sum I_b, \text{ avec } I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$
 Avec p = La fréquence des accessions possédant la bande I.

Le R_p est un paramètre connu comme étant un critère permettant de déterminer l'efficacité des amorces utilisées pour différencier entre les accessions. Gilbert *et al.*, 1999),

- **Contenu informationnel du polymorphisme (PIC)**

Le pouvoir discriminant des marqueurs a été étudié en estimant la valeur du PIC (Polymorphism Information Content) décrit par Bostein *et al.* (1980) et modifié par Anderson *et al.* (1993):

$$PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$$

P_{ij} étant la fréquence du marqueur révélée par l'amorce j.

5. Paramètres de différenciation et d'analyse de la structuration génétique

Nous avons soumis la matrice binaire des marqueurs AFLP et les marqueurs ISSR au logiciel POPGENE (version 1.32) afin de calculer les paramètres de différenciation génétique (G_{st}), le flux de gènes (N_m) et l'indice de Shannon H' (Lewontin, 1972 ; McDermott and McDonald, 1993). Ces paramètres statistiques permettent d'analyser la structuration génétique au sein de notre matériel génétique local de grenadier et les relations génétiques entre des groupes géographiquement distingués.

Le coefficient de différenciation génétique (G_{st}) fût proposé par Nei (Nei 1972), permet d'estimer la proportion de diversité génétique totale qui est présente dans les populations. Il est calculé par la formule suivante :

$$G_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t} = 1 - \left(\frac{H_s}{H_t}\right)$$

où H_s est la moyenne des diversités génétiques intra-populations et H_t représente la diversité génétique sur l'ensemble des populations ou diversité totale.

Le flux de gènes (N_m) est le mouvement des gènes entre différents pools génétiques, ayant comme résultat final l'homogénéisation des allèles entre des populations (Slatkin, 1985). Afin de quantifier le flux génique à des loci indépendants, on évalue généralement le flux de gènes (N_m , où N représente la taille de la population totale et m la fraction de migrants par génération). Ce paramètre est estimé selon la formule suivante :

$$N_m = \frac{0,5(1 - G_{st})}{G_{st}}$$

L'indice de Shannon ($H' = H'$) est un indice permettant de mesurer la biodiversité

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

6. Estimation des distances génétiques et établissement des relations géniques

Pour estimer les distances génétiques entre les cultivars, la matrice des données a été soumise au Logiciel Genedist du programme PHYLIP (Version 3-5726) (Felsenstein, 1995). Ces distances génétiques sont calculées selon la formule de NEI et LI (1979). La matrice ainsi obtenue a été par la suite utilisée par le programme Neighbor (Logiciel PHYLIP) qui permet de générer des dendrogrammes basés sur la méthode Unweighted Pair Group Method with the Arithmetic Average (UPGMA) (Sneath et Sokal, 1973). Afin de construire les dendrogrammes illustrant les relations entre les différents cultivars, nous avons utilisé le programme TreeView (Page, 1996).

7. Analyse multivariée: Analyse en Composantes Principales (ACP)

Dans le but de comprendre la structure du polymorphisme moléculaire mis en évidence par les marqueurs AFLP et ISSR, nous avons soumis les données ainsi obtenues à une analyse en composantes principales (ACP) (Lebart *et al.*, 1977). En effet, l'ACP définit de nouvelles variables synthétiques ou axes à partir des marqueurs moléculaires (variables de départ). Ces axes constituent les composantes principales qui sont donc déterminées par un ensemble de valeurs propres traduisant la proportion de l'information portée par les variables de départ. L'ACP permet ainsi d'obtenir les marqueurs qui contribuent le mieux à la description de la structuration de la variabilité et d'obtenir une représentation graphique de la projection des cultivars selon leurs ressemblances dans le plan des axes de l'ACP. Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2009.

CHAPITRE III : RESULTATS

Partie I : Analyse de la diversité génétique des grenadiers par l'utilisation des marqueurs AFLP

Au cours de cette partie, nous avons tenté de mettre à profit les possibilités offertes par les marqueurs AFLP afin d'analyser la diversité génétique du grenadier au Maroc. Le choix des marqueurs AFLP a été dicté en tenant compte des considérations suivantes : ces marqueurs révèlent un haut niveau de polymorphisme et permettent d'étudier un grand nombre de loci indépendants et un grand nombre de marqueurs hautement reproductibles considérés comme des loci spécifiques au sein d'une espèce donnée (Roupe Van Der Voort *et al.*, 1997, Waugh *et al.*, 1997).

Nous avons étudié 24 cultivars à l'aide de 6 combinaisons d'amorces AFLP (Tableau 5). Ces cultivars se répartissent en deux groupes:

- 18 cultivars entretenus dans la collection d'Ahlsouss, située dans la plaine de Tadla à 438m d'altitude. Le climat est très continental. Cette région est caractérisée par des précipitations qui varient entre 300 et 750 mm et une pluviométrie moyenne annuelle de 360mm. La température moyenne est de 18°C avec un minimum de -3.5°C et un maximum qui peut aller jusqu'à plus de 40°C.
- 6 cultivars échantillonnés dans des différents sites dans la région d'Azilal. Une région géographiquement montagneuse et caractérisée par un climat de type semi-aride au Nord et sub-humide au Sud. La pluviométrie moyenne annuelle est de 400mm et la température moyenne varie de -10°C à 35°C.

Tableau 5: Dénominations, codes et origines géographiques des cultivars de grenadier étudiés par la technique AFLP.

N°	Cultivar	Code	Origine géographique	Latitude Nord	Longitude Ouest	Altitude (m)	Groupe
1	Mollar Offin Hueso	MH1	Collection Ahlouss	32°28'	6°35'	438	I
2	Dwarf semi Evengreen	DE1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
3	Negro Monstruoso	NM1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
4	Djeibi	DJ1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
5	Chelfi	CH1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
6	Zehri d'automne	ZH1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
7	Grenade rouge	GR1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
8	Bzou	BZ1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
9	Sefri	SF1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
10	Gordo de Jativa	GJ2	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
11	Wanderful	WF1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
12	Papenschell	PP1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
13	Djebali	DB1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
14	Zehri précoce	ZH2	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
15	Ruby	RB1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
16	Grenade jaune	GJ1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
17	Chioukhi	CK1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
18	Ounek Hmame	OH1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
19	Kharaji Bzou	KB	Azilal	32°06'	7°02'	378	II
20	Bouâdim Bzou	BM1	Azilal	32°06'	7°02'	378	
21	Hamde Bzou	HM1	Azilal	32°06'	7°02'	378	
22	Sefri	SF2	Azilal	31°49'	7°01'	668	
23	Hamde Demnate	HM2	Azilal	31°43'	6°59'	956	
24	Bouâdim Demante	BM2	Azilal	31°43'	6°59'	956	

Après une mise au point de la technique AFLP, nous avons obtenus des profils électrophorétiques qui présentent des pics de haut poids moléculaire (Figure 11). De même, l'absence d'une traînée et de fluorescences correspondant aux ARNs indique clairement que ces préparations ne présentent aucune contamination par des protéines et des produits de dégradation des acides nucléiques. En outre, les mesures spectrophotométriques confirment ces résultats comme en témoignent les rapports de densités optiques 260/280 dont les valeurs sont comprises entre 1.8 et 2,05.

1. Analyse de la diversité génétique par la technique AFLP

1.1. Pourcentage de bandes polymorphes (PBP)

L'analyse des données de fluorescence d'électrophorèse capillaire à l'aide du logiciel Peak Scanner a permis l'obtention de nombreux pics AFLP. Chaque pic correspond à un marqueur dont la taille (axe X en paires de bases) et la force du signal (axe Y), (Figure 11). Les pics à moins de 100 unités de hauteur sont généralement considérés comme un signal trop faible pour être explorés. Ainsi, Les produits PCR amplifiés par les 6 combinaisons d'amorces ont permis de générer un total de 519 bandes dont 368 sont polymorphes (Tableau 6). Le nombre de bandes détectées par couple d'amorces varie de 45 pour le couple E_{ACA}/M_{CAG} à 111 pour le couple E_{ACT}/M_{CAT} , avec une moyenne de 86.5 fragments par couple d'amorces. Le pourcentage des bandes polymorphes (PBP) varie de 57% pour le couple E_{AAC}/M_{CAA} à 85% pour le couple E_{AGC}/M_{CAA} avec une moyenne de 71% par combinaison d'amorces. Ce résultat montre que le niveau de polymorphisme détecté est très élevé.

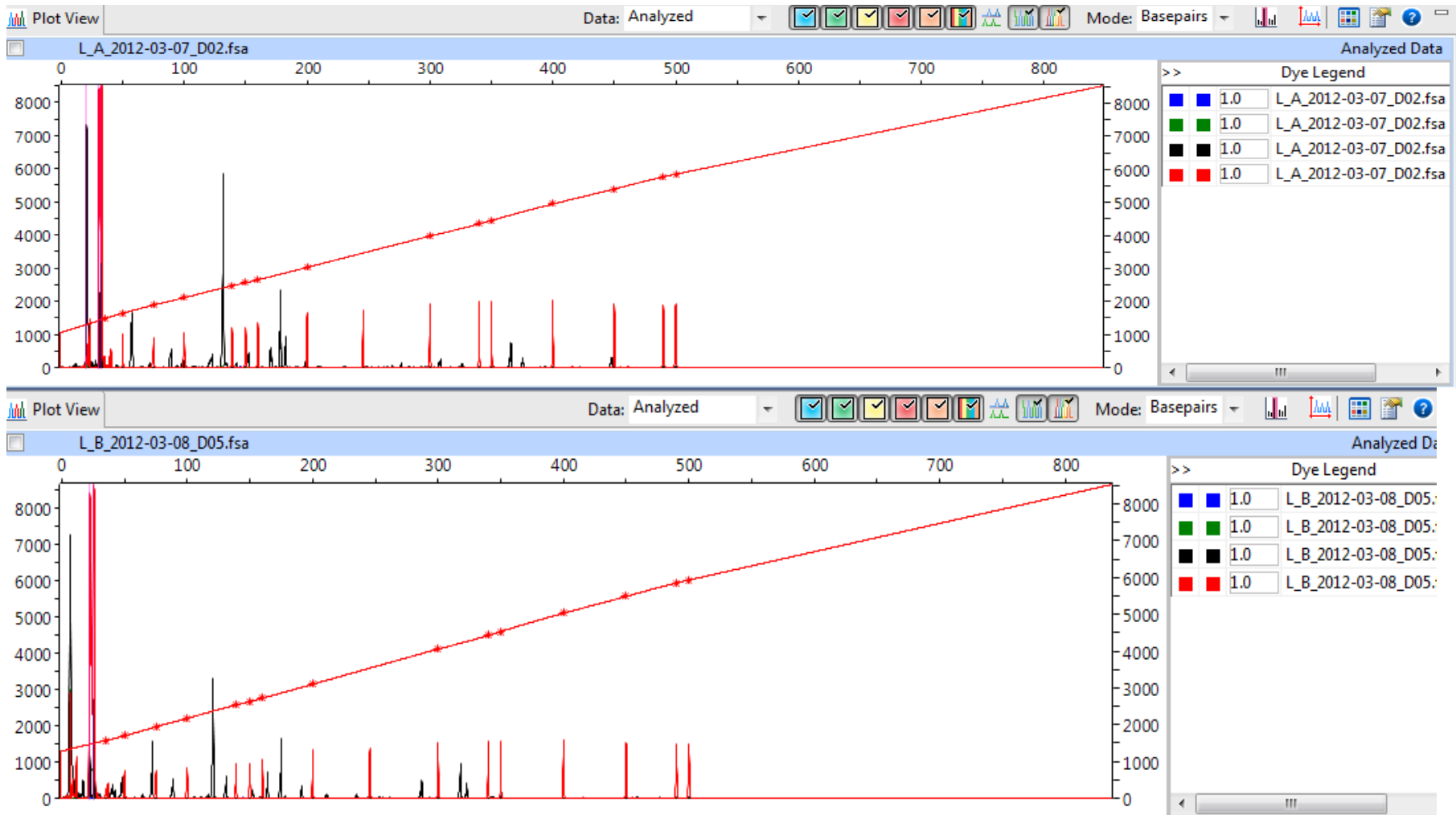


Figure 11 : Exemple des profils d'AFLP obtenus par l'amorce E_{AGC}/M_{CAA} .

Tableau 6: Bandes AFLP révélées par les six couples d'amorces chez 24 cultivars de grenadier étudiés.

EcoR I/Mse I	Nombre des bandes amplifiées		PBP	Rp	PIC
	Total	Polymorphes			
E _{AGC} /M _{CAA}	79	67	85	26.13	0.94
E _{AAC} /M _{CAA}	104	59	57	25.33	0.96
E _{ACA} /M _{CAG}	45	30	67	13.16	0.95
E _{ACC} /M _{CTA}	86	60	70	27.16	0.96
E _{ACT} /M _{CAT}	111	79	71	28.75	0.95
E _{AAG} /M _{CTT}	94	73	78	28.50	0.94
Total	519	368		149.03	5.7
Moyenne	86.5	61	71	24.84	0.95

PBP: pourcentage de bandes polymorphes; **Rp :** Pouvoir résolutif et **PIC :** Contenu Informatif du polymorphisme.

1.2. Pouvoir résolutif (Rp)

Ce paramètre permet de déterminer la capacité de l'amorce à différencier les cultivars de grenadier. L'estimation de la valeur du Rp varie de 13,16 pour E_{ACA}/M_{CAG} à 28,75 pour E_{ACT}/M_{CAT} avec une moyenne de 24,84. Ce résultat suggère que l'ensemble des combinaisons d'amorces étudiées sont très efficaces dans la révélation du polymorphisme moléculaire chez cette espèce. En outre, des valeurs relativement fortes ont été enregistrées pour E_{ACT}/M_{CAT} et E_{AAG}/M_{CTT}, ce qui témoigne de la puissance de ces combinaisons d'oligonucléotides pour différencier entre les cultivars étudiés.

1.3. Contenu Informationnel du polymorphisme (PIC)

Ce paramètre permet d'estimer l'aptitude des marqueurs à différencier les différents cultivars. Les résultats obtenus montrent que les valeurs du PIC varient de 0,94 à 0,96 avec une moyenne de 0,95 par amorce testée (Tableau 6). En effet, les valeurs du PIC enregistrées pour la majorité des AFLP sont supérieures à 0,94. Ce résultat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle les marqueurs étudiés au cours

de ce travail sont très puissants pour effectuer les différentes analyses de la diversité génétique.

2. Exploration des relations phylogénique entre les cultivars

Dans le but d'analyser la structuration génétique et d'établir les relations génétiques entre les cultivars étudiés, l'ensemble des données obtenus par les marqueurs AFLP a été soumis à plusieurs méthodes d'analyses statistiques.

2.1. Distances génétiques

L'estimation des distances génétiques entre les différents cultivars sur la base des marqueurs AFLP est représentée dans le tableau 7. L'analyse de cette matrice montre que les distances varient de 0,17 à 0,69 avec une moyenne de 0,43. Ce résultat témoigne de la présence d'un important polymorphisme moléculaire qui caractérise l'ensemble des cultivars considérés au cours de ce travail. La distance la plus faible (0,17) témoignant d'une grande similitude a été enregistrée entre les cultivars Bouâdim Bzou [BM1] et Kharaji Bzou [KB] d'une part et entre Ruby [RB1] et Papenschell [PP1] d'autre part. Cependant, la distance génétique la plus élevée (0,69) témoignant de grande divergence a été enregistrée entre les cultivars Grenade Jaune [GJ1] et Dwarf semi Evengreen [DE1] d'une part et entre Sefri [SF2] et Zehri précoce [ZH2] d'autre part. Par ailleurs, tous les autres cultivars se caractérisent par des distances génétiques intermédiaires et présentent de ce fait des degrés variables de rapprochement.

Tableau 7: Matrice des distances génétiques calculées selon la formule de NEI ET LI's (1979) basée sur les 368 marqueurs AFLP générés pour 24 cultivars de grenadier.

	MH1	DE1	NM1	Dj1	CH1	ZH1	GR1	BZ1	SF1	GJ2	WF1	PP1	DB1	ZH2	RB1	GJ1	CK1	OH1	KB	BM1	HM1	SF2	HM2	BM2	
MH1	0.00																								
DE1	0.50	0.00																							
NM1	0.38	0.49	0.00																						
Dj1	0.33	0.51	0.20	0.00																					
CH1	0.33	0.48	0.22	0.20	0.00																				
ZH1	0.39	0.48	0.29	0.27	0.24	0.00																			
GR1	0.35	0.49	0.22	0.24	0.20	0.20	0.00																		
BZ1	0.36	0.53	0.36	0.29	0.29	0.31	0.30	0.00																	
SF1	0.40	0.51	0.36	0.28	0.30	0.31	0.31	0.21	0.00																
GJ2	0.38	0.46	0.28	0.26	0.22	0.23	0.26	0.31	0.29	0.00															
WF1	0.39	0.51	0.20	0.23	0.21	0.25	0.22	0.33	0.23	0.18	0.00														
PP1	0.37	0.57	0.23	0.20	0.22	0.20	0.23	0.35	0.30	0.23	0.18	0.00													
DB1	0.36	0.53	0.26	0.21	0.24	0.28	0.24	0.34	0.30	0.21	0.20	0.19	0.00												
ZH2	0.31	0.60	0.36	0.26	0.33	0.37	0.39	0.36	0.41	0.34	0.29	0.30	0.29	0.00											
RB1	0.35	0.61	0.26	0.23	0.26	0.26	0.27	0.34	0.32	0.25	0.19	0.17	0.22	0.26	0.00										
GJ1	0.40	0.69	0.46	0.39	0.39	0.45	0.40	0.42	0.39	0.43	0.37	0.42	0.36	0.38	0.34	0.00									
CK1	0.35	0.62	0.48	0.42	0.37	0.43	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43	0.45	0.46	0.46	0.44	0.39	0.00								
OH1	0.32	0.49	0.35	0.32	0.28	0.31	0.33	0.36	0.32	0.24	0.30	0.34	0.37	0.43	0.35	0.44	0.25	0.00							
KB	0.40	0.55	0.36	0.36	0.34	0.31	0.32	0.35	0.37	0.32	0.34	0.33	0.33	0.47	0.40	0.45	0.47	0.31	0.00						
BM1	0.38	0.55	0.33	0.36	0.31	0.29	0.32	0.37	0.39	0.32	0.32	0.34	0.36	0.45	0.40	0.52	0.43	0.28	0.17	0.00					
HM1	0.35	0.52	0.32	0.37	0.31	0.34	0.34	0.36	0.32	0.30	0.29	0.37	0.32	0.45	0.39	0.37	0.36	0.22	0.23	0.25	0.00				
SF2	0.51	0.53	0.56	0.53	0.45	0.54	0.50	0.57	0.56	0.51	0.52	0.52	0.51	0.66	0.58	0.45	0.36	0.42	0.51	0.51	0.44	0.00			
HM2	0.43	0.59	0.36	0.33	0.35	0.29	0.25	0.39	0.41	0.37	0.35	0.35	0.35	0.50	0.42	0.45	0.38	0.32	0.20	0.23	0.27	0.43	0.00		
BM2	0.49	0.60	0.45	0.45	0.41	0.35	0.36	0.51	0.53	0.40	0.42	0.45	0.42	0.54	0.47	0.47	0.47	0.37	0.24	0.25	0.28	0.49	0.24	0.00	

2.2. Etablissement du dendrogramme de classification

Dans le but de montrer les relations génétiques et la structuration de la diversité génétique entre les cultivars de grenadier étudiés, la matrice des distances génétiques a été soumise au programme 'Neighbour' pour générer le dendrogramme de classification basé sur la méthode UPGMA. L'analyse de ce dendrogramme qui relate les relations phylogéniques entre les différents cultivars étudiés montre le regroupement des 24 cultivars en trois branches majeures (Figure 12). Le premier groupe (I) est composé par un seul cultivar Dwarf semi Evengreen [DE1]. Quant au deuxième groupe (II), il est composé des cultivars Chioukhi [CK1] et Sefri [SF2], appartenant à la collection Ahlsous et à la zone Azilal respectivement. Cependant, le troisième groupe (III) est subdivisé en deux sous-groupes (III-1) et (III-2). Le cultivar Grenade Jaune [GJ1] forme un sous-groupe (III-1). Le reste des cultivars étudiés est regroupé dans le sous-groupe noté (III-2). Par ailleurs, les cultivars de même appellation Sefri [SF1] et [SF2] sont dispersés dans les groupes. Tandis que les cultivars Bouâdim Bzou [BM1]; Bouâdim Demnate [BM2]; Hamde Bzou [HM1]; Hamde Demnate [HM2] et Karaji de Bzou [KB] provenant tous de la zone d'Azilal sont regroupés dans le même groupe, ceci est en faveur de l'idée que les cultivars de ce groupe pourraient être diffusés par les activités humaines. Ce résultat montre que le regroupement des grenadiers étudiés s'opère indépendamment de l'origine géographique et des dénominations. En effet, des cultivars de même appellation sont éloignés génétiquement alors que des cultivars d'appellation différente présentent des similarités génétiques. De même, le dendrogramme résultant de l'exploration des marqueurs AFLP ne montre pas de structuration de la diversité des cultivars selon leurs caractéristiques morphométriques. Ce résultat indique encore une fois que le niveau de polymorphisme pour cette espèce est assez élevé et marque l'absence de relations entre le regroupement des cultivars et leurs caractères morpho-pomologiques.

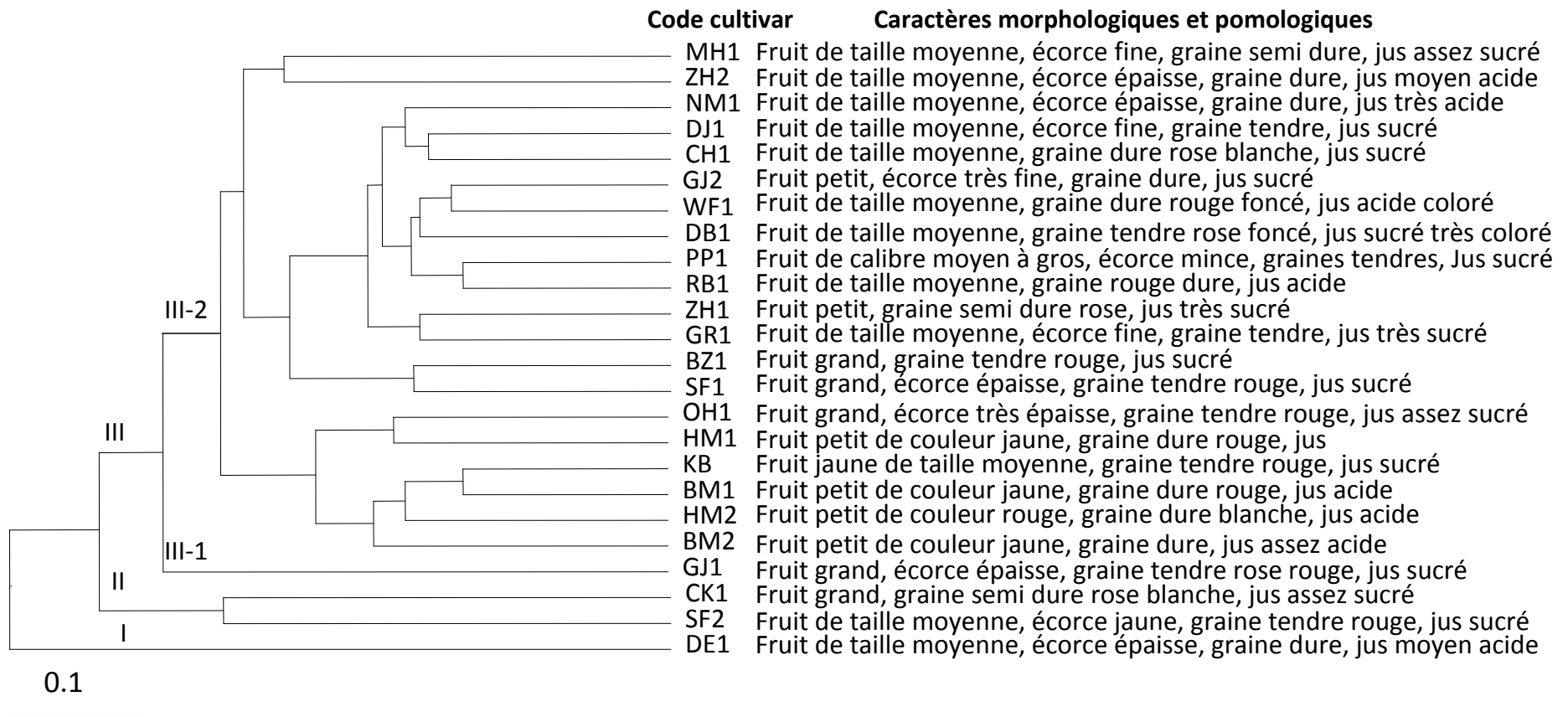


Figure 12 : Dendrogramme UPGMA de classification de 24 cultivars de grenadier généré à partir de 368 marqueurs AFLP.

3. Analyse de la structuration de la diversité génétique

3.1. Analyse en composantes principales (ACP)

Dans le but de comprendre la structuration de la variabilité génétique mise en évidence par les marqueurs AFLP, nous avons soumis les données ainsi obtenues à une analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel XLSTAT 2009.

Les trois premières composantes principales de l'ACP absorbent 34,43% de l'inertie totale (Tableau 8).

Tableau 8: Absorption de la variabilité par les trois premiers axes de l'analyse en composantes principales réalisée sur les marqueurs moléculaires AFLP pour 24 cultivars.

	1	2	3
Valeur propre	47,588	41,423	36,324
Variabilité (%)	13,074	11,380	9,979
% cumulé	13,074	24,454	34,433

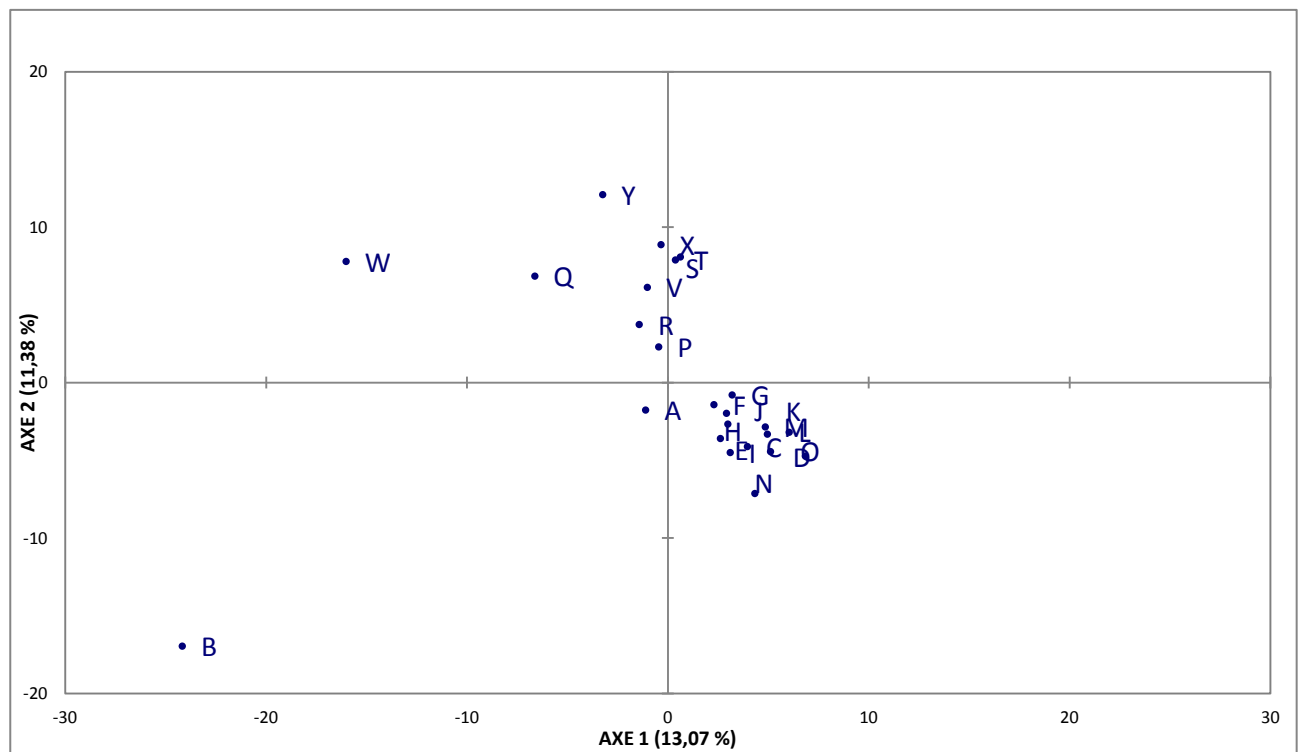
	1			2			3		
	Var	Amorce	Coef	Var	Amorce	Coef	Var	Amorce	Coef
Détermination des axes	M166	A4	-0,720	M176	A4	-0,812	M20	A1	-0,502
	M182	A4	-0,543	M71	A2	-0,703	M174	A4	-0,494
	M1	A1	-0,497	M146	A3	-0,659	M251	A5	-0,401
	M117	A6	0,766	M206	A4	0,686	M111	A2	0,648
	M103	A2	0,855	M79	A2	0,739	M75	A2	0,729
	M358	A2	0,878	M186	A4	0,843	M107	A2	0,746

Var : variable; **Coef** : coefficient

L'axe 1 qui absorbe 13.07% de la diversité totale est défini positivement par les marqueurs générés par les amorces A2 et A6 et négativement par les marqueurs des amorces A4 et A1. L'axe 2 (11.38% de la diversité totale) est défini positivement par les marqueurs des amorces A4 et A2 et négativement par les marqueurs des amorces A4, A2 et A3. L'axe 3 qui absorbe 9.98% de la variabilité

totale, est défini positivement par les marqueurs de l'amorce A2 et négativement par les marqueurs des amorces A1, A4 et A5.

La représentation des cultivars étudiés sur le plan défini par les deux premiers axes qui absorbent 24.45% de la variabilité totale, est illustrée dans la figure 13. L'analyse de cette figure montre que les cultivars étudiés ne se distinguent pas significativement les uns des autres avec toutefois un détachement des deux cultivars [DE1] et [SF2]). Ce résultat qui confirme la classification obtenue par la méthode UPGMA, témoigne de la présence d'une variabilité typiquement continue qui caractérise les cultivars étudiés et suggère la présence d'une base génétique commune entre ces cultivars.



(A:MH1; B:DE1; C:NM1; D:DJ1; E:CH1; F:ZH1; G:GR1; H:BZ1; I:SF1; J:GJ2; K:WF1; L:PP1; M:DB1; N:ZH2; O:RB1; P:GJ1; Q:CK1; R:OH1; S:KB; T:BM1; V:HM1; W:SF2; X:HM2; Y:BM2)

Figure 13: Projection des cultivars étudiés de grenadier dans le plan défini par les deux premières composantes de l'ACP.

3.2. Paramètres de Nei

Pour étudier la répartition du polymorphisme, nous avons subdivisé les cultivars étudiés en deux groupes : (I) de la région de Béni Mellal et (II) de la région d'Azilal. L'indice de diversité génétique de Nei (h), l'indice de Shannon (I), la diversité génétique totale (H_t), la diversité génétique pour chaque groupe (H_s), le pourcentage de bandes polymorphes, le coefficient de différenciation génétique G_{st} de Nei, le flux de gènes N_m (Mcdermott et Mcdonald, 1993) ont été calculés pour les deux groupes (Tableau 9 et 10).

L'estimation de la diversité génétique intra-groupe varie de 0.278 pour le groupe II à 0.326 pour le groupe I avec une moyenne de 0.337. L'indice de Shannon varie de 0.409 pour le groupe II à 0.488 pour le groupe I ainsi que le pourcentage de bandes polymorphes (PBP=95,11%) pour le groupe I, ce qui suggère que les cultivars issus de la région de Béni Mellal (Collection Ahlsouss) sont les plus diversifiés génétiquement.

Tableau 9: Paramètres de diversité Intra-groupes de grenadiers.

Groupe	Moyenne h	Moyenne I	PBP
Groupe I	0.326	0.488	95.11
Groupe II	0.278	0.409	71.47
Total	0.337	0.508	

h : indice de diversité génétique de Nei's (1973); **I** : indice de Shannon; **PBP**: Pourcentage de bandes polymorphes.

Tableau 10: Paramètres de diversité génétique de Nei (1978) : Diversité génétique totale (H_t), diversité génétique pour chaque groupe (H_s); diversité génétique dans les groupes (D_{st}) ; différenciation génétique (G_{st}) ; nombre de migrants efficaces (N_m) et indice de Shannon (I).

Groupe	Nombre des cultivars	H_t	H_s	D_{st}	G_{st}	N_m
Groupe I	18	0.31	0.27	0.04	0.11	4.19
Groupe II	6	0.27	0.18	0.09	0.31	1.13
Groupes I-II	24	0.33	0.303	0.027	0.091	4.99

Les valeurs moyennes de la diversité génétique totale de chaque groupe varient de 0.27 pour le groupe II à 0.31 pour le groupe I avec une moyenne de 0.33 pour (H_t) et de 0.18 pour le groupe II à 0.27 pour le groupe I avec une moyenne de 0.303 pour (H_s) (Tableau 10), ce qui suggère l'existence d'un niveau de polymorphisme intragroupe élevé. Le coefficient de différenciation génétique entre les groupes (G_{st}) varie de 0,11 pour le groupe I à 0.31 pour le groupe II avec une moyenne de 0.09, indiquant que 91% de la variabilité génétique totale est due à la variation intra-groupe alors que seulement 9% de cette variabilité est attribuée aux différences entre les groupes. Ainsi les groupes définis selon l'origine géographique présentent une structuration génétique distincte. Le groupe I qui possède le coefficient de (G_{st}) le plus faible (0.11) représente le groupe le moins différencié. Par contre, Le groupe II est le groupe le plus différencié (0.31).

Le flux de gènes (N_m) varie de 4.19 pour le groupe I à 1.13 pour le groupe II, avec une moyenne de 4.99. Ceci pourrait être expliqué par le mode de reproduction préférentiellement allogame de grenadier. En effet, les cultivars du groupe I proviennent de la même région (collection d'Ahlsousse). Pour le groupe II constitué des cultivars prospectés dans la nature, on note une valeur de G_{st} relativement élevée (0.31) et le flux de gène est le plus faible (1.13). Ce résultat peut être expliqué d'une part par la présence des barrières naturelles du fait que les cultivars de ce groupe se trouvent dans une zone montagneuse qui pourrait limiter

les échanges géniques et d'autre part par la propagation des cultivars par multiplication végétative et le faible échantillonnage (6 cultivars).

L'indice de Shannon (I) qui permet d'avoir une information relative sur le degré de variabilité génétique entre les groupes géographiques (Lewontin, 1972), varie de 0,41 à 0,49 avec une moyenne de 0,45 (Tableau 9).

Les similarités entre ces deux groupes ont été calculées en utilisant l'indice de Nei (1978). Les distances génétiques varient de 0,04 à 0,09 (tableau 8). La similarité la plus faible (0,04) a été enregistrée dans le groupe I. Alors que, la similarité la plus élevée a été obtenue pour le groupe II.

3.3. Distances génétiques

La distance génétique entre les deux groupes est plus importante (0.0905) avec une Identité génétique de Nei (0,9134) témoignant que les cultivars de grenadier issus de la région de Béni Mellal et la région d'Azilal sont éloignés génétiquement. Ce qui consolide les résultats obtenus précédemment (Tableau 11).

Tableau 11 : Identités génétiques et distances génétiques entre les groupes de grenadiers (Nei, 1978).

Groupe	Groupe I	Groupe II
Groupe I	****	0.9134
Groupe II	0.0905	****

Identités génétiques de Nei (haut de la diagonale) et Distances génétiques (bas de la diagonale).

3.4. Marqueurs spécifiques

Outre l'étude de la structuration génétique et l'identification des cultivars étudiés, les marqueurs AFLPs peuvent conduire à déterminer des liaisons à des QTLs (Quantitative Trait Loci). La détermination de marqueurs spécifiques, à certains cultivars, liés à des caractères d'intérêt seront d'un grand apport pour

promouvoir la sélection assistée par marqueur moléculaire et pour mettre en place des stratégies de préservation et de valorisation de cette espèce. Dans cette partie, des allèles ont été identifiés au niveau des cultivars.

Tableau 12: Marqueurs AFLP spécifiques révélés chez certains cultivars de grenadier.

	SF1 Sefri	BZ1 Bzou	ZH2 Zéhri précoce	DB1 Bouâdim Bzou	HM2 Hamd Demnate
Marqueurs spécifiques aux cultivars	A17 A25 A65 D16 F42	A2 A23 D35 E63	E26 E30 E40 E76	A41 F73	D32 E52 F16
% de marqueurs spécifiques	1,35	1,08	1,08	0,54	0,81

L'analyse du tableau 12, montre la richesse potentielle des cultivars en marqueurs AFLP spécifiques et uniques. En effet, les cultivars Sefri [SF1], Bzou [BZ1] et Zehri précoce [ZH2] de la collection d'Ahlsouss sont plus riches en marqueurs spécifiques avec un pourcentage cumulé de 3,51% tandis que les cultivars de la région d'Azilal (Bouâdim Bzou [DB1] et Hamd Demnate [HM2]) possèdent uniquement 1,35% de marqueurs AFLP spécifiques.

4. Discussion et conclusion

La technique AFLP a été adaptée pour l'identification moléculaire des cultivars marocains de grenadier. Ainsi, à l'aide de 6 couples d'amorces, la technique a généré un total de 519 bandes dont 368 polymorphes avec un nombre de bande moyenne détectée par couples d'amorces de 86.5 fragments. Ce nombre considérable a permis l'analyse de la structuration génétique et la détermination des relations génétiques au sein du matériel génétique local de grenadier. Sarkhosh et *al.* (2011) ont reporté une valeur inférieure chez 21 génotypes Iraniens en utilisant des marqueurs fluorescents (47,61 fragments par couple d'amorces). Ainsi, le pourcentage de bandes polymorphes (PBP) moyen obtenu est de 71% par

combinaison d'amorces. Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Moslemi et *al.* (2010) pour 67 génotypes de grenadier Iraniens. Cependant, Jbir et *al.* (2008); Yuan et *al.* (2007) ont révélé des valeurs supérieures chez 34 génotypes Tunisiens (94,7%) et chez 85 génotypes Chinois (73,26%). La taille des fragments amplifiés allait entre 100 et 488pb. Ce résultat montre que le niveau de polymorphisme détecté est très élevé. Il s'avère par conséquent que l'approche AFLP est efficace dans la production d'un nombre très élevé de marqueurs polymorphes et utile dans l'étude du polymorphisme moléculaire de l'espèce *Punica granatum* L.

Les paramètres Rp (149,03) et PIC (0,95) calculés, témoignent de l'efficacité de l'ensemble des combinaisons d'amorces utilisées, ainsi que leur fiabilité dans l'estimation de la diversité génétique du grenadier sans pour autant avantager l'une d'entre elles. De même, Jbir et *al.* (2008) ont montré des valeurs proches avec une valeur collective du Rp de 129,14 et une valeur moyenne du PIC de 0,97 pour les mêmes combinaisons d'amorces AFLP utilisées. Par ailleurs, Moslemi et *al.* (2010) ont reporté des valeurs inférieures avec une valeur collective du Rp de 59,49 et une valeur moyenne du PIC de 0,40 pour d'autres combinaisons d'amorces AFLP.

Les différents travaux effectués à l'aide des marqueurs AFLP tendent de confirmer l'efficacité de toutes les combinaisons d'amorces AFLP utilisées (Yuan et *al.*, 2007 ; Jbir et *al.*, 2008 ; Awamleh et *al.*, 2009; Moslemi et *al.*, 2010). Dans notre travail, il apparaît clairement que la combinaison E_{AGC}/M_{CAA} est la plus informative et contribue au mieux dans la détection de la diversité génétique de l'espèce *Punica granatum* L. De même, cette combinaison d'amorce a contribué le plus dans l'étude de la diversité génétique du grenadier Tunisien (Jbir et *al.*, 2008). En effet, l'efficacité de la technique AFLP est d'autant plus importante que le nombre de marqueurs générés est plus grand et le nombre de couples d'amorces testés est plus important (Morgante et Olivieri, 1993, Jbir et *al.*, 2008).

L'estimation des distances génétiques entre les différents cultivars basée sur la formule de Nei et Li (1979) a révélé une valeur moyenne de 0,43. Cette valeur est proche de celle reportée par Jbir et *al.* (2008) et inférieure à celle obtenue par

Sarkhosh et *al.* (2011). Ce résultat témoigne de l'existence d'une variabilité génétique importante entre les cultivars étudiés. Récemment, une étude basée sur des paramètres physico-chimiques liés aux fruits chez les cultivars marocains du grenadier, a révélé une large diversité au sein de ces cultivars (Hmid et *al.*, 2013).

Le dendrogramme UPGMA généré par ces AFLP a montré que les cultivars étudiés sont regroupés indépendamment de leurs origines géographiques et de leurs dénominations. Bien que, ces cultivars aient montré une grande divergence phénotypique, ce résultat peut suggérer une base génétique commune. En effet, les cultivars de même appellation [SF1] et [SF2] ; [HM1] et [HM2] sont éloignées génétiquement alors que des cultivars d'appellation différent Bouâdim Bzou [BM1] et Kharaji Bzou [KB]; Ruby [RB1] et Papenschell [PP1] présentent des paramètres morphologiques et pomologiques différents, se trouvent rapprochées. Hmid et *al.* (2013) ont montré une différence significative concernant les caractères pomologique notamment le poids, le diamètre et la longueur du fruit, le diamètre et la longueur du calice des fruits pour ces mêmes cultivars étudiés. Des résultats similaires ont été rapportés par MARS (2001) dans l'étude du polymorphisme morphométrique du grenadier Tunisien. Ainsi, les résultats obtenus peuvent être expliqués par des problèmes de synonymie et d'homonymie, puisque les cultivars sont localement appelés selon leurs origines géographiques, les paramètres du fruit (couleur, taille, gout du jus, graines) (Mars et Marrakchi, 1998). Les grenadiers étudiés à l'aide des marqueurs AFLP semblent appartenir à une variété polyclonale ou multiclone, comme a été suggéré par Mars, (2001). La variabilité des critères pomologiques peut être attribuée à des mutations somatiques. Le dendrogramme, résultant de l'exploration des marqueurs AFLP, ne montre pas de structuration de la diversité des cultivars selon leurs caractéristiques morphométriques. Ce résultat indique encore une fois que le niveau de polymorphisme pour cette espèce est assez élevé et marque l'absence de relations entre le regroupement des cultivars et leurs caractères morpho-pomologiques. Ce résultat est en accord avec les résultats de l'étude de Yuan et *al.* (2008) qui ont montré que la plupart des cultivars Chinois appartenant à une même population, sont regroupés ensemble sur le dendrogramme UPGMA, cependant, les distances géographiques ne sont pas corrélées aux

distances génétiques. Le même résultat a été enregistré pour le grenadier Iranien (Moslemi et al., 2010). De même Jbir et al. (2008) ont signalé que le regroupement des cultivars tunisiens s'opère indépendamment de leur origine géographique et de leur dénomination. En outre, l'AFLP a permis la génération d'un nombre très élevé de marqueurs moléculaires qui sont fiables pour différencier entre les cultivars et/ou les variétés polyclonales. Récemment, la diversité génétique chez 12 variétés locales de grenadier collectées à trois lieux différents en Jordanie, a été évaluée par Awamleh et al. (2009) avec huit combinaisons d'amorces d'AFLP, la similarité la plus élevée a été enregistrée entre les variétés locales Qrati et Khdari; Tâeafi et Helow Khashabi, alors que la variété Zeglabi a montré une grande diversité comparativement aux autres variétés locales. Ces marqueurs ont été efficaces et utiles pour comprendre la diversité au sein de l'espèce *Punica granatum* L. et pour établir les empreintes digitales pour déterminer la relation génétique entre les variétés locales cultivées en Jordanie. De Même, Moslemi et al. (2010) ont illustré un dendrogramme UPGMA qui regroupe 67 cultivars Iraniens en 6 groupes.

L'analyse de la structuration génétique des groupes définis selon l'origine géographique, a été réalisée sur la base des coefficients de différenciation génétique (G_{st}) et le nombre de migrants efficaces (N_m). La valeur du paramètre G_{st} indique une différenciation génétique inter-groupes de 9%. Ce niveau de différenciation génétique est inférieur par comparaison à ceux cités dans d'autres études chez le grenadier. Yuan et al. (2007), ont montré que 20,81% de la variabilité totale de 85 génotypes de grenadier provenant de six populations géographiques en Chine est dûe à la variabilité inter-population. De même, Jbir et al. (2008) ont reporté que 23% de la diversité globale est répartie entre les deux groupes de l'Île de Djerba et de la région du Centre. En outre, la valeur du flux de gènes (N_m) dans notre matériel génétique est de 2,66. Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Yuan et al. (2007) et Jbir et al. (2008). La valeur du N_m montre que les flux géniques sont importants chez (*Punica granatum* L.) et sont responsables de la différenciation détectées entre les groupes. Ce résultat peut être aussi expliqué par les pratiques culturelles basées essentiellement sur les échanges des plants entre les localités du fait de la présence des barrières naturelles.

En conclusion, l'étude du polymorphisme des marqueurs AFLP a révélé une importante variabilité génétique des cultivars étudiés. Par ailleurs, l'analyse de la diversité génétique a montré qu'il n'y a pas une dépendance de la structuration de la diversité par rapport à l'origine géographique du matériel étudié.

Les résultats obtenus au cours de cette partie ont été soumis pour publication dans la revue Australian Journal of Crop Science :

Ajal E.A., Jbir R., Legua P., Martinez J.J., Martinez R., Salhi-hannachi A. et Haddioui A. Genetic Analysis of Moroccan Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Cultivars Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers. Australian Journal of Crop Science. (In press)

Partie II : Analyse de la diversité génétique des grenadiers par l'utilisation des marqueurs ISSR

Après avoir entrepris une analyse des marqueurs moléculaire AFLP qui a permis de montrer une large diversité génétique au sein des cultivars étudiés, nous avons cherché à consolider les résultats ainsi obtenus par l'exploration des marqueurs ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats). Il s'agit d'analyser la variabilité génétique au niveau intra et inter-groupe et d'étudier les relations phylogéniques chez l'espèce du grenadier marocain. Cette technique permet d'assurer une amplification des séquences flanquées par les motifs microsatellites et de générer un polymorphisme élevé en amplifiant diverses régions du génome (Winter et Kahl, 1995).

Dans notre étude, un ensemble de 27 cultivars a servi pour l'analyse de la diversité génétique chez le grenadier Marocain à l'aide 9 amorces ISSR. Les cultivars se répartissent en trois groupes géographiquement différents (Tableau 13) :

- 7 cultivars provenant de la collection Ahlsouss, cité auparavant.
- 9 cultivars échantillonnés à partir des différents sites prospectés dans la zone d'Azilal, cité auparavant.
- 5 cultivars provenant de la région de Béni Mellal à 452- 627 m d'altitude. Cette région est caractérisée par une pluviométrie moyenne annuelle de 360mm et une température moyenne est de 20°C.
- 6 cultivars provenant du site Tmassine de la région de Settat à 354m d'altitude caractérisée par un climat continental avec une température basses en hiver et élevé en été : 6 à 30 °C. La pluviométrie moyenne annuelle varie entre 200 et 450 mm/année.

Tableau 13: Dénominations, codes et origines géographiques des cultivars de grenadier étudiés par la technique ISSR.

N°	Cultivar	Code	Origine géographique	Latitude Nord	Longitude Ouest	Altitude (m)	Groupes
1	Bouchouk	BK	Tmassine-Settat	32°43'	7°41'	354	Groupe I
2	Merssi	MS2	Tmassine-Settat	32°43'	7°41'	354	
3	Sefri	SF4	Tmassine-Settat	32°43'	7°41'	354	
4	Zariâ	ZR	Tmassine-Settat	32°43'	7°41'	354	
5	Lkhadri	LK	Tmassine-Settat	32°43'	7°41'	354	
6	Bzek Tair	BT	Tmassine-Settat	32°43'	7°41'	354	
7	Bouâdime	BD1	Bzou	32°06'	7°02'	378	Groupe II
8	Kharaji	KJ1	Bzou	32°06'	7°02'	378	
9	Bourassa	BR	Sour El Lâz- Demnat	31°49'	7°01'	668	
10	Bzioui	BZ1	Sour El Lâz- Demnat	31°49'	7°01'	668	
11	Hamed rouge	LG3	Ait Oumghar- Demnat	31°43'	6°59'	1023	
12	Hamed blanc	LG1	Ait Oumghar-Demnat	31°43'	6°59'	1023	
13	Grenade rouge	GR1	Ait Attab	32°06'	6°46'	689	
14	Grenade verte	GR3	Ait Attab	32°06'	6°46'	689	
15	Merssi	MS1	Demnat	31°43'	6°59'	956	
16	Bzou	BZ2	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
17	Chelfi	CH	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
18	Djebali	DJ	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
19	Grenade rouge	GR2	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
20	Kharaji	KJ2	Ouled Abellah	32°29'	6°29'	452	
21	Sefri	SF2	Ouled Abellah	32°29'	6°29'	452	
22	Meski	MK	Ouled Abellah	32°29'	6°29'	452	
23	Ounk Lahmam	OL1	Ouled Abellah	32°29'	6°29'	452	
24	Sefri	SF1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
25	Zehri d'automne	ZH1	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
26	Zehri Précoce	ZH2	Collection Ahlsouss	32°28'	6°35'	438	
27	Bouyâlem	BM2	Taghzirt Béni Mellal	32°26'	6°11'	627	

L'ADN cellulaire total a été extrait en utilisant un Kit, le DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen S.A, Courtaboeuf, France, 2006). L'estimation de la concentration et de la qualité de l'ADN extraits a été basée sur la méthode visuelle de Sambrook et al. (1989) selon laquelle les échantillons d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose (0,8%). Ainsi, nous avons obtenu des extraits correspondant à des solutions pures

d'ADN de haut poids moléculaire (Figure 14). En effet, on observe la présence de bandes nettes et intenses. L'intensité de ces bandes est comparée aux différentes concentrations de l'ADN standard Invitrogen. Ce résultat confirme l'efficacité de la technique adoptée dans l'extraction de l'ADN chez l'espèce grenadier.

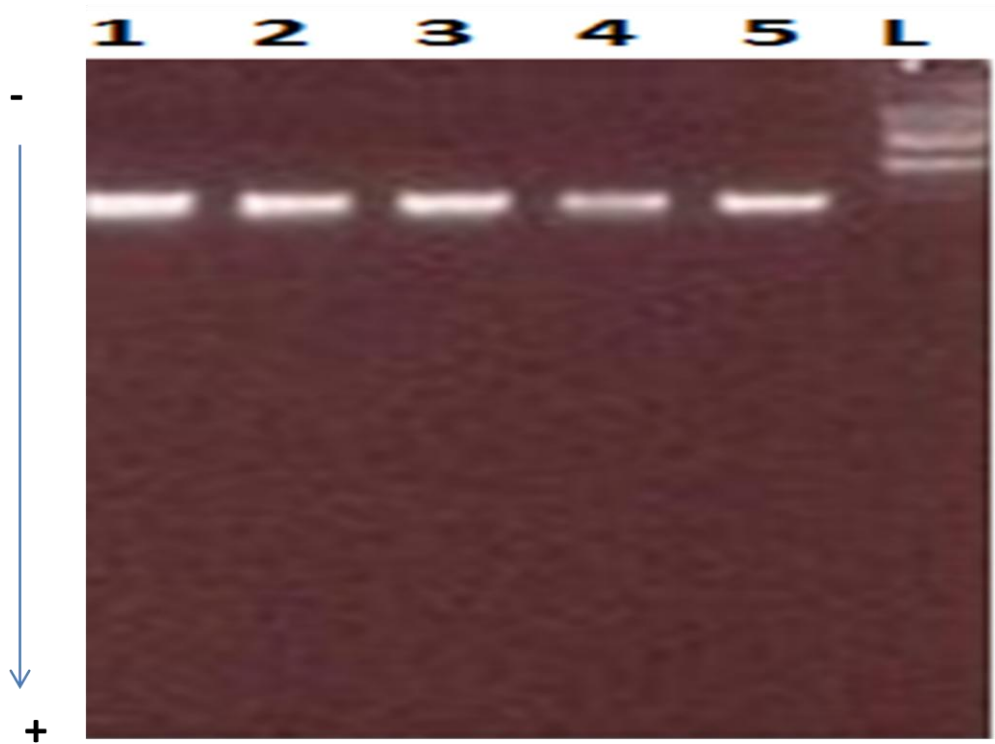


Figure 14: Electrophorèse de l'ADN cellulaire total sur gel d'agarose (0,8%).

Piste 1 à 5: ADNs génomiques de quelques cultivars de grenadier.

Piste L: Ladder 1Kb, Invitrogen.

Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose. La figure 15 montre un exemple de profil ISSRs.

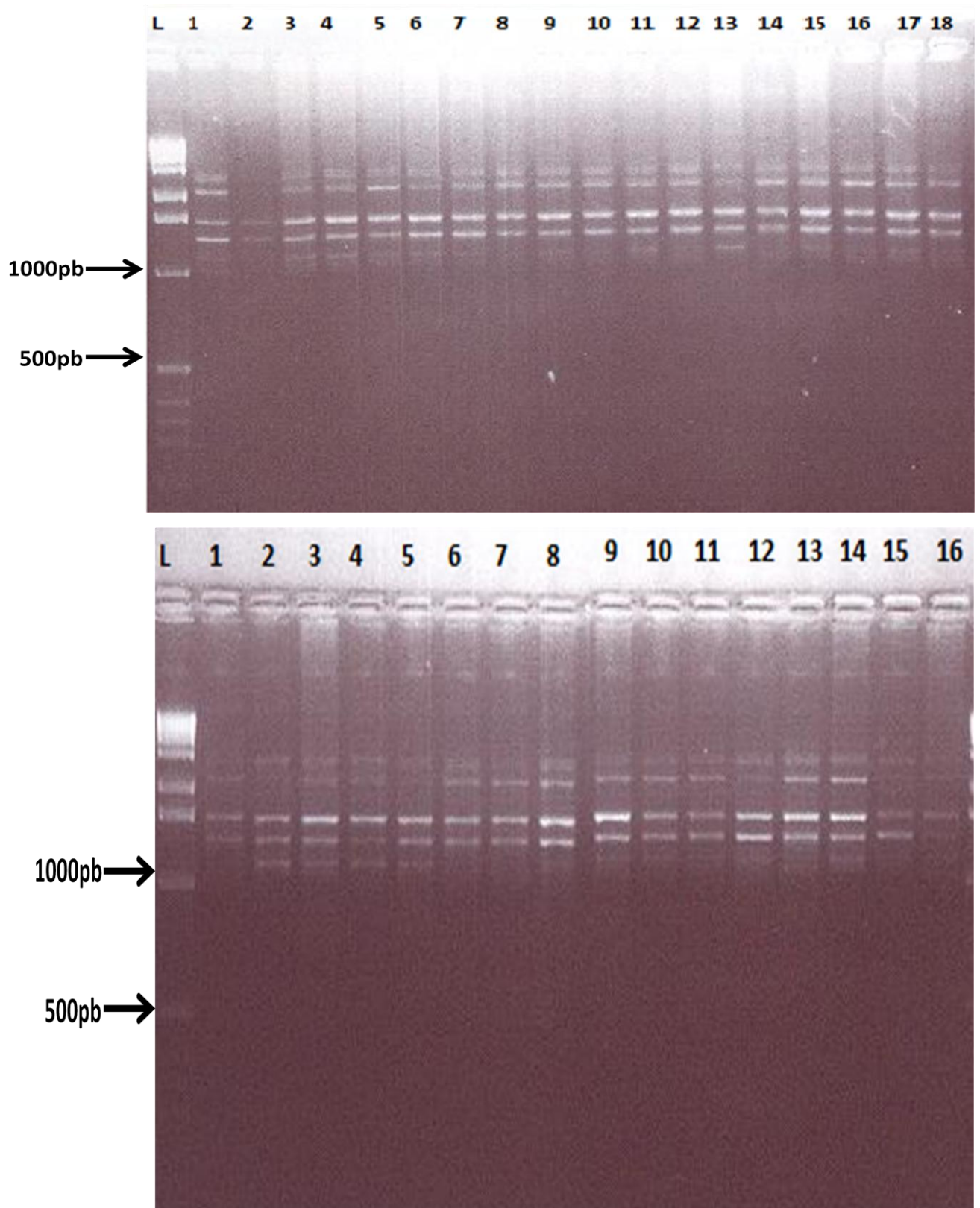


Figure 15 : Exemple de profils d'amplification par ISSR obtenus par l'amorce $((AG)_8YA)$ chez les cultivars de grenadier (1-16).

Piste L : Marqueur de poids moléculaire (1Kb, Invitrogen).

1. Analyse de la diversité génétique par la technique ISSR

Parmi les neuf amorces testées pour explorer le polymorphisme moléculaire, seule l'amorce 825 a généré un profil monomorphe. Les autres amorces ont permis d'obtenir des amplimères polymorphes et reproductibles (Tableau 14).

L'analyse des produits d'amplification montre qu'un total de 73 amplimères a été généré pour l'ensemble des cultivars étudiés. Parmi ces amplimères 61 se sont avérés polymorphes ce qui correspond à un pourcentage de bandes polymorphes (PBP=83.56%) suggérant ainsi que les amorces testées sont efficaces pour explorer le polymorphisme moléculaire chez le grenadier. Par ailleurs, le nombre total de bandes générées diffère selon les amorces utilisées, il varie de 3 pour l'amorce 809 et 812 à 13 pour l'amorce 840, avec une moyenne de 6.78 bandes par amorce. De plus les amorces 810, 827 et 840 donnent 100% de polymorphisme suggérant l'efficacité de ces dernières pour explorer la diversité chez cette espèce. Ce même résultat a été obtenu pour l'amorce 827 chez 89 génotypes Indiens (Narzary *et al.*, 2010). En revanche, l'amorce 809 contribue le moins dans la discrimination entre les cultivars étudiés avec un taux de polymorphisme de 43% (Tableau 14).

Tableau 14: Polymorphisme des marqueurs ISSRs étudiés.

Amorces	Séquence 5'-3'	Nombre de bandes		PBP%	Rp	PIC
		NTB	NBP			
809	(AG) ₈ G	7	3	43	1	0.82
810	(GA) ₈ T	11	11	100	4.93	0.96
812	(GA) ₈ A	5	3	60	0.86	0.96
827	(AC) ₈ G	11	11	100	6.57	0.95
834	(AG) ₈ YT	8	7	87	3.14	0.95
836	(AG) ₈ YA	10	9	90	5.57	0.94
840	(GA) ₈ YT	13	13	100	8.00	0.96
841	(GA) ₈ YC	5	4	80	2.86	0.93
825	(AC) ₈ T	3	0	-	-	-
Total		73	61		32.93	7.47
Moyenne		8.11	6.78	83.56	4.12	0.93

NTB: nombre total de bandes; NBP: nombre de bandes polymorphes; PBP: Pourcentage de bandes polymorphes ; Rp: Pouvoir de résolutif ; PIC: Contenu Informatique du polymorphisme.

En outre, nous avons calculé les valeurs du pouvoir résolutif (R_p) pour déterminer la capacité de chaque amorce à différencier les cultivars étudiés. L'analyse des résultats obtenus montre que la somme des pouvoirs résolutifs des différentes amorces est de 32.93. Ce résultat suggère que les amorces testées sont efficaces dans la détection du polymorphisme moléculaire. Les valeurs de R_p varient de 0.86 pour l'amorce 812 à 8.00 pour l'amorce 840 avec une moyenne de 4.12, ce qui montre que toutes les amorces n'ont pas la même efficacité de discrimination entre les cultivars. En effet, l'amorce 840 qui présente la valeur la plus élevée révèle sa puissance dans la différenciation entre les cultivars. Cependant, l'amorce 812, avec la valeur la plus faible de pouvoir résolutif est la moins efficace (Tableau 14). Par conséquent, il semble que les oligonucléotides de répétition $(GA)_8$ contribuent efficacement à la caractérisation et à l'examen de la diversité génétique des cultivars marocains de grenadier.

Par ailleurs, tenant compte de chacune des amorces retenues, la valeur moyenne du paramètre du contenu informationnel du polymorphisme PIC varie de 0.82 à 0.96 avec une moyenne de (0.93) (Tableau 14). Ce résultat prouve l'efficacité des amorces testées pour l'analyse de la diversité génétique du grenadier marocain.

2. Structuration génétique des cultivars étudiés

Les profils d'amplification obtenus par les huit amorces ISSR ont été assimilés à des marqueurs moléculaires dominants en attribuant respectivement 1 et 0 pour la présence et l'absence du marqueur. Ces données sont transformées en une matrice binaire (1/0). Dans le but de comprendre la structuration du polymorphisme moléculaire mise en évidence par ces marqueurs ainsi que les relations phylogénétiques qui existent entre les espèces analysées, la matrice des données ainsi obtenue a été soumise à plusieurs méthodes d'analyses statistiques. Il s'agit de l'estimation des distances génétiques avec le programme Genedist selon la formule de Nei et Li (1979) suivi par l'élaboration de l'arbre phylogénétique ainsi que par l'analyse en composantes principales (ACP) par le logiciel XLSTAT.

2.1. Distances génétiques de Nei et Li (1979)

L'exploitation de la matrice binaire par les procédures statistiques a permis d'estimer les distances génétiques entre les cultivars en utilisant la formule de Nei et Li (1979). L'analyse de cette matrice montre que les distances génétiques varient de 0.12 à 1 avec une moyenne de 0.67. Ce résultat confirme le haut niveau de la diversité génétique des cultivars étudiés. La valeur la plus faible 0,12 a été enregistrée entre les deux cultivars Kharaji [KJ1] et Djebali [DJ] suggérant leurs grandes similarités génétiques au niveau des marqueurs étudiés. Cependant, la plus grande distance de 1 a été observée entre les deux cultivars Sefri [SF1] et Bzoui [BZ1] suggérant leur grande divergence. Par ailleurs, tous les autres cultivars se caractérisent par des distances génétiques intermédiaires et présentent de ce fait des degrés variables de rapprochement.

Tableau 15: Matrice des distances génétiques entre 27 cultivars de grenadier calculée selon la formule de Nei et Li (1979) basées sur 61 marqueurs ISSR.

	BD1	BK	BR	BM2	BT	BZ1	BZ2	CH	DJ	GR1	GR2	GR3	KJ1	KJ2	LG1	LG3	LK	MS1	MS2	MSK	OL1	SF1	SF2	SF4	ZR	ZH1	ZH2	
BD1	0.00																											
BK	0.40	0.00																										
BR	0.53	0.20	0.00																									
BM2	0.56	0.56	0.47	0.00																								
BT	0.68	0.56	0.28	0.45	0.00																							
BZ1	0.53	0.42	0.30	0.71	0.33	0.00																						
BZ2	0.47	0.53	0.56	0.33	0.47	0.61	0.00																					
CH	0.53	0.58	0.50	0.53	0.37	0.30	0.50	0.00																				
DJ	0.47	0.47	0.35	0.47	0.33	0.30	0.45	0.18	0.00																			
GR1	0.47	0.42	0.40	0.65	0.33	0.14	0.45	0.30	0.26	0.00																		
GR2	0.71	0.58	0.40	0.53	0.28	0.56	0.45	0.68	0.45	0.45	0.00																	
GR3	0.33	0.28	0.22	0.53	0.42	0.26	0.56	0.40	0.18	0.35	0.56	0.00																
KJ1	0.40	0.45	0.37	0.50	0.40	0.37	0.47	0.28	0.12	0.33	0.58	0.20	0.00															
KJ2	0.40	0.40	0.47	0.45	0.68	0.47	0.33	0.78	0.53	0.47	0.65	0.37	0.50	0.00														
LG1	0.50	0.50	0.47	0.50	0.50	0.33	0.53	0.37	0.47	0.28	0.71	0.47	0.50	0.40	0.00													
LG3	0.30	0.45	0.33	0.50	0.56	0.37	0.53	0.47	0.37	0.53	0.78	0.28	0.35	0.35	0.30	0.00												
LK	0.53	0.65	0.56	0.28	0.47	0.68	0.18	0.56	0.45	0.50	0.45	0.56	0.53	0.42	0.47	0.53	0.00											
MS1	0.53	0.65	0.50	0.37	0.33	0.50	0.35	0.50	0.40	0.40	0.35	0.50	0.53	0.53	0.47	0.58	0.26	0.00										
MS2	0.58	0.42	0.22	0.42	0.20	0.30	0.40	0.45	0.30	0.30	0.30	0.35	0.42	0.53	0.47	0.53	0.30	0.30	0.00									
MSK	0.30	0.40	0.33	0.45	0.56	0.42	0.42	0.37	0.24	0.42	0.58	0.24	0.22	0.50	0.56	0.30	0.47	0.47	0.42	0.00								
OL1	0.45	0.35	0.24	0.45	0.45	0.33	0.47	0.28	0.16	0.42	0.58	0.20	0.26	0.56	0.45	0.26	0.53	0.47	0.42	0.18	0.00							
SF1	0.61	0.61	0.71	0.35	0.98	1.00	0.33	0.93	0.71	0.93	0.78	0.71	0.68	0.56	0.82	0.74	0.37	0.58	0.78	0.56	0.61	0.00						
SF2	0.45	0.61	0.47	0.56	0.50	0.33	0.53	0.24	0.28	0.33	0.78	0.37	0.35	0.45	0.18	0.26	0.53	0.47	0.47	0.40	0.30	0.89	0.00					
SF4	0.71	0.71	0.50	0.47	0.65	0.35	0.56	0.40	0.50	0.45	0.74	0.56	0.53	0.47	0.37	0.47	0.45	0.45	0.56	0.42	0.47	0.78	0.33	0.00				
ZR	0.53	0.37	0.35	0.58	0.37	0.14	0.56	0.35	0.35	0.18	0.56	0.30	0.42	0.42	0.16	0.28	0.61	0.50	0.40	0.53	0.33	1.00	0.24	0.50	0.00			
ZH1	0.50	0.61	0.47	0.30	0.30	0.58	0.42	0.47	0.42	0.53	0.42	0.53	0.56	0.56	0.45	0.45	0.28	0.20	0.37	0.40	0.40	0.56	0.45	0.42	0.58	0.00		
ZH2	0.35	0.40	0.37	0.22	0.56	0.78	0.28	0.58	0.42	0.58	0.53	0.42	0.40	0.45	0.50	0.45	0.20	0.33	0.42	0.30	0.35	0.22	0.56	0.47	0.65	0.30	0.00	

2.2. Etablissement du dendrogramme de classification

Un dendrogramme a été établi sur la base des distances génétiques de Nei et Li (1979) afin de déterminer les relations génétiques et la structuration de la diversité génétique entre les cultivars étudiés. L'analyse de la topologie de ce dendrogramme montre clairement l'existence de deux groupes I et II (Figure 16). Le premier groupe (I) est composé de deux sous groupes (I-a) et (I-b). Le sous groupe (I-a) regroupe la majorité des cultivars dont Djebali [DJ1] et Kharaji [KJ1] sont regroupés génétiquement. Cependant, le sous groupe (II-b) est constitué par le cultivar Sefri [SF4] qui se distingue significativement de tous les autres cultivars. Le deuxième groupe (II) est subdivisé également en deux sous groupes. Le premier sous groupe (II-a) regroupe les 3 cultivars Zehri Précoce [ZH2] ; Bzou [BZ2], Sefri [SF1] de la collection Ahlsouss avec le cultivar Lkhadri [LK] d'origine de la région Tmassine (Settat) et le cultivar Bouyâlem [BM2] de la région de Taghzirt. Le sous groupe (II-b) rassemble des cultivars de même appellation Merssi [MS1] et Merssi [MS2], issus d'origines différentes (Demnate et Tmassine) avec BzekTair [BT] originaire de la région Tmassine et les deux cultivars Grenade rouge [GR2] et Zehri d'automne [ZH1] provenant de la collection Ahlsouss.

Il est important de signaler que des cultivars ayant les mêmes appellations Kharaji [KJ1] et [KJ2], Zehri [ZH1] et [ZH2] et grenade rouge [GR1] et [GR2] se regroupent dans des groupes différents. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de fausses appellations qui peut être avancée ou celle de variétés polyclonales.

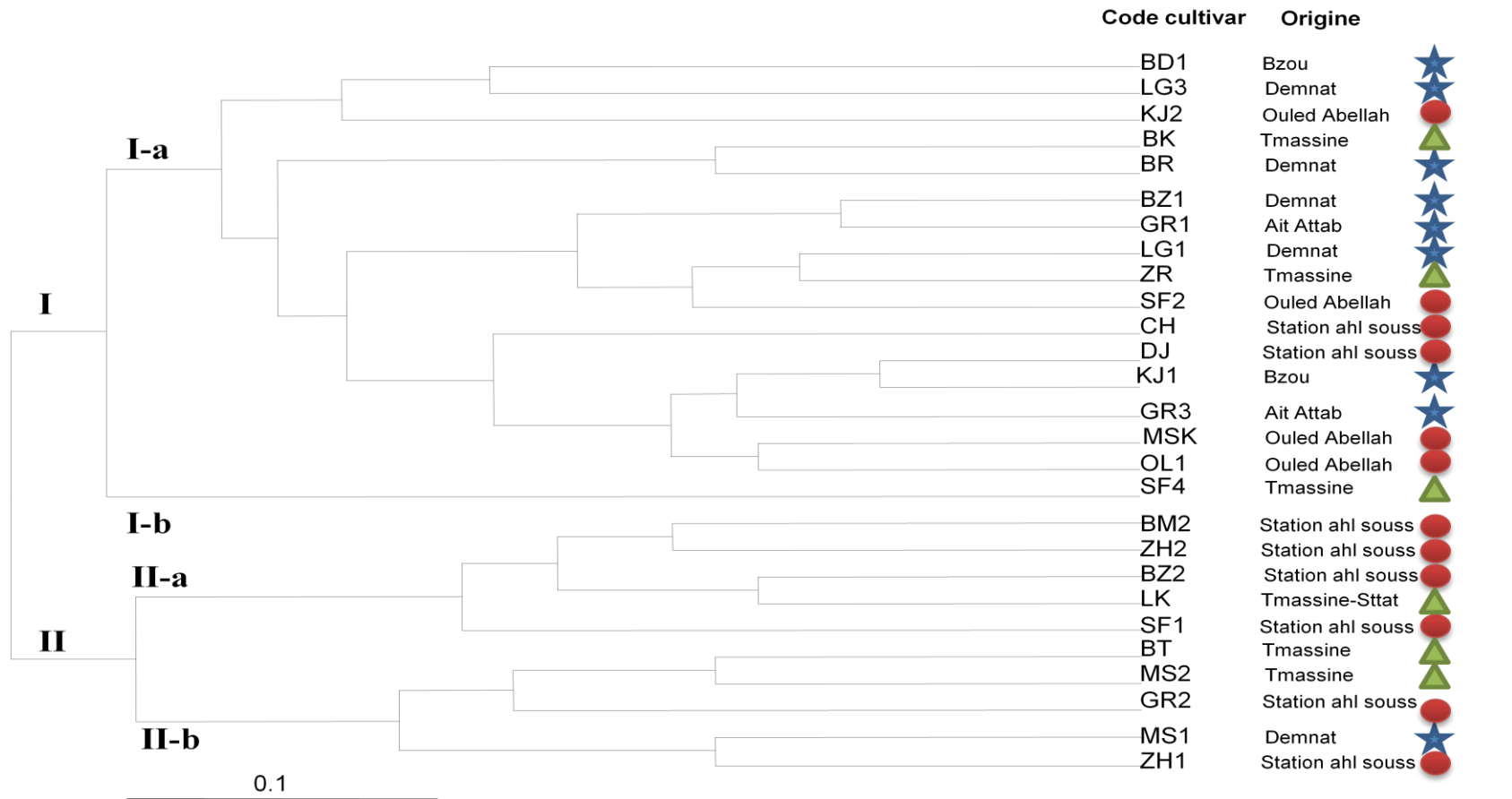


Figure 16: Dendrogramme UPGMA représentant les relations génétiques entre les 27 cultivars de grenadier construit selon la méthode UPGMA et basé sur les 61 marqueurs ISSR.

★ Bzou - Demnate ● Collection Ahlsouss-Ouled Abdelah ▲ Tmassine-Settat

2.3. Analyse en composantes principales (ACP)

Les données ISSR ont été analysées par le logiciel XLSTAT 2009 pour générer une représentation bidimensionnelle des cultivars de grenadier. L'analyse en composante principale permet de visualiser le lien entre les cultivars ainsi que la contribution des marqueurs ISSR dans cette représentation. Les résultats de cette analyse sont consignés dans le tableau 16. En effet, les trois premières composantes principales de l'analyse en composantes principales absorbent 41.21% de la variabilité totale.

Tableau 16: Absorption de la variabilité par les trois premiers axes de l'Analyse en composantes principales réalisée sur les marqueurs ISSR pour les 27 cultivars étudiés.

	1	2	3
Valeur propre	11,69	7,64	5,81
Variabilité (%)	19,17	12,52	9,52
% cumulé	19,17	31,69	41,21

	1			2			3		
	Var	Amorce	Coef	Var	Amorce	Coef	Var	Amorce	Coef
Détermination des axes	M15	827	-0,622	M33	812	-0,497	M58	836	-0,502
	M44	840	-0,415	M22	827	-0,473	M54	836	-0,494
	M50	812	-0,328	M29	834	-0,417	M27	834	-0,401
	M9	810	0,696	M58	836	0,480	M20	827	0,343
	M6	810	0,716	M47	841	0,510	M6	810	0,347
	M5	810	0,724	M3	809	0,598	M47	841	0,506

Var: variable; **Coef:** coefficient

L'axe qui absorbe 19.17% de la diversité totale est corrélé positivement par les marqueurs générés par l'amorce 810 et négativement par les marqueurs des amorces 827, 840 et 812. L'axe (12.52% de la diversité totale) est défini positivement par les marqueurs des amorces 836, 841 et 809 et négativement par les marqueurs des amorces 812, 827 et 834. L'axe 3 : absorbe 9.52% de la variabilité totale. Il est défini positivement par les marqueurs des amorces 827, 810 et 841 et corrélé négativement par les marqueurs des amorces 836 et 834.

La répartition des cultivars étudiés sur le plan engendré par les axes 1 et 2 qui absorbent 31.69% de l'inertie totale, est représentée dans la figure 16. L'analyse de cette figure montre la formation de trois groupes distincts avec le détachement significatif du cultivar Sefri [SF1] originaire de la collection Ahlsouss. On note également un regroupement des cultivars indépendamment de leurs origines géographiques.

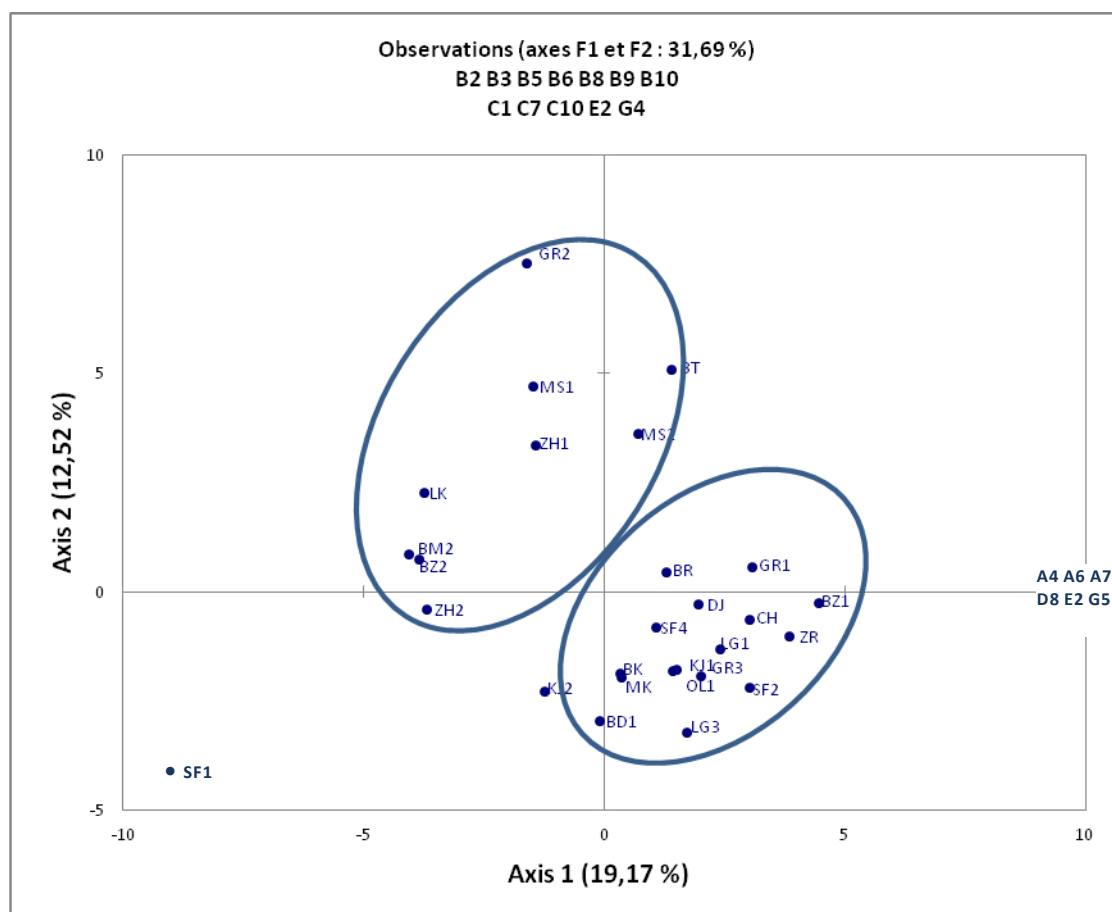


Figure 17: Distribution des cultivars de grenadier dans le plan 1-2 de l'ACP basée sur 61 marqueurs ISSR.

2.4. Paramètres de diversité génétique de Nei

Afin de comprendre la structuration de la diversité génétique des grenadiers, nous avons réparti les cultivars de grenadier étudiés en trois groupes selon leurs origines géographiques (Tableau 17). Par suite, nous avons étudié la distribution du polymorphisme à travers le calcul de certains paramètres notamment l'indice de diversité génétique de Nei (h), l'indice de Shannon, le pourcentage de bande

polymorphe (Tableau 18), la diversité génétique totale (H_t), la diversité génétique pour chaque groupe (H_s), le coefficient de différenciation génétique (G_{st}) de Nei, le flux de gènes (N_m) (Tableau 19).

Tableau 17: Classification des cultivars étudiés en trois groupes selon la répartition géographique.

Groupe	Origine géographique	Cultivars de grenadier
Groupe I	Tmassine-Settat	BK ;MS2;SF4;ZR;LK;BT
Groupe II	Demnat-Bzou	BD1;KJ1;BR ; BZ1 ;LG3 ;LG1 ;GR1 ;GR3 ;MS1
Groupe III	Béni Mellal	BZ2 ;CH;DJ;GR2;KJ2;SF2;MSK;OL1;SF; ZH1;ZH2; BM2

L'estimation de la diversité génétique intra-groupe est résumée dans le tableau 18. Le groupe III montre des valeurs plus élevées de la diversité totale ($h=0,333$), de l'indice de Shannon ($I=0,50$) et du pourcentage de bandes polymorphes ($PBP=95,08\%$), ce qui suggère que les cultivars issus de la région de Béni Mellal (Collection Ahlsouss et la région d'Ouled Abdelah) sont les plus diversifiés génétiquement. Ce groupe est suivi par les cultivars du groupe I de la région Tmassine-Settat. Cependant, le groupe II de la région Demnate-Bzou a enregistré des valeurs faibles ($h=0,302$; $I=0,447$; $PBP=81,97$).

Tableau 18: Paramètres de diversité Intra-groupes de grenadiers.

Groupe	Moyenne h	Moyenne I	PBP
Groupe I	0.321	0.471	83.61
Groupe II	0.302	0.447	81.97
Groupe III	0.333	0.500	95.08
Total	0.357	0.522	

h : indice de diversité génétique de Nei's (1973); **I**: indice de Shannon ; **PBP**: Pourcentage de bandes polymorphes.

Les valeurs de multilocus de la diversité génétique totale (H_t) et (H_s) pour chaque groupe sont de 0.35 et 0.32 respectivement (Tableau 19), ce qui suggère l'existence d'un niveau de polymorphisme élevé. Le coefficient de différenciation génétique entre les groupes (G_{st}) est de 0.08, indiquant que 92% de la variabilité génétique totale est due à la variation intra-groupe et que 8% de cette variabilité est attribuée aux différences entre les groupes. Ainsi les groupes définis selon l'origine géographique présentent une structuration génétique distincte. Le groupe (II-III) possède les valeurs de G_{st} les plus faibles (0.054), il représente par conséquent les groupes les moins différenciés (Figure 18).

Le flux de gènes (N_m) varie de (1.58) pour le groupe I à (3.60) pour le groupe II avec une moyenne de (8.70). Le groupe I présente la valeur de (G_{st}) la plus élevée (0.24) et sa valeur de flux de gènes est la plus faible (1.58), ce groupe est localisé dans l'Ouest du Maroc et éloigné géographiquement des autres groupes.

Tableau 19: Paramètres d'estimation de la diversité génétique intra et inter groupes de grenadier.

Groupe	Nbre de cultivar	PBP (%)	H_t	H_s	G_{st}	N_m
Groupe I	6	83.61	0.30	0.23	0.24	1.58
Groupe II	9	81.97	0.29	0.25	0.12	3.60
Groupe III	12	95.08	0.32	0.27	0.14	2.94
Groupe (I-II)	15	90.16	0.331	0.312	0.058	8.130
Groupe (I-III)	18	100	0.351	0.327	0.069	6.699
Groupe (II- III)	21	96.72	0.336	0.318	0.054	8.728
Globale	27		0.346	0.319	0.079	5.805

H_t : Diversité génétique totale; H_s : Diversité génétique de chaque groupe; G_{st} : Coefficient de différenciation génétique ; N_m : gène flow.

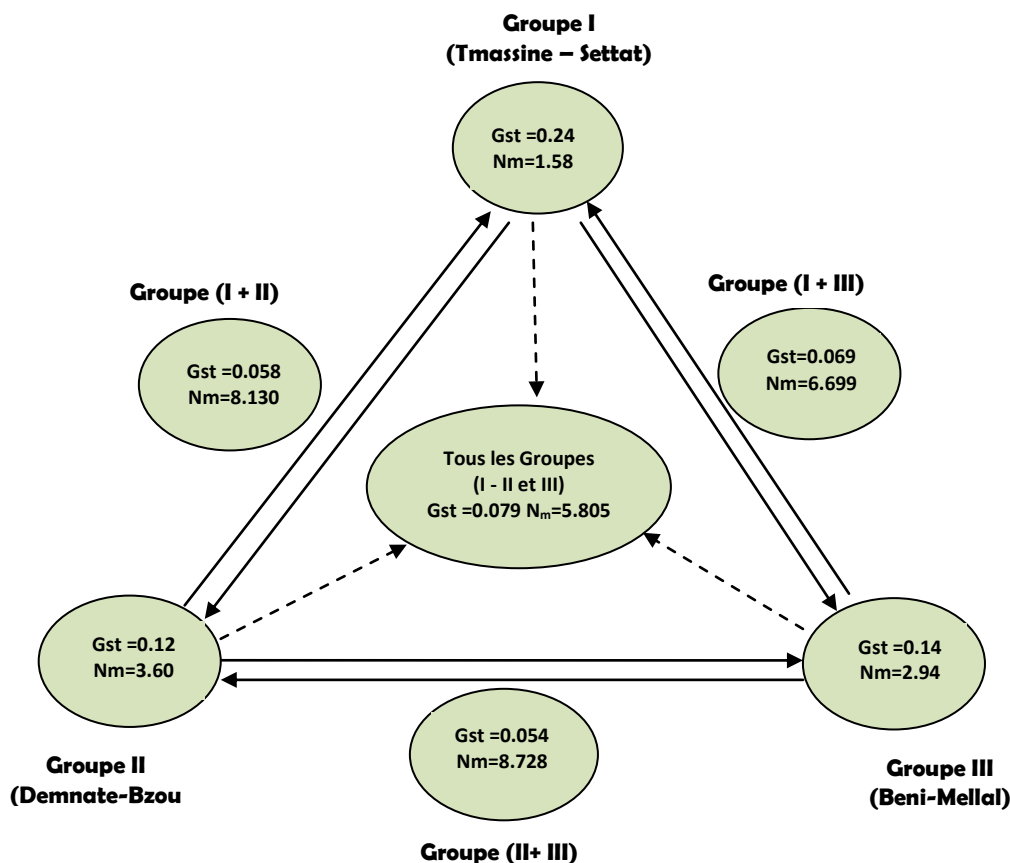


Figure 18: Représentation schématique de la diversité génétique et de la structuration des cultivars étudiés

Pour confirmer ces résultats, on a procédé au calcul des distances génétiques ainsi que l'identité génétique de Nei (Tableau 20).

Tableau 20 : Identités génétiques et distances génétiques entre les groupes de grenadiers (Nei, 1978)

Groupe	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Groupe I	****	0.9444	0.9275
Groupe II	0.0572	****	0.9469
Groupe III	0.0753	0.0546	****

Identités génétiques de Nei (haut de la diagonale) et Distances génétiques (bas de la diagonale).

Les résultats obtenus montrent que la distance génétique la plus faible (0,0546) ainsi que l'identité génétique de Nei la plus grande (0,9469) ont été retrouvées entre le groupe II (Demnat-Bzou) et le groupe III (Béni Mellal) (Tableau 20). Ce résultat suggère que les cultivars du grenadier issus de ces deux groupes sont plus proches génétiquement. Cependant, la distance génétique entre les groupes I et III est la plus importante (0,0753) avec l'identité génétique de Nei la plus faible (0,9275) témoignant que les cultivars issus de la région de Tmassine-Settat et la région de Béni Mellal sont les plus éloignés génétiquement.

L'analyse UPGMA basée sur les distances génétiques de Nei (1978) calculées entre les trois groupes du grenadier confirme le rapprochement génétique des groupes II originaire de la région Demnat-Bzou et III originaire de la région de Béni Mellal et le détachement du groupe I originaire de la région Tmassine-Settat (Figure 19).

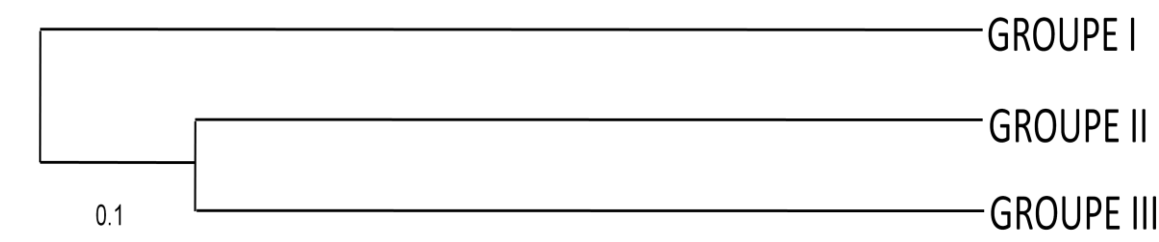


Figure 19 : Dendrogramme UPGMA entre les trois groupes.

3. Analyse des marqueurs spécifiques aux groupes

Dans cette partie du travail, la recherche des marqueurs a été révélée au niveau des groupes géographiquement prédéfinis (Tableau 21).

Tableau 21: Marqueurs ISSR spécifiques révélés selon les groupes géographiques.

Groupe	Nombre de cultivar	Marqueurs spécifiques au groupe de cultivars	Pourcentage des marqueurs spécifiques
Groupe I	6	A4; A6; A7; D2; D3; D4; E1; E3; H8	14,75
Groupe II	9	A4; C2; D3; D8; F2; H8	9,83
Groupe III	12	D3; F2	3,27

Les groupes géographiques considérés présentent un nombre variable des marqueurs spécifiques. En effet, le groupe I de la région de Tmassine-Settat est le plus riche en marqueurs spécifiques et présente un pourcentage de 14,75%. Les autres marqueurs détectés pour ce groupe sont partagés avec le reste des grenadiers. Ce résultat indique une large richesse génétique du grenadier dans cette région. Cependant, les groupes II et III des régions Béni Mellal et Azilal présentent 9,83% et 3,27% respectivement de marqueurs ISSR spécifiques. Le nombre élevé des marqueurs ISSR partagé entre les cultivars peut être expliqué par la présence d'une base génétique commune et que les cultivars étudiés appartiennent à une même population ancestrale de grenadier.

4. Discussion et conclusion

L'exploration des marqueurs ISSR, pour l'étude du polymorphisme génétique de 27 cultivars de grenadier, a montré que l'utilisation de 9 amorces a généré un total de 73 amplimères. Parmi ces amplimères 61 se sont avérés polymorphes avec un pourcentage de bande polymorphe (PBP=83.56%) et un pouvoir résolutif ($R_p=4.12$) suggérant la grande efficacité des amorces testées pour explorer le polymorphisme moléculaire chez le grenadier. Par ailleurs, le nombre total de bandes générées est de 6.78 bandes par amorce. Cette valeur est inférieure à celle obtenue chez 89 génotypes Indiens du grenadier (Narzary *et al.*, 2010) et chez 61 variétés tunisiennes (Bendiaf, 2011). Ainsi, il semble que les oligonucléotides de répétition (GA)₈ contribuent efficacement à la caractérisation et à l'examen de la

diversité génétique des cultivars marocains du grenadier. Des résultats similaires montrent que les répétitions (AG) sont, en général, les répétitions les plus adaptées. Elles sont très abondantes dans les génomes des plantes et révèlent ainsi un polymorphisme plus élevé (Tsumura *et al.*, 1996; Salhi-Hannachi *et al.*, 2004; Ngezahayo *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2007 ; Bendiaf, 2011).

L'estimation des distances génétiques entre les différents cultivars basée sur la formule de Nei et Li (1979) a montrée l'existence d'une importante diversité génétique au niveau des ADNs des cultivars étudiés. Les distances génétiques varient de 0.12 à 1 avec une moyenne de 0.67. Narzary *et al.* (2009a) ont reporté que les distances génétiques des populations Indienne varient de 0.05 à 0.45 avec une moyenne de 0.25. La valeur la plus faible 0.12 a été enregistrée entre Kharaji [KJ1] et Djebali [DJ] suggérant leurs grandes similarités. Ces deux cultivars présentent des fruits de taille moyenne avec des écorces de couleur jaune et des arilles rouges sucrés (Hmid *et al.*, 2013). Cependant, la distance génétique la plus élevée (1) a été enregistrée entre les deux cultivars Sefri [SF1] avec des écorces jaunes et Bzioui [BZ1] avec des écorces rouges. Ce résultat montre que ces cultivars semblent être les plus divergents.

Le dendrogramme de classification UPGMA généré par ces ISSR montre l'existence de deux groupes qui s'opère indépendamment de leurs origines géographiques et de leurs dénominations. Des résultats similaires ont été obtenus en Tunisie par Bendiaf. (2011) à l'aide de 14 amorces ISSR chez 61 cultivars de grenadier et par Jbir *et al.* (2008) moyennant 6 combinaisons d'amorces AFLP chez 34 cultivars de grenadier. En outre, Il est important de signaler que des cultivars ayant les mêmes appellations Kharaji [KJ1] et [KJ2], Zehri [ZH1] et [ZH2] et Grenade Rouge [GR1] et [GR2] se regroupent dans des groupes différents. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de fausses appellations qui peut être avancée ou celle de variétés polyclonales. Ce résultat est en accord avec les travaux de Mars et Marrakchi, 1998 ; Yuan *et al.*, 2008 ; Jbir *et al.*, 2012 ; Moslemi *et al.*, 2010. Ainsi, la topologie du dendrogramme UPGMA obtenu par ISSR suggère une importance variabilité au niveau des ADNs des cultivars considérés dans cette étude. Par ailleurs, l'analyse en composantes principales (ACP) a montré également une

répartition similaire par rapport au résultat de l'UPGMA, à l'exception de détachement significatif du cultivar Sefri [SF1].

L'estimation de la diversité génétique intra-groupe montre que le groupe III est caractérisé par des valeurs plus élevées de la diversité totale ($h=0,333$), de l'indice de Shannon ($I=0,50$) et du pourcentage de bande polymorphe (PBP =95,08%), ce qui suggère que les cultivars issus de la région de Béni Mellal sont les plus diversifiés génétiquement. Ces valeurs sont proches à celles reportées par Narzary et *al.* (2009a) pour le grenadier Indien. En outre, le coefficient de différenciation génétique entre les groupes (G_{st}) est de 0.08 et le flux de gènes (N_m) est de 5.8. Ainsi les groupes définis selon l'origine géographique présentent une structuration génétique distincte. Le groupe (II) qui possède la valeur de G_{st} la plus faible (0.12) et la valeur de (N_m) la plus élevée (3.6) s'est avéré comme le groupe le moins différencié. Ce résultat peut être expliqué par une faible distribution des plants de grenadier qui se trouvent regroupés dans la région de Demnate. Il est possible d'avancer l'hypothèse que les groupes des cultivars peuvent être issus de la même population ancestrale relativement homogène.

Les résultats obtenus ont montré clairement que les marqueurs moléculaires ISSR utilisés au cours de la présente étude, se sont avérés très efficaces en termes de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez le grenadier ainsi que pour l'exploration des relations génétiques entre les cultivars considérés.

Les résultats obtenus au cours de cette partie ont fait l'objet de deux publications dans les deux revues *Biochemical Systematics and Ecology* et revue des régions arides.

- **Ajal E.A.**, Jbir R., Melgarejo P., Hernández F., Haddioui A. et Salhi Hannachi A. 2014. Efficiency of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers for the assessment of genetic diversity of Moroccan pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 24-31.
- **Ajal E.A.**, Jbir R., Melgarejo P., Hernández F., Salhi Hannachi A. et Haddioui A. 2013. Exploration des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme moléculaire du grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc. *Revue des Régions Arides* (In press).

Partie III : Analyse Comparée des données AFLP et ISSR

Afin de conduire des analyses comparatives entre deux jeux de données réalisés sur un même ensemble d'individus, nous avons considéré les données issues des techniques AFLP et ISSR pour mener une analyse conjointe des résultats. Les marqueurs moléculaires ISSR et AFLP considérés ensemble permettent d'explorer des zones différentes du génome et donc de fournir des informations complémentaires quant à la structuration génétique au sein des ressources locales de grenadier et de mieux caractériser et discriminer les cultivars étudiés.

Le matériel végétal utilisé dans cette partie est constitué de 10 cultivars dont 7 cultivars provenant de la collection d'Ahlsouss et 3 cultivars de la région d'Azilal. Dans le tableau 22, nous rapportons la liste ainsi que l'origine de ces cultivars.

Tableau 22: Liste des cultivars de grenadier étudiés par les deux marqueurs AFLP et ISSR.

Cultivar	Code	Origine géographique
Bzou	BZ2	Collection Ahlsouss
Chelfi	CH	Collection Ahlsouss
Djebali	DJ	Collection Ahlsouss
Grenade rouge	GR2	Collection Ahlsouss
Sefri	SF1	Collection Ahlsouss
Zehri d'automne	ZH1	Collection Ahlsouss
Zehri Précoce	ZH2	Collection Ahlsouss
Bouâdime	BD1	Bzou
Kharaji	KJ1	Bzou
Hamed rouge	HM2	Ait Oumghar-Demnat

1. Analyse combinée de la diversité génétique par les deux techniques

Nous avons analysé les données résultantes de l'utilisation simultanée de 6 couples d'amorces AFLP et de 9 amorces ISSR. Les produits PCR amplifiés par les marqueurs AFLP ont permis de générer un total de 369 dont 267 sont polymorphes soit un taux moyen de polymorphisme de 72% (Tableau 23). Le nombre de bandes révélées par combinaison d'amorces varie de 31 pour E_{ACA}/M_{CAG} à 79 pour E_{ACT}/M_{CAT} avec une moyenne de 62 marqueurs par combinaison d'amorce. Le pourcentage de bandes polymorphes (PBP) varie de 58 pour le couple E_{AAC}/M_{CAA} à 84 pour le couple E_{AGC}/M_{CAA} . En outre, l'estimation de la valeur du Rp varie de 15.83 pour E_{ACA}/M_{CAG} à 38.08 pour E_{AAG}/M_{CTT} avec une moyenne de 29.72. D'autre part, toutes les combinaisons d'amorces ont enregistré la même valeur du PIC (0.9). Ce résultat montre que les couples d'amorces utilisées ont été plus informatifs du polymorphisme moléculaire et plus discriminants entre les cultivars étudiés.

Par ailleurs, Les résultats obtenus par les 9 amorces ISSRs ont montré que toutes les amorces testées ont donné des amplimères polymorphes et reproductibles à part l'amorce 825 qui est monomorphe (Tableau 24). Les 8 amorces polymorphes ont permis de révéler 57 bandes polymorphes sur un total de 73 bandes avec une moyenne de 78.08% de polymorphisme. Le nombre total de bandes générées diffère selon les amorces utilisées, elles varient de 3 pour l'amorce 809 et 812 à 11 pour l'amorce 810, avec une moyenne de 6.33 bandes par amorce. De plus l'amorce 810 donne 100% de polymorphisme. En revanche ces résultats montrent que l'amorce 809 contribue le moins dans la discrimination entre les cultivars étudiés avec un taux de polymorphisme de 43% (Tableau 24). Ainsi, tenant compte de chacune des amorces retenues, la valeur moyenne du paramètre du PIC varie de 0,61 à 0,89 avec une moyenne de 0.83.

La comparaison des données obtenues, montre que la technique ISSR est relativement moins informative pour l'étude du polymorphisme moléculaire chez

cette espèce par rapport à la technique AFLP. Cette dernière technique est jugée plus efficace pour générer le plus grand nombre de marqueurs moléculaires.

Tableau 23: Polymorphisme des marqueurs AFLPs révélés chez 10 cultivars de grenadier.

EcoR I/Mse I	Nombre des bandes amplifiées		PBP	Rp	PIC
	Total	Polymorphes			
E_{AGC}/M_{CAA}	67	56	84	30.91	0.90
E_{AAC}/M_{CAA}	59	34	58	35.67	0.90
E_{ACA}/M_{CAG}	31	22	71	15.83	0.90
E_{ACC}/M_{CTA}	60	42	70	21.58	0.90
E_{ACT}/M_{CAT}	79	65	82	36.25	0.89
E_{AAG}/M_{CTT}	73	48	67	38.08	0.90
Total	369	267		178.33	5.39
Moyenne	62	45	72	29.72	0.90

PBP: Pourcentage de bandes polymorphes; **Rp:** Pouvoir résolutif et **PIC:** Contenu Informateur du polymorphisme.

Tableau 24: Polymorphisme des marqueurs ISSRs révélés chez 10 cultivars de grenadier.

Amorces	Séquence 5'-3'	Nombre de bandes		PBP	Rp	PIC
		NTB	NBP			
809	(AG) ₈ G	7	3	43	0.5	0.61
810	(GA) ₈ T	11	11	100	5.43	0.88
812	(GA) ₈ A	5	3	60	1.93	0.89
827	(AC) ₈ G	11	10	91	3.97	0.88
834	(AG) ₈ YT	8	7	87	1.71	0.87
836	(AG) ₈ YA	10	9	90	2.28	0.83
840	(GA) ₈ YT	13	10	90	6.14	0.89
841	(GA) ₈ YC	5	4	80	0.78	0.76
825	(AC) ₈ T	3	0	-	-	-
Total		73	57		22.74	6.61
Moyenne		8.11	6.33	78.08	2.84	0.83

NTB: Nombre total de bandes; **NBP:** Nombre de bandes polymorphes; **PBP:** Pourcentage de bandes polymorphes ; **Rp:** Pouvoir de résolutif.

2. Comparaison de la structuration génétique des cultivars étudiés au moyen des marqueurs AFLP et ISSR

Dans le but de comprendre la structuration et les relations génétiques entre les cultivars étudiés, nous avons exploité l'ensemble des données obtenues par les 2 marqueurs AFLP et ISSR séparément et conjointement.

2.1. Structuration génétique par la technique AFLP

2.1.1. Distances génétiques

L'exploration de la matrice binaire issue des marqueurs AFLPs a permis d'estimer les distances génétique entre les 10 cultivars selon la formule de NEI et LI (1979) (Tableau 25). Ces distances génétiques mettent en évidence une variabilité qui varie de 0.22 entre les cultivars Bouâdime [BD1] et Kharaji [KJ1] génétiquement les plus rapprochés et partageant un grand nombre de marqueurs

moléculaires communs à 0.70 entre les deux cultivars Hamed rouge [HM2] et Zehri précoce [ZH2] qui sont très diversifiés.

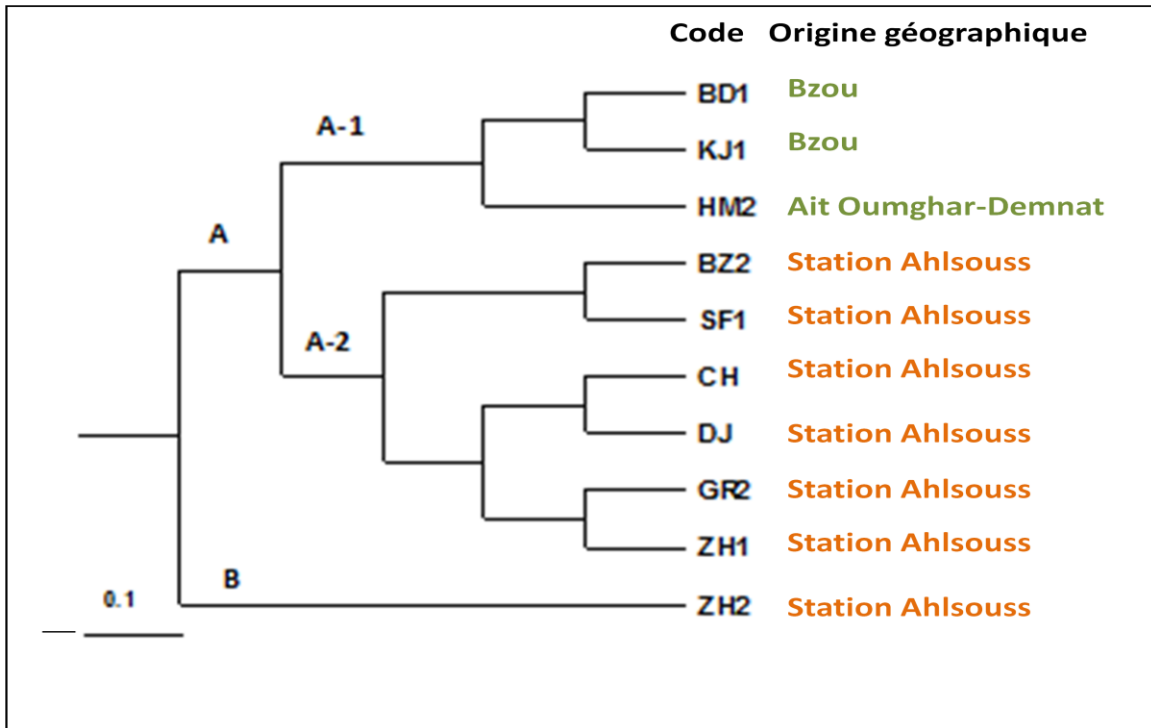
2.1.2. Dendrogramme de classification hiérarchique

Le dendrogramme UPGMA, généré à partir des marqueurs AFLP a montré la formation de deux groupes (Figure 20). Le premier groupe (B) est formé par un seul cultivar Zehri Précoce [ZH2], indiquant ainsi sa divergence génétique. Quant au deuxième groupe (A), il regroupe tous les autres cultivars. Ce deuxième groupe peut être subdivisé en deux sous groupes notés A1 et A2. Le groupe A1 est représenté par les trois cultivars originaires de la région d'Azilal (BD1, KJ1 et HM2). Les cultivars Bouâdime [BD1] et Kharaji [KJ1] sont les plus rapprochés, ce qui montre qu'ils présentent le plus grand nombre de marqueurs moléculaires communs. Cependant les 6 autres cultivars originaires de la collection d'Ahlsoous (BZ2, SF1, CH, DJ, GR2 et ZH1) forment le deuxième sous groupe A2. On note que la topologie de ce dendrogramme montre un regroupement des cultivars en fonction de l'origine géographique.

Tableau 25 : Distances génétiques calculées pour 10 cultivars de grenadier au moyen des marqueurs AFLP selon la formule NEI et Li (1979).

Cultivars	Dj	CH	ZH1	GR2	BZ2	SF1	ZH2	KJ1	BD1	HM2
Dj	0.00									
CH	0.26	0.00								
ZH1	0.37	0.32	0.00							
GR2	0.32	0.27	0.27	0.00						
BZ2	0.39	0.39	0.42	0.41	0.00					
SF1	0.38	0.40	0.42	0.42	0.28	0.00				
ZH2	0.35	0.45	0.51	0.53	0.50	0.56	0.00			
KJ1	0.50	0.46	0.42	0.44	0.47	0.51	0.66	0.00		
BD1	0.49	0.42	0.39	0.44	0.51	0.53	0.63	0.22	0.00	
HM2	0.45	0.47	0.39	0.34	0.54	0.56	0.70	0.27	0.30	0.00

AFLP



ISSR

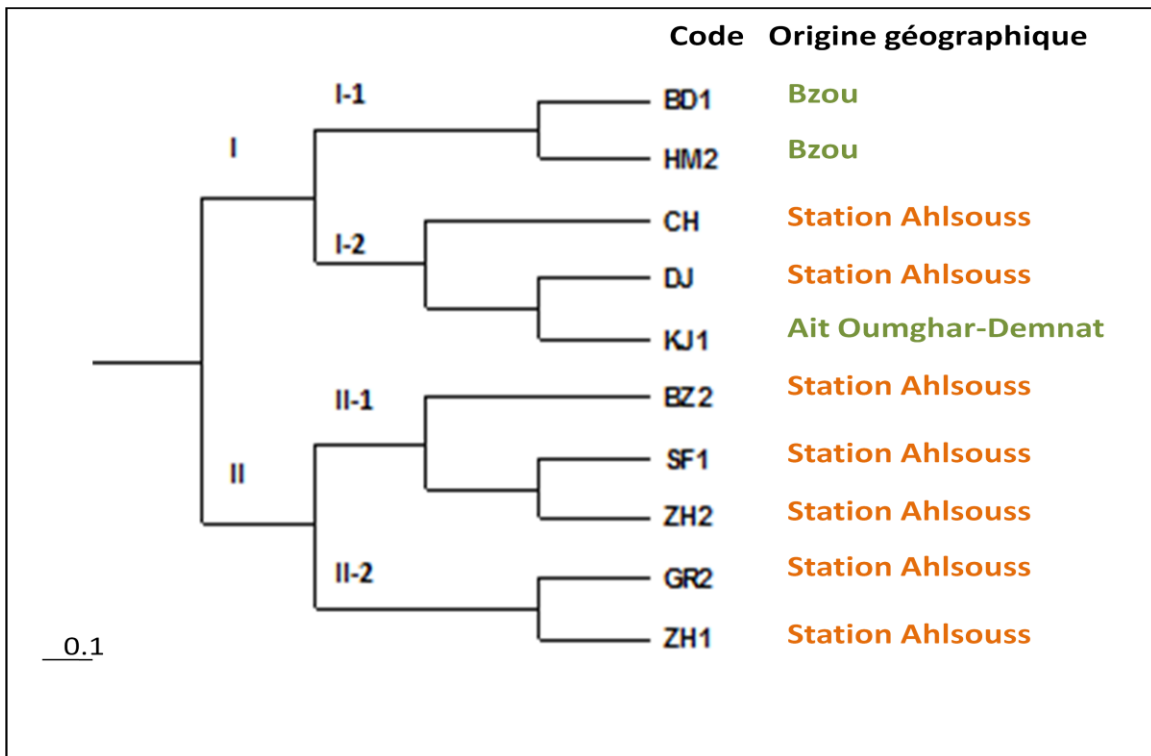


Figure 20 : Dendrogramme UPGMA de 10 cultivars de grenadier sur la bases des marqueurs AFLP et ISSR.

2.2. Structuration génétique par la technique ISSR

2.2.1. Distances génétiques

L'analyse du tableau des distances génétiques calculées en utilisant les marqueurs ISSR montre des valeurs qui varient de (0.13) entre les cultivars Kharaji [KJ1] et Djebali [DJ] à (1.00) entre les cultivars Sefri [SF1] et Chelfi [CH] avec une moyenne de 0,56, témoignant de la présence de grandes divergences moléculaires et génétiques (Tableau 26).

2.2.2. Dendrogramme de classification hiérarchique

Le dendrogramme établi sur la base des distances génétiques de Nei et Li (1979) présente une structure en deux groupes I et II (Figure 20). Le premier groupe (I) est subdivisé en deux sous groupes (I-1) et (I-2), dont (I-1) renferme les deux cultivars Bouâdime [BD1] et Hamd rouge [HM2] et le (I-2) rassemble les cultivars Chelfi [CH]; Djebali [DJ] et Kharaji [KJ1]. Le deuxième groupe (II) est subdivisé en deux sous groupes, le premier sous groupe (II-1) est composé des cultivars Zehri précoce [ZH2, Sefri [SF1] et Bzou [BZ2]. Les deux cultivars Grenade rouge [GR2] et Zehri d'automne [ZH1] sont regroupés dans le sous-groupe (II-2). La topologie du dendrogramme UPGMA suggère la présence d'une importante variabilité au niveau des ADN des cultivars considérés dans cette étude. Il est important de signaler que les cultivars ayant les mêmes appellations Zehri [ZH1] et [ZH2] se dispersent dans des groupes différents les uns par rapport les autres. Ce résultat soutient l'hypothèse de fausses appellations qui peut être avancée ou celle de variétés polyclonales.

Tableau 26: Distances génétiques calculées pour 10 cultivars de grenadier analysés au moyen des marqueurs ISSR.

Cultivars	BD1	BZ2	CH	DJ	GR2	KJ1	HM3	SF1	ZH1	ZH2
BD1	0.00									
BZ2	0.51	0.00								
CH	0.56	0.53	0.00							
DJ	0.51	0.48	0.19	0.00						
GR2	0.76	0.48	0.73	0.48	0.00					
KJ1	0.42	0.51	0.30	0.13	0.63	0.00				
HM3	0.32	0.56	0.51	0.40	0.84	0.37	0.00			
SF1	0.66	0.35	1.00	0.76	0.84	0.73	0.80	0.00		
ZH1	0.53	0.45	0.51	0.45	0.45	0.59	0.48	0.59	0.00	
ZH2	0.37	0.30	0.63	0.45	0.56	0.42	0.48	0.23	0.32	0.00

2.3. Dendrogramme de classification hiérarchique issu des données combinées AFLP et ISSR

2.3.1. Distances génétiques

L'exploration des données issues des marqueurs AFLP et ISSR, nous a permis de générer un total 324 amplimères polymorphes, soit 267 marqueurs AFLP et 57 marqueurs ISSR. Ces derniers ont été exploités pour estimer les distances génétiques entre les différents cultivars étudiés. Les résultats obtenus montrent que les distances génétiques varient de 0.25 jusqu'à 0.66 (Tableau 27). Ce résultat témoigne de l'existence d'une diversité génétique assez élevée des cultivars étudiés. La plus faible distance génétique (0.25) a été enregistrée entre le cultivar Bouâdime [BD1] et Kharaji [KJ1] d'origine de Bzou d'une part et Chelfi [CH] et Djebali [DJ] d'origine de la collection d'Ahlouss d'autre part, traduisant l'existence de grandes similitudes entre ces cultivars. La distance la plus élevée (0.66) a été obtenue entre les deux cultivars Zehri Précoce [ZH2] et Hamed rouge [HM2], suggérant que ces deux cultivars sont caractérisés par le maximum de divergence.

2.3.2. Dendrogramme de classification hiérarchique

Le dendrogramme basé sur les distances génétiques est illustré dans la figure 21. L'analyse de ce dendrogramme montre que les cultivars étudiés sont répartis sur deux groupes. Le premier groupe (A) est composé de trois cultivars originaires de la région d'Azilal : Bouâdime [BD1], Kharaji [KJ1] et Hamed rouge [HM2]. Quant au deuxième groupe (B), il regroupe les 7 cultivars originaires de la collection d'Ahlsouss. Le deuxième groupe (B) est lui-même composé de deux sous groupes dont un est composé du cultivar Zehri Précoc [ZH2] et le deuxième rassemblant les 6 autres cultivars. La topologie du dendrogramme montre bien un regroupement des cultivars en fonction de l'origine géographique. Ce regroupement en fonction de l'origine géographique rappelle celui obtenu par les marqueurs AFLP pris séparément.

Tableau 27: Distances génétiques calculées pour 10 cultivars de grenadier au moyen d'une analyse conjointe par des marqueurs AFLP et ISSR.

Cultivars	Dj	CH	ZH1	GR2	BZ2	SF1	ZH2	KJ1	BD1	HM2
Dj	0.00									
CH	0.25	0.00								
ZH1	0.38	0.35	0.00							
GR2	0.34	0.34	0.30	0.00						
BZ2	0.40	0.41	0.42	0.42	0.00					
SF1	0.44	0.48	0.45	0.48	0.29	0.00				
ZH2	0.36	0.48	0.47	0.54	0.46	0.50	0.00			
KJ1	0.42	0.43	0.45	0.47	0.48	0.55	0.61	0.00		
BD1	0.49	0.45	0.42	0.48	0.51	0.55	0.58	0.25	0.00	
HM2	0.44	0.48	0.40	0.41	0.55	0.60	0.66	0.29	0.31	0.00

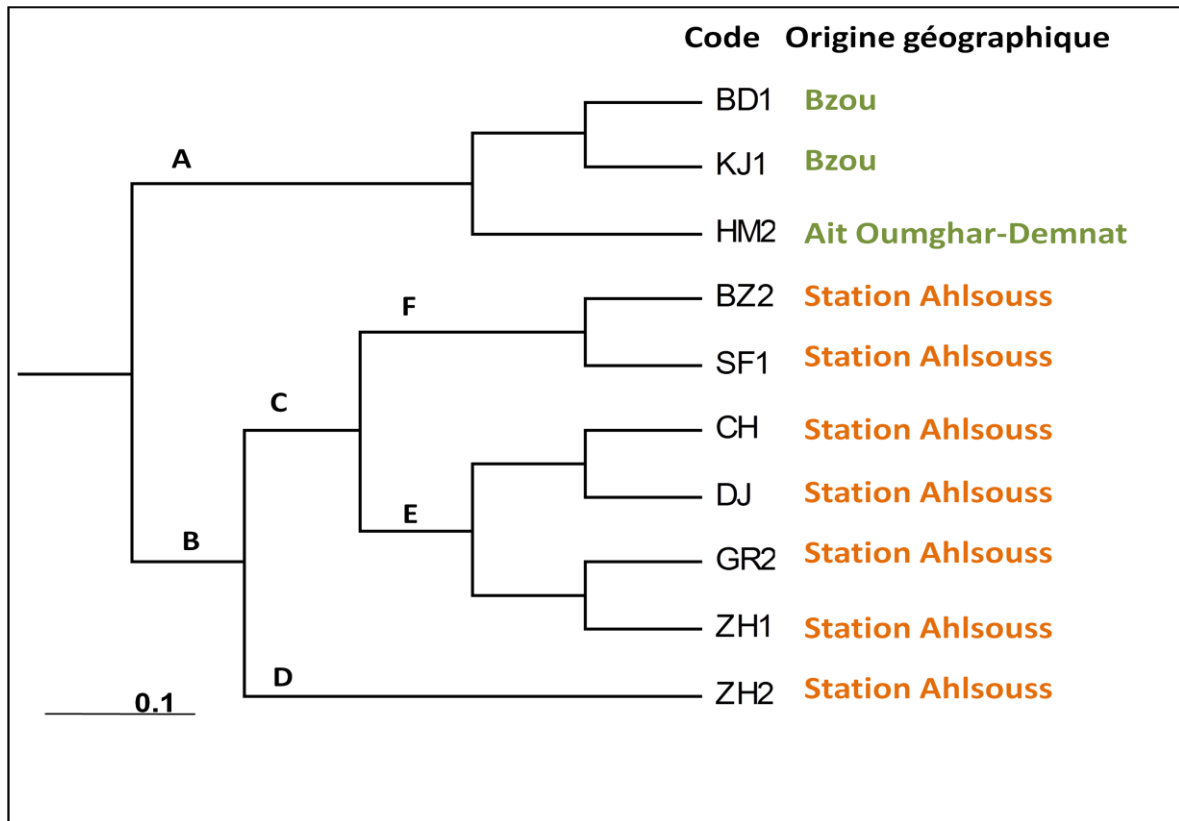


Figure 21: Dendrogramme UPGMA de 10 cultivars de grenadier sur la base d'une analyse conjointe par des marqueurs AFLP et ISSR.

3. Test de corrélation entre des distances génétiques

La corrélation entre la matrice des distances génétiques (AFLP) et la matrice des distances génétiques (ISSR) a été calculée par le test de Mantel sur la base de 1000 permutations. La valeur de la probabilité calculée « p-value » est 0.240, reflète l'absence de corrélation significative entre les deux distances au seuil de $p < 5\%$. Ce faible niveau de corrélation peut être le résultat d'une part de la différence entre le nombre de bandes générées par les marqueurs AFLP et ISSR et d'autre part, par une différence de distribution génomique de ces deux types de marqueurs pour le grenadier Marocain.

4. Discussion et conclusion

L'exploitation des marqueurs AFLP a révélé un pourcentage des bandes polymorphes moyen (PBP=72%). Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Moslemi *et al.* (2010) chez 67 génotypes de grenadier Iraniens (PBP= 54.13%). Cependant, elle est inférieure à celles obtenues par Jbir *et al.* (2008) chez 34 génotypes Tunisiens (94,7%) et Yuan *et al.* (2007) chez 85 génotypes Chinois (73,26%). Ce résultat montre bien que l'approche AFLP est très efficace pour la mise en évidence du polymorphisme chez les cultivars Marocain du grenadier. Pour l'exploration des marqueurs ISSR un total de 73 amplimères a été enregistré avec un pourcentage des bandes polymorphes moyen (PBP) de 78.08% par amorces. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par Narzary *et al.* (2010) chez 89 génotypes Indiens du grenadier. Le nombre de bandes polymorphes obtenu par les marqueurs ISSR est nettement inférieur à celui obtenu par les marqueurs AFLP.

L'analyse combiné des marqueurs AFLP et ISSR a montré un dendrogramme UPGMA qui est similaire à celui obtenu par les marqueurs AFLP pris séparément. En plus, Leurs topologies indiquent que l'analyse combinée a permis un regroupement des cultivars en fonction de leurs origines géographiques. Ces résultats obtenus révèlent l'importance de l'analyse combinée des deux types de marqueurs dans l'analyse de la diversité génétique des cultivars marocains du grenadier.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

L'étude présentée au cours de ce travail a porté sur la caractérisation du patrimoine local marocain du grenadier. Elle a pour ambition de participer à une dynamique de gestion et de conservation d'un patrimoine très riche et exposé à une érosion génétique. Dans ce sens, le regain d'intérêt que suscite actuellement la culture du grenadier et la mise en valeur de ses produits devrait aller de paire avec la mise en place d'un programme nationale visant la caractérisation de la diversité génétique de cette espèce au niveau des principales zones de production. Il s'agit en effet d'une étape clef qui devrait déboucher sur la mise en place des collections variétales regroupant les principaux génotypes locaux identifiés et caractérisés génétiquement.

Ainsi, le présent travail constitue une contribution à ce programme à travers la mise en valeur du potentiel des techniques de marquage moléculaire à l'aide des marqueurs AFLP et ISSR pour la caractérisation de la diversité génétique du grenadier au Maroc.

La première partie du travail réalisé a été basée sur la caractérisation moléculaire des cultivars étudiés à l'aide de marqueurs AFLP permettant ainsi leur identification, la recherche des marqueurs les plus informatifs et l'analyse des relations phylogénétiques entre les cultivars et avec les sites d'origines. Les 24 cultivars analysés à l'aide de 6 combinaisons d'amorces AFLP, ont permis d'identifier 519 marqueurs dont 386 polymorphes, avec un pourcentage moyen de bandes polymorphes de 71%. Cette valeur est proche de celle obtenue par Yuan et al. (2007) chez le grenadier en Chine (73.26%) et supérieure à celles obtenues chez le grenadier Iranien par (Moslemi *et al.*, 2010 ; Sarkhosh *et al.*, 2011) (54.13% et 38.99%). Cependant, elle reste inférieure aux valeurs (94.70% et 91.40%) obtenues chez le grenadier Tunisien et Jordanien (Jbir *et al.*, 2008; Awamleh *et al.*, 2009). Notre résultat reflète l'existence d'une diversité plus grande et plus large malgré le nombre limité d'amorces. En effet, l'efficacité de la technique est d'autant plus importante, si le nombre de marqueurs générés est plus grand voir le nombre de couples d'amorces testées est plus grand (Morgante et Olivieri, 1993). Par ailleurs, l'exploitation des données AFLP grâce à des méthodes appropriées d'analyses

statistiques, a permis d'explorer des relations génétiques entre les cultivars étudiés. D'autre part, les paramètres $R_p=24.84$, $PBP=71\%$ et $PIC=0.95$ obtenus, témoignent de l'efficacité de l'ensemble des combinaisons d'amorces utilisées, ainsi que leur fiabilité pour l'estimation de la diversité génétique du grenadier. L'utilisation de ces marqueurs AFLPs a montré une efficacité similaire à celle révélée chez le grenadier jordanien par Awamleh et al. (2009) et le grenadier originaire de la Turquie par Ercisli et al. (2011).

La topologie du dendrogramme UPGMA résultant des marqueurs AFLP a montré une importante variabilité non structurée qui apparaît sous forme d'un continuum. En effet, des cultivars de même appellation Sefri [SF1] et [SF2]; [HM1] et [HM2] sont éloignées génétiquement alors que des cultivars d'appellation différente Bouâdime Bzou [BM1] et Kharaji Bzou [KB]; Ruby [RB1] et Papenschell [PP1] sont regroupées. Le regroupement des cultivars étudiés se fait indépendamment de leurs origines géographiques et de leurs dénominations locales. De même, l'analyse en composante principale (ACP) confirme la classification obtenue par la méthode UPGMA. En effet, les distances géographiques ne sont pas corrélées aux distances génétiques. Ces résultats peuvent être expliqués par des problèmes de synonymie et d'homonymie, puisque les cultivars sont localement appelés selon leurs origines géographiques ou selon les paramètres de leurs fruits comme la couleur, la taille, le jus, les graines et le goût. Cette structuration génétique est en faveur de l'hypothèse d'une base génétique commune.

Dans une autre étape, nous avons analysé la diversité génétique des groupes que nous avons définis selon l'origine géographique. La valeur du coefficient de différenciation génétique ($G_{st}=0.091$) indique une différenciation génétique inter-groupe de 9%. Ce niveau de différenciation génétique est inférieur à ceux cités dans d'autres études du grenadier. En Chine, Yuan et al. (2007), ont montré que 20,81% de la variabilité totale de 85 géotypes de grenadier est due à la variabilité inter-population. De même, Jbir et al. (2008) ont reporté que 23% de la diversité globale du grenadier en Tunisie est due à la différenciation inter-groupe. Le faible polymorphisme inter-groupe obtenu dans notre travail peut être expliqué

par l'hypothèse selon la quelle notre germoplasme appartient à une seule population ancestrale de grenadier.

Pour le nombre de migrants efficace ($N_m=2.66$) obtenu au cours de ce travail est supérieure à ceux obtenus par Yuan et al. (2007) et Jbir et al. (2008) chez le grenadier Chinois et Tunisiens ($N_m=1,90$ et $N_m=2,26$, respectivement). Ce résultat peut être expliqué par des pratiques culturelles basées essentiellement sur la multiplication végétative. En effet, le mode de propagation végétative et l'échange génétique important entre les différents groupes de grenadier permettent une explication à ce résultat et mettent en évidence le flux de gènes très élevé. L'ensemble des résultats obtenus suggère que l'efficacité des marqueurs AFLP dans l'analyse de la diversité génétique chez le grenadier est importante.

La deuxième partie de notre travail a été basée sur l'exploration des marqueurs ISSR. L'utilisation de 9 amorces a généré un total de 73 fragments dont 61 sont polymorphes avec un pourcentage de bande polymorphe (PBP=83.56%). Les valeurs élevées du pouvoir résolutif ($R_p=4.12$) et le contenu informationnel du polymorphisme (PIC=0.93), suggèrent la grande efficacité des amorces testées pour explorer le polymorphisme moléculaire chez le grenadier marocain. Ainsi, les amorces qui présentent une séquence de répétition $(GA)_8$ contribuent efficacement dans la différenciation des cultivars étudiés.

L'estimation des distances génétiques entre les différents cultivars basée sur la formule de Nei et Li (1979) a montré l'existence d'une importante diversité génétique des cultivars étudiés. La distance génétique la plus faible (0.12) a été enregistrée entre Kharaji [KJ1] et Djebali [DJ] suggérant leurs grandes similarités. En effet, ces deux cultivars présentent des fruits de taille moyenne avec des écorces de couleur jaune et des arilles rouges sucrés. Cependant, la distance génétique la plus élevée (1) a été enregistrée entre les deux cultivars Sefri [SF1] avec des écorces jaunes et Bzioui [BZ1] avec des écorces rouges. Ce résultat montre que ces cultivars semblent être les plus divergents.

Le dendrogramme de classification montre l'existence de deux groupes qui se distinguent indépendamment de leurs origines géographiques. Ceci consolide les résultats obtenus par les marqueurs AFLP. En outre, Il est important de signaler que des cultivars ayant les mêmes appellations Kharaji [KJ1] et [KJ2], Zehri [ZH1] et [ZH2] et Grenade Rouge [GR1] et [GR2] se regroupent dans des groupes différents. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de fausses appellations qui peut être avancée ou celle de variétés polyclonales. Par ailleurs, l'analyse en composantes principales (ACP) a montré également une répartition similaire par rapport au résultat de l'UPGMA. Pour élucider la structuration de la diversité génétique des grenadiers, les cultivars étudiés ont été répartis en trois groupes selon leurs origines géographiques. L'estimation de la variabilité intra-groupe a montré que le groupe III formé par les cultivars originaires de la région de Béni Mellal, est le groupe qui présente les valeurs les plus élevées de la diversité total ($h=0,333$), de l'indice de Shannon ($I=0,50$) et du pourcentage de bande polymorphe (PBP=95,08%), ce qui suggère que ces cultivars sont les plus diversifiés génétiquement. Par contre, le groupe (II) composé par les cultivars de la région de Demnate et qui possède la valeur de (G_{st}) la plus faible (0.12) et la valeur de (N_m) la plus élevée (3.6), est le moins différencié. Ce résultat peut être expliqué par une faible distribution des plants de grenadier qui se trouvent regroupés. Il est possible d'avancer l'hypothèse que les groupes des cultivars peuvent être issus de la même population ancestrale relativement homogène. Le niveau de polymorphisme est significatif et suggère que les groupes de grenadier marocain ont une diversité génétique importante. Les résultats obtenus ont montré clairement que les marqueurs moléculaires ISSR utilisés au cours de la présente étude, se sont avérés très efficaces en termes de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez le grenadier ainsi que pour l'exploration des relations génétiques entre les cultivars considérés.

L'analyse combiné des marqueurs AFLP et ISSR a permis de construire un dendrogramme UPGMA similaire à celui obtenu par les marqueurs AFLP pris séparément. Par ailleurs, leurs topologies indiquent des regroupements des cultivars selon l'origine géographique.

En conclusion, un haut niveau de polymorphisme a été observé aussi bien à l'échelle des combinaisons d'amorces AFLP qu'à l'échelle des amorces ISSR. Par conséquent, nous suggérons que les cultivars étudiés constituent un patrimoine génétique riche et diversifié très utile pour les programmes futurs de sélection assistée.

Perspectives du travail

Les analyses de la diversité génétique entreprise à l'aide des marqueurs moléculaires AFLPs et ISSRs ont montré une forte variabilité des cultivars marocains du grenadier. L'ensemble des résultats recueillis à partir de ces analyses, peuvent être utilisés pour définir une stratégie d'amélioration et de gestion des ressources génétiques de cette espèce. Pour compléter ces résultats, nos recherches doivent être poursuivies par :

- Une étude plus exhaustive, englobant des cultivars d'autres régions au Maroc, pour mieux cerner la gamme de la variabilité de cette espèce.

- Une analyse des caractères morphologiques et agronomiques d'intérêt chez cette espèce et de continuer l'étude du polymorphisme génétique par d'autres types de marqueurs comme les marqueurs (SSR, SNP...).

- Elaboration des relations entre les marqueurs moléculaires et agronomiques d'intérêt.

- Etude du polymorphisme des marqueurs SSRs chloroplastiques pour tracer une carte géographique de la domestication de cette espèce dans notre pays.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbasi H., Rezaei K. et Rashidi L. 2008. Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. J. Am. Oil Chem. Soc.85: 83–89

Al Khalifa A. et Dilshad S. 1998. Third Saudi symposium on food and nutrition. Riyadh. Saudi Arabia. 10: 26-29.

Al-Maiman S.A. et Ahmad D. 2002. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. Food Chem. 76: 437-441.

Al-Zoreky N.S. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. Int. J. Food Microbiol. 134: 244-248.

Amorós A., Melgarejo P., Martinez J.J., Hernandez F. et Martinez M. 2000. Characterization of the fruit of five pomegranate (*Punica granatum* L.) clones cultivated in homogeneous soils. Opt Méditer. Ser. A. 42: 129-135.

Amouretti M.C. et Comet G. 1992. Cahier d'histoire des techniques des hommes et des plantes: plantes méditerranéennes, vocabulaire et usages anciens. Publications de l'université de Provence. 81-174.

APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141: 399–436.

Awamleh H., Hassawi D., Migdadi H. et Brake M. 2009. Molecular characterization of pomegranate *Punica granatum* L. landraces grown in Jordan using Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. Biotechnology 8: 316-322.

B

Balasundram N., Sundram K. et Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99: 191-203.

Barone E., Caruso T., Mara F.P. et Sottile F. 2001. Preliminary observations on some sicilian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. J. Am. Pomol. Soc. 55: 4-7.

Basu A. et Penugonda K. 2009. Pomegranate juice: a heart healthy fruit juice. Nutr. Rev. 67: 9-56.

Behzadi Shahrabaki H. 1998. Genetic diversity of pomegranate genotypes in Iran. Nashr Amoozesh Keshavarzi, Tehran, Iran, p 265.

Ben-Arie R. et Or E. 1986. The development and control of husk scald on 'Wonderful' pomegranate fruit during storage. J. Am. Soc. Hort. Sci. 111: 395-399.

Bendiaf A. 2011. Etude de la diversité génétique des cultivars Tunisiens de grenadier (

Bendiaf A. 2011. Etude de la diversité génétique des cultivars Tunisiens de grenadier

(*Punica granatum* L.) par les marqueurs moléculaire ISSR. Diplôme d'études approfondies. Université Tunis El Manar II

Bennett M.D. et Leitch I.J. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Ann. Bot.* 95: 45-90.

Berckman J.S. et Soller M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio. Tech.* 8: 930-932.

Bernhard R. et Boulbria J. 1985. L'évolution des variétés de pommier au cours des derniers siècles. Communication dans un volume d'actes édité - BMAK Symposium; 1984, France.

Borochoy-Neori H., Judeinstein S., Tripler E. et Harari M. 2009. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *J. Food Comp. Anal.* 22: 189-195.

Botstein D., White R.L., Skolnick M. et Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genetics* 32: 314-331.

Boullard B. 2001. Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Editions Estem. 636: 437-438.

Boussetta T., Raad H., Letteron P., Gougerot-Pocidallo M.A., Marie J.C. et Driss F. 2009. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNF α -induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One* 4: 6458.

C

Caliskan O. et Bayazit S. 2013. Morpho-pomological and Chemical Diversity of Pomegranate Accessions Grown in Eastern Mediterranean Region of Turkey. *J. Agri. Sci. Tech.* 15:1449-1460.

Cerda B., Llorach R., Cerón J.J., Espín J.C. et Tomàs-Barberà F.A. 2003. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur. J. Nutr.* 42:18-28.

Chahidi B., El-Otmani M., Luro F., Srairi I. et Tijane M. 2008. Changes of fruit quality traits in 7 clementine selections during maturation. *Agri. Food. Chem.* 7: 2565-2577.

Chandra R. et Meshram D.T. 2010. Pomegranate culture in Deccan plateau of India. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. *Fruit Veg. Cereal Sci. Biotech.* 2: 113-119.

Chandra R. et Jadhav V.T. 2009. Pomegranate research and development in India and future thrusts. In: Dhole, S. (Ed.), Preparation for the Sources of the 2nd Green Revolution in Indian Agriculture, Vol. II, 1st Edn. Magnum Foundation, Nagpur, Maharashtra, pp. 39-44.

Chandra R., Jadhav V.T. et Sharma J. 2010b. Global scenario of pomegranate (*Punica granatum* L.) culture with special reference to India. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotech. 2: 7-18.

Chaudhari, S.M. and Desai, U.T. (1993). Effects of plant growth regulators on flower sex in pomegranate (*Punica granatum* L.). Indian J. Agri. Sci. 63 : 34-35.

Chkioua. 2008. Influence du mode d'irrigation sur la maturation et la qualité organoleptique du fruit de grenadier (*Punica granatum* L.). Diplôme d'études approfondies. Université Tunis El Manar II.

Ciaraldi M. 1999. The economy of plant resources of the early Bronze Age settlement of Pratola Serra (Avellino, southern Italy), In: L'eruzione Vesuviana delle "Pomici di Avellino" la facies di Palma Campania (Bronzo antico), (sous la direction de Claude Albore Livadie), Bari. 149-155.

D

Damiani E., Aloia A.M., Priore M.G., Nardulli S. et Ferrannini A. 2009. Pomegranate (*Punica granatum* L.) allergy: clinical and immunological findings. Ann. Allergy Asthma Immunol. 103:178–180.

De Vienne D. 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. 2ème ed. INRA, Paris, 200 p.

Dell'Agli M., Galli G.V., Corbett Y., Taramelli D., Lucantoni L., Habluetzel A., Maschi O., Caruso D., Giavarini F., Romeo S., Bhattacharya D. et Bosisio E. 2009. Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. J. Ethnopharmacol. 125: 279–285.

Després L., Gielly L., Redoutet B. et Taberlet P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. Mol. Phylogen. Evol. 27: 185-196.

Dhouibi M.M., 1992. Effet de la bactospeme XLV sur la pyrale des dates *Ectomyelois ceratonia* Zeller (Lepidoptère: Pyralidae) Med. Fac. Landbouww. Univ.Gent. 557. 2b: 505-514.

E

Eikani M., Golmohammad T. et Homami S. 2012. Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane. Food Bioprod Process. 90: 32-36.

Elfalleh W., Nasri N., Sarrai N., Gasmi F., Marzougui N. et Ferchichi A. 2010. Storage proteins contents and morphological characters of some Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. Acta Bot. Gallica 157: 401-409.

Elfalleh W., Tlili N., Nasri N., Yahia Y., Hannachi H., Chaira N., Ying M. et Ferchichi A. 2011. Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits. J. Food. Sci. 76: 707-713.

Elhoumaizi M.A., Panchanoor S.D., Jinggaui F. et Chao C.C.T. 2006. Confirmation of "Medjool" date as a Landrace Variety through genetic analysis of 'Medjool' accessions in Morocco. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131: 403-407.

Ercisli S., Gadze J., Agar G., Yildirim N. et Hizarci Y. 2011. Genetic relationships among wild pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes from Coruh Valley in Turkey. *Genet. Mol Res.* 10: 459-464.

Evreinoff V.A. 1949. Le grenadier. *Fruit d'Outre-Mer*, v 4 (5) p 161-170.

F

Fadavi A., Barzegar M., Azizi M.H. et Bayat M. 2005. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food. Sci. Tech. Inter.* 11: 113-119.

Fakhour S. 2012. Contrôle intégré d'Aphis punicae Passerini en grenadier dans la région du Tadla (Maroc). International Symposium on the Pomegranate, in the Mediterranean Region: CIHEAM-IAMZ, Zaragoza

FAO. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Faria A. et Calhau C. 2011. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 51: 626-634.

Felsenstein J. 1995. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) version 3,5 c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington.

Fischer U.A., Carle R. et Kammerer D.R. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food. Chem.* 127: 807-821.

Frison E.A. et Servinsky J. 1995. Directory of European Institutions Holding Crop Genetic Resources Collections. *Int. Plant Genet. Resour. Inst.* Vol 1, 4th Edn.

G

Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J. et Galigari P.D.S. 1999. Developing and appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics.* 98: 1125-1131.

Godet F., Rogowsky P., Taylor C., Weining S. et Langridge P. 1991. Cloning and characterisation of a new rye-specific repeat sequence. *Genome* 34: 81-87.

Guarino L., Miller T., Baazara M. et Obadi N. 1990. Socotra: the island of Bliss revisited. *Diversity.* 6: 28-31.

Guo C.J., Yang J.J., Wei J.Y., Li Y.F., Xu J. et Jiang Y.G. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Research* 23:1719-1726.

Gupta P.K. et Varshney R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163–185.

H

Haddioui A. 2012. La culture du grenadier (*Punica granatum* L.) au Maroc. International Symposium on the Pomegranate, in the Mediterranean Region: CIHEAM-IAMZ, Zaragoza

Handaji N., Benyahia H., Gaboun F., Ibriz M. 2012. Caractérisation de la diversité génétique du germoplasme de mandarines par les ISSR. *J. Appl. Biosci.* 7: 4186–4197.

Hardy H., Balick M. et Schierwater B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*. 1: 55-64.

Hasnaoui N. 2003. Analyse de la diversité génétique chez le grenadier (*Punica granatum* L.). Diplôme d'études approfondies. Université Tunis El Manar II.

Hasnaoui N., Buonamici A., Sebastian F., Mars M., Trifi M. et Vendramin G.G. 2010b. Development and characterization of SSR markers for pomegranate (*Punica granatum* L.) using an enriched library. *Conservation Genet. Resour.* 2: 283-285.

Hasnaoui N., Buonamici A., Sebastiani F., Mars M., Zhang D. et Vendramin G.G. 2012. Molecular genetic diversity of *Punica granatum* L. (pomegranate) as revealed by microsatellite DNA markers (SSR). *Gene* 493:105-112.

Hasnaoui N., Mars M., Chibani J. et Trifi M. 2010a. Molecular Polymorphisms in Tunisian Pomegranate (*Punica granatum* L.) as Revealed by RAPD Fingerprints. *Diversity*. 2:107-114.

Hasnaoui N., Jbir R., Mars M., Trifi M., Kamal-Eldin A., Melgarejo P. et Hernandez F. 2011. Organic acids, sugars and anthocyanins contents in juices of Tunisian pomegranate fruits. *Int. J. Food. Prop.* 14:741-757.

Heath D.D., Iwana G.K. et Delvin R.H. 1993. PCR primed with VNTR core sequences yield species specific patterns and hyper variable probes. *Nucl. Acid. Res.* 21: 5782-5785.

Hernandez F., Melgarejo P., Olias J.M. et Artes F. 2000. Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from three commercial pomegranate cultivars. In: Melgarejo-Moreno, P., Martinez-Nicolas, J.J., Martinez-Tome, J. (Eds.), *Production, Processing and Marketing of Pomegranate in the Mediterranean Region: Advances in Research and Technology*. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, Spain, pp. 205-209.

Hmid I., Elothmani D., Hanine H. et Oukbali A. 2013. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. *Arab. J. Chem.* 1878-5352.

Holland D. et Bar-Ya'akov I. 2008. The pomegranate: new interest in an ancient fruit. *ISHS*. 48: 12-15.

Hussein M.A., El Sese A.M., El Mahdy T.K. et Abd El Sabour B. 1994. Physiological studies on thinning effects on the yield and fruit of quality of Manfalouty pomegranate. A flowering behaviour and sevin, NAA and hand thinning effects on fruit yield and certain fruit characteristics. *Assiut. J. Agr. Sci.* 25: 27-40.

Iezzoni A.F. et Pritt M.P. 1991. Application of principal component analysis to horticultural research. *Hort. Sci.* 26: 334-338.

Ismail T., Sestili P. et Akhtar S. 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J. Ethnopharmacol.* 143: 397-405.

J

Jacomet S., Kucan D., Ritter A., Suter G. et Hagendorn A. 2002. "*Punica granatum* L. (pomegranates) from early Roman contexts in Vindonissa (Switzerland)". *Vegetation History and Archaeobotany.* 11:79-92.

Jadhav V.T. et Sharma J. 2007. Pomegranate cultivation is very promising. *Indian. Hort.* 52: 30-31.

Jalilop, S.H. et Sampath Kumar P. 1990. Use of a gene marker to study the mode of pollination in pomegranate (*Punica granatum* L.). *J. Hort. Sci.* 65: 221-223.

Jbir R., Hasnaoui N., Mars M., Marrakchi M. et Trifi M. 2008. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. *Scien. Hort.* 115: 231-237.

Jbir R., Zehdi S, Hasnaoui N., Ben Dhiaf A., Messaoud M. et Salhi Hannachi A. 2012. Microsatellite polymorphism in Tunisian pomegranates (*Punica granatum* L.): Cultivar genotyping and identification. *Biochem. Systemat. Ecol.* 44: 27-35.

Julie J.M.T. 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): A review. *Alter. Med. Rev.* 13: 123-144.

K

Kaplan M., Haye T. et Raz A. 2001. Pomegranate juice supplementtation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J. Nutr.* 131: 2082-2089.

Khan S.A. 2009. The role of pomegranate (*Punica granatum* L.) in colon cancer. *Pak. J. Pharmaceut. Sci.* 22: 346-348.

Kijas J. M. H., Fowler J. C. S., Garbett C. A. et Thomas M. R. 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTech* 16: 656-662.

Kohno H. 2004. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats, *Cancer Sci.* 95: 481.

Konaté I., Berraho E.B. et Filali-Maltouf A. 2009. Inter-Simple Sequence Repeat Markers Variation among Natural Accessions of Moroccan Catob Tree (*Ceratonia siliqua* L). Int. J. Agric. Biol. 11: 168-172.

Koohi-Dehkordi M., Sayed-Tabatabaei B.E., Yamchi A. et Daneshshahraki A. 2007. Microsatellites markers in pomegranate. Acta. Hort. 760: 179-183.

Kulkarni A.P., Aradhya S.M. et Divakar S. 2005. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. Food Chemistry. 87: 551-557.

L

La Rue J.H. 1980. Growing pomegranates in California. UC Fruit & Nut Research Information center.

Lansky E.P. et Newman R.A. 2007. *Punica granatum* L (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J. Ethnopharmacol.109:177-206.

Lebart L., Morineau A. et Tabard N. 1977. Techniques de la description statistique. éditions en 1981, 1987, Dunod, Paris, p 352.

Levin G.M. 1994. Pomegranate (*Punica granatum* L.) plant genetic resources in Turkmenistan. Plant. Genet. Resour. Newsl. 97: 31-36.

Lewontin R.C. 1972. The apportionment of human diversity. Evol. Biol. 6: 381-398.

Lloyd J.U. 1987. *Punica granatum* L.

M

Mansour E., Ben Khaled A., Haddad M., Abid M., Bachar K. et Ali Ferchichi A. 2011. Selection of pomegranate (*Punica granatum* L.) in South-Eastern Tunisia. Afr. J. Biotech. 10: 9352-9361.

Marchenay P.1987. A la recherche des variétés locales de plantes cultivées. Guide méthodologique, Porquerolles, PAGE-PACA. Paris, Bureau des ressources génétiques, p 211.

Mars M. 2001. Ressources génétiques du grenadier (*Punica granatum* L.) en Tunisie : prospection, conservation et analyse de la diversité. Thèse de Doctorat es Sciences Naturelles. Faculté des Sciences de Tunis, Université El Manar Tunis, Tunisie.

Mars M. et Marrakchi M. 1998. Conservation et valorisation des ressources génétiques du grenadier (*Punica granatum* L.) en Tunisie. Plant. Genet. Resour. Newsl.114: 35-39.

Mars M. et Marrakchi M. 1999. Diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. Genet. Res. Crop. Evol. 46 : 461-467.

- Mars M. et Marrakchi M. 2000. Etude de la variabilité intra-arbre chez le grenadier (*Punica granatum* L.): application à l'échantillonnage des fruits «Study of pomegranate (*Punica granatum* L.) intra-tree variability: application to fruit sampling ». Fruits. 55: 347-355.
- Mars M. et Marrakchi M. 2004. Dynamique de floraison et régime de reproduction chez le grenadier (*Punica granatum* L.) en Tunisie. Fruits. 59 : 39-48.
- Mars M. et Sayadi S. 1992. Etude comparative de la qualité des fruits de cinq variétés de grenadier (*Punica granatum* L). Rev. Reg. Arides. 4: 45-57.
- Mars M. 1995. La culture du grenadier (*Punica granatum* L.) et du figuier (*Ficus carica* L.) en Tunisie. Cah. Options Méditer. 13: 85-95.
- Martínez J.J., Hernandez F., Haddioui A., Pilar L., Rafael M., Ajal E.A. et Pablo M. 2012. Physico-chemical characterization of six pomegranate cultivars from Morocco: Processing and fresh market aptitudes. Sci. Hortic. 140: 100-106.
- Martinez J.J., Melgarejo P., Hernández F., Salazar D.M. et Martínez R. 2006. Seed characterisation of five new pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties. Scientia Horticulturae. 10: 241-246.
- McDermott J.M. et McDonald B.A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 353-373.
- McFarlin B.K., Strohacker K.A. et Kueht M.L. 2009. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. Br. J. Nutr. 102: 54-59.
- Medjakovic S., et Jungbauer A. 2012. Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. Food Funct. 4:19–39.
- Melgarejo M. P. et Martínez V.R. 1992. El Granado. Mundi Prensa, Madrid, Spain. p 163.
- Melgarejo P. et Valero D. 2012. Series A: Mediterranean Seminars. N° 103. Spain.
- Melgarejo P. et Salazar D.M. 2003. Tratado De Fruticultura Para Zonas Áridas Y Semiáridas. 2, 416 p.
- Melgarejo P., Salazar D.M. et Amoros A. 1995. Total lipids content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. J. Sci. Food Agr. 69: 253-256.
- Melgarejo P., Salazar D.M. et Artes F. 2000. Organic acids and sugars composition of harvested pomegranate fruits. Euro. Food Research Tech. 211:185-190.
- Mertens-Talcott S.U., Lee J.H, Percival S.S. et Talcott S.T. 2006. Induction of cell death in Caco-2 human colon carcinoma cells by ellagic acid rich fractions from muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* L.). J. Agr. Food Chem. 54: 5336–5343.

Miguel M.G., Neves M.A. et Antunes M.D. 2010. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties - a short review. J. Med. Plants Res. 4: 2836-2847.

Mirdehghan S. et Rahemi M. 2007. Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. Sci. Hortic. 111:120-127.

Morgante A.M. et Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics M. The Plant Journal. 3: 175–182.

Moriguchi T., Omura M., Natsuta N. et Kozaki I. 1987. In vitro adventitious shoot formation from anthers of pomegranate. Hortic. Sci. 22: 947-948.

Moslemi M., Zahravi M. et Gholamreza B. 2010. Genetic diversity and population genetic structure of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Iran using AFLP markers. Scientia Horticulturae. 126: 441-447.

Muradolu, F., M. Fikret Balta, and K. Ozrenk. 2006. Pomegranate (*Punica granatum* L.) genetic resources from Hakkari, Turkey. Research J. Agr. Biol. Sci. 2:520-525.

N

Narzary D., Mahar K.S., Rana T.S. et Ranade S.A. 2009b. Analysis of genetic diversity among wild pomegranates in western Himalayas using PCR methods. Sci. Hortic.121: 237-242.

Narzary D., Rana T.S. et Ranade S.A. 2009a. Genetic diversity in inter-simple sequence repeat profiles across natural populations of Indian pomegranate (*Punica granatum* L.). Plant Biol. 12: 806-813.

Narzary D., Rana T.S. et Ranade S.A. 2010. Molecular analyses of genetic diversity in Indian pomegranates using RAPD, DAMD and ISSR. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. Fruit Veg. Cereal. Sci. Biotech. 4: 126-143.

Nath N. et Randhawa G.S. 1959. Studies on floral biology in the pomegranate (*Punica granatum* L.) I. Flowering habit, flowering season, bud development and sex-ratio in flowers. Indian J. Hortic. 16: 61-68.

Negi P.S. et Jayaprakasha G.K. 2003. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* extract. J. Food Sci. 68: 1473-1477.

Ngezahayo F., Dong Y. et Liu B. 2007. Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pair wise sequence analysis, Appl. Genet. 48: 329-336.

Noda Y., Kaneyuka T., Mori A. et Packer L. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. J. Agr. Food Chem. 50: 166-171.

Noormohammadi, Z., Fasihee A., Homae- Rashidpoor A., Sheidai M., Baraki S.G., Mazooji A. et Tabatabaee-Ardakani S.Z. 2012. Genetic Variation among Iranian Pomegranates (*Punica granatum* L.) using RAPD, ISSR and SSR Markers. *Austr. J. Crop Sci.* 6:268-275.

Norouzi M., Talebi M. et Sayed-Tabatabaei B.E. 2012. Chloroplast microsatellite diversity and population genetic structure of Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Sci. Hortic.* 137: 114-120.

O

Ohri D. 2002. Genome size variation in some tropical hardwoods. *Biol. Plant.* 45: 455-457.

Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S. et Chowwanapoonpohn S. 2007. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem.* 103: 839-846.

Oukabli A., Bellaj M., Chahbar A., Elkacemi A., Lahlou M. et Allabou M. 2004. Comportement de clones locaux et de variétés étrangères de grenadier (*Punica granatum* L.) conduits dans la région de Meknès. *AL AWAMIA*, n°111(3). P91.

Oury P. 1984. *Encyclopédie des plantes et fleurs médicinales*. Tome II. Edition Alliance. Paris.

Özgülven A.I., Yılmaz M., Yılmaz C. et Rehber Y. 2009. The adaptation of different pomegranate cultivars to the ecological conditions of Northern Cyprus. *Proceedings of the First International Symposium on Pomegranate and Minor Mediterranean Fruits. Acta. Hort* 4: 161-818.

Özgülven A.I. et Yilmez C. 2000. Pomegranate growing in Turkey. *Option Méditerranéennes* 42: 41-48.

P

Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12, 357–358.

Panichayupakaranant, P., Tewtrakul S. et Yuenyongsawad S. 2010. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. *Food Chem* 3: 123-400.

Parvaresh, M., Talebi M. et Sayed-Tabatabaei B.E. 2012. Molecular diversity and genetic relationship of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes using microsatellite markers. *Sci. Hortic.* 138: 244-252.

Pilar L., Pablo M., Haddioui A. et Juan J.M, Rafael M., Hmid I., Hanine H. et Francisca H. 2012. Total phenols and antioxidant capacity in 10 Moroccan Pomegranate Varieties. *J. Food Sci.* 71: 115-120.

Powell W., Machray G. et Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends. Plant. Sci.* 1: 215-222.

Prevost A. et Wilkinson M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.

R

Ranade S.A., Rana T.S. et Narzary D. 2009. SPAR profiles and genetic diversity amongst pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* v15 (1).

Roupe van der Voort, J.N.A.M., Zandvoort P., Van Eck J.H, Folkertsma F.T., Hutten R.C.B., Draaistra J., Gommers F.J, Jacobsen E., Helder J. et Bakker J. 1997. Allele specificity of comignating AFLP markers used to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* 255: 438-447.

S

Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G.T., Erlich H.A. et Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Salhi-Hannachi A., Trifi M., Zehrdis S., Hedfi J., Mars M., Rhouma A. et Marrakchi M. 2004. Inter simple sequence repeat fingerprints to assess genetic diversity in Tunisian fig (*Ficus cacia L.*) germplasm. *Gen. Res. Crop Evol.* 51:269-272.

Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sanchez-Monge E. 1974. *Fitogenética: mejora de plantas.* Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ministerio de Agricultura. Madrid. P 456.

Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado E. et Prat D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cah. Agric.* 9 : 3311-3327.

Sarkhosh A., Zamani Z., Fatahi R. et Ebadi A. 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes. *Sci. Hortic.* 111: 24–29.

Sarkhosh A., Zamani Z., Fatahi R., Hassani M.E., Wiedow C., Buck E. et Gardiner S.E. 2011. Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17, 305–311.

Sarkhosh A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ranjbar, H., 2009. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. *Sci. Hortic.* 121, 313–319.

Seeram N.P., Schulman R.N. et Heber D.2006. *Pomegranates: Ancient Roots to*

Modern Medicine. Taylor and Francis CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Seeram N.P., Aronson W.J, Zhang Y., Henning S.M., Moro A., Lee R.P, Sartippour M., Harris D.M., Rettig M., Suchard M.A., Pantuck A.J, Belldegrun A. et Heber D. 2007. Pomegranate ellagitannin-derived metabolites inhibit prostate cancer growth and localize to the mouse prostate gland. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7732–7737.

Seerama N.P., Lynn T., Adamsa S., Susanne M., Henninga Y.N., Muraleedharan Y.Z. et Nair David G. 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Hebera. J. Nutri. Bioch.* 16: 360-367.

Sharma S.D. et Sharma V.K. 1990. Variation of chemical characters in some promising strains of wild pomegranate (*Punica granatum* L.). *Euphytica.* 49:131-133.

Shulman Y., Fainberstein L. et Lavee S.1984. Pomegranate fruit development and maturation. *J. Hort. Sci.* 59: 265-274.

Sijelmassi A. 1991. les plantes médicinales du Maroc. Editions de Fennec. Casablanca.

Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 16: 393-430.

Soleimani M.H., Talebi M. et Sayed-Tabatabaei B.E. 2012. Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran. *Plant Syst.Evol.* 298: 1141-1149.

Spichiger R., Calenge C. et Bise B. 2004. Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Parana Basin. *J. Biogeo.* 31:1489-150.

Su X., Sangster M.Y. et Souza D.H. 2010. In vitro effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on food borne viral surrogates. *Food borne Pathol. Dis.*7: 1473-1479.

Su X., Sangster M.Y. et Souza D.H. 2011. Time-dependent effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on food borne viral reduction. *Food borne Pathol. Dis.* 8: 1177-1183.

Syed A.S., D'Antonio M. et Ciccarelli F.D. 2010. *Nucleic Acids Res.* 38: 670-675.

T

Tagu D., Nasse B. et Martin F. 1996. Cloning and characterization of hydrophobin-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* 168:93-97.

Talebi Baddaf M., Sharifi Neia B. et Bahar M. 2003. Analysis of genetic diversity in pomegranate cultivars of Iran, using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In: *Proceedings of the Third National Congress of Biotechnology.* 2: 343-345.

Tao W., Li M. et Zhao C. 2007. Structure and properties of regenerated Antheraea pernyi silk fibroin in aqueous solution. *Int. J. Biol. Macromol.* 40: 472-478.

Tehranifar A., Zarei M, Nemati Z. et Esfandiyari B. 2011. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* 126: 180-185.

Tous J. et Ferguson L. 1996. Mediterranean fruits. In: *Progress en New Crops*, J. Janick (ed.). ASHS Press, Arlington, VA., p 416-430.

Tsumura Y., Ohba K. et Strauss S.H. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92:40-45

V

Viuda-Martos M., Fernandez-Lopez J. et Perez-Alvarez J.A. 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Compr.Rev. Food Sci. Saf.* 9: 635–654.

Vos P., Hoger R., Bleeker M., Rejans M., Vandeleer T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. et Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids. Res.* 23:4407-4417.

W

Walali D.L. 1995. Quelques espèces fruitières d'intérêt secondaire cultivées au Maroc. *Options Méditerranéennes* 47-62.

Wald E. 2009. Le grenadier (*Punica granatum* L): plante historique et évolutions thérapeutiques. Thèse de doctorat d'Etat, université Henri Poincaré-Nancy, 148p.

Wallali L.D., Skiredj A. et Elattir A. 2003. L'amandier, l'olivier, le figuier, le grenadier. *Bulletin de Transfert de Technologie*, n°105, juin, 2003,4p.

Wang R.F., Ding Y., Liu R.N., Xiang L. et Du L.J. 2010. Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. In: Chandra, R. (Ed.), *Pomegranate. Fruit Veg.Cereal Sci. Biotechnol.* 4 : 77-87.

Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B.T. et Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphism (SSAP). *Mol. Gen. Genet.* 253: 687-694

Weber J.L. et May P. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Amer. J. Human Gen.* 44: 388-396.

Williams J.G.K., Kublik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. et Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.

Winter P. et Kahl G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. World J. Microb. Biotechnol. 11: 438-448.

Y

Yuan Z., Yin Y., Qu J., Zhu L. et Li Y. 2007. Population Genetic Diversity in Chinese Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Revealed by Fluorescent-AFLP Markers. J. Genet. Genom. 34:1061-1071.

Yuan Z.H., Yin Y.L.Y., Zhu L.Q., Li Y. et Hou L.F. 2008. Genetic diversity and relationship in pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Shandong revealed by fluorescent-AFLP markers. Acta Horti. Sin. 35: 107–112.

Z

Zabeau M. et Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.

Zamani Z., Sarkhosh A., Fatahi R. et Ebadi A. 2007. Genetic relationships among pomegranate genotypes studied by fruit characteristics and RAPD markers. J. Hort. Sci Biotech. 82: 11-18.

Zarei A., Zamani Z. et Fatahi R. 2009. Evaluation of genetic relationships among some Persian cultivated and a wild pomegranate accession using RAPDs and SSRs molecular markers. Horti. Env. Biotech. 50: 224-232.

Zhang S.P., Wang L.J., Cao S.Y. et Liu T. 2008. Analysis of genetic diversity of 23 pomegranate genotypes by SRAP. J. Fruit Sci. 25: 655-660.

Zietkiewicz E., Rafalski A. et Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.

Zine El Aabidine A., Baissac Y., AMoukhli A., Jay-Allemand C., Khadari B. et El Modafar C. 2010. Resistance of Olive Tree to *Spilocaea oleagina* is Mediated by the Synthesis of Phenolic Compounds. Int. J. Agr. Bio: 1814-9596.

Zukovskij P.M., 1950. *Punica*. Cultivated plants and their wild relatives. State Publishing House Soviet Science. Moscow. 60-61.

Sites :

www. FAOSTAT.FAO.org

<https://www.flickr.com/photos/rubengobetti/6427753479>.